

Spectrophotometric Determination of Amoxicillin Trihydrate by Coupling with Diazotized 2, 4-Dinitroaniline

Hisham Amin Taher Al-Herki^{1*}, Subhi Mohsin Jarullah Al-Mtwaiti²

^{1,2}Department of Chemistry, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: ¹ hisham.esp93@student.uomosul.edu.iq , ² drsubhi74@uomosul.edu.iq

(Received June 05, 2021; Accepted July 27, 2021; Available online September 01, 2021)

DOI: [10.33899/edsj.2021.130393.1165](https://doi.org/10.33899/edsj.2021.130393.1165), © 2021, College of Education for Pure Science, University of Mosul.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Abstract:

A simple, accurate and sensitive spectrophotometric method has been developed for the determination of amoxicillin trihydrate (AMOX) as pure and in pharmaceutical preparations (capsule). This method based on the coupling reaction of drug with diazotized 2,4- dinitroaniline reagent in an alkaline medium at 20 °C to produce an intense red, water-soluble dye that is stable and has a maximum absorption at 555 nm . Beer's law was obeyed over the concentration range 3-16 µg/ml with molar absorptivity of $1.1 \times 10^4 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. The limit of detection (LOD) is 0.1448 µg/ml while the limit of quantitation (LOQ) is 0.4825 µg/ml. The method shows high accuracy (average recovery 100.43%) and precision (relative standard division (RSD) is less than 1.4%). The stoichiometry of the resulting azo dye has been also worked out and it is found to be 1:1 AMOX:Diazotized 2,4-Dinitroaniline. Standard addition method refers to the suggested method is free from interferences from common excipients. The developed method was successfully applied for the determination of studied drug in capsules comparable with the certified content value. .

Keywords: Spectrophotometry, Diazotization-coupling reaction, Amoxicillin Trihydrate, 2,4-dinitroanilin

التقدير الطيفي للاموكسيسيلين ثلاثي الماء بالاقتران مع 2،4-ثنائي نيتروأنيلين المؤزوت

هشام امين طاهر الهركي^{1*} و صبحي محسن جار الله المتيوتي²

قسم الكيمياء، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق

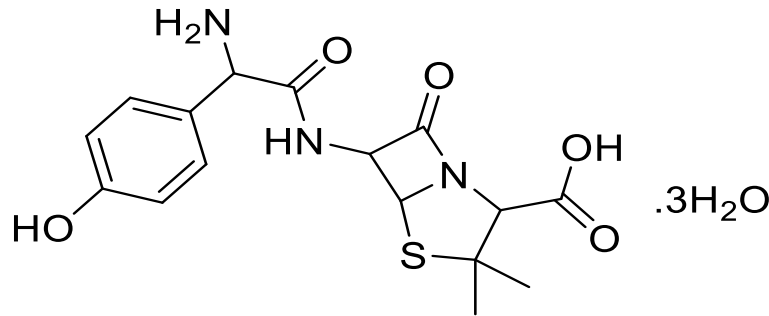
الخلاصة

طورت طريقة طيفية بسيطة وحساسة لتقدير كميات مايكروغرامية من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء بهيئته النقية وفي مستحضراته الصيدلانية (كبسول). تعتمد على اقتران الكاشف المؤزوت 2،4-ثنائي نيتروأنيلين مع المركب الدوائي في الوسط القاعدي وعند درجة حرارة 20 °م لتكوين صبغة ازوية ملونة ذائبة في الماء ومستقرة وتعطي اقصى امتصاص عند الطول الموجي 555 نانوميتر وتتبع الطريقة قانون بير ضمن مدى التراكيز 3-16 مايكروغرام/مللتر وبامتصاصية مولارية $1.1 \times 10^4 \text{ لتر.مول}^{-1}.\text{سم}^{-1}$ وبمعدل نسبة استرجاع 100.43% وانحراف قياسي اقل من 1.4%. بلغ حد الكشف (LOD) 0.1448 مايكروغرام/مللتر وبلغ حد التقدير الكمي (LOQ) 0.4825 مايكروغرام/مللتر. وكانت نسبة التركيبة المولية بين الاموكسيسيلين والكاشف المؤزوت 2،4-ثنائي نيتروأنيلين 1:1. لاجل اثبات كفاءة الطريقة المقترحة لتقدير دواء الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في مسحضراته الصيدلانية ونجاحها في التقدير بطريقة الازوتة وخلوها من تأثير المضافات وبسبب عدم توفر متطلبات واجهزة الطريقة القياسية للدستور البريطاني، فقد طبقت طريقة الاضافة القياسية على تركيزين مختلفين من مستحضرات الدواء (الكبسول) وقد اشارت النتائج على ان

طريقة الاضافة القياسية متفقة على نحو جيد مع الطريقة المقترحة ضمن المدى المقبول للخطأ مما يدل على ان الطريقة ذات انتقائية جيدة. وطبقت الطريقة بنجاح لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في مسحضراته الصيدلانية اذ كانت النتائج متفقة على نحو جيد مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية .

الكلمات المفتاحية: المطياف الضوئي ، تفاعل الاقتران الازوتي ، اموكسيسيلين ثلاثي الماء ، 4،2-ثنائي نيتروانيلين
: المقدمة

الاموكسيسيلين ثلاثي الماء هو دواء شبه اصطناعي ينتمي الى فئة من المضادات الحيوية تسمى البنسيلينات ويستخدم لعلاج مجموعة واسعة من الالتهابات التي تسببها البكتريا موجبة -الغرام وسالبة -الغرام ، ويستخدم لعلاج التهابات الأذن الوسطى والمسالك البولية والحجرة والتهاب الشعب الهوائية⁽¹⁻³⁾ . عادةً ما يكون هو الدواء المفضل لأنه يتم امتصاصه بسرعة اكبر وبشكل تام أكثر من بقية المضادات الحيوية من نوع بيتا- لاكتام الأخرى عند تناوله عن طريق الفم ، وكذلك يقاوم التثبيط عن طريق حامض المعدة⁽⁴⁾ . وهو عبارة عن مسحوق بلوري ابيض قابل للذوبان في الماء وقليل الذوبان جدا في الايثانول وغير ذائب في الزيوت والدهون ، غير انه ذائب في المحاليل المخففة للحوامض وكذلك القواعد الهيدروكسيدية^(5،6) . تسميته حسب البنسيلينات هو α -amino-p-hydroxy benzyl 6-[D(-)- α -Amino-p-hydroxyphenyl acetamido]penicillanic acid او يسمى penicillin 7-[2-Amino-2-(4-hydroxyphenyl)-acetyl]amino- (IUPAC) بينما تكون تسميته حسب نظام 3,3,dimethyl-6-oxo-2-thia-5-azabicyclo [3,2,0] heptan-4-carboxylic acid ، والتركيب الكيميائي له يكون بالشكل (1)⁽⁷⁾:



Formula structure: $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$

M.Wt: 419.449 gm/mole

Scheme 1 : Amoxicillin trihydrate structure

استخدمت طرائق تحليلية مختلفة لتقدير دواء الاموكسيسيلين ثلاثي الماء وتتضمن : الطرائق الطيفية لتقدير كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي بالاعتماد على تفاعلات الاقتران الازوي مع كواشف متنوعة^(8,9) ، تفاعلات تكوين التجمعات الايونية^(10,11) وكذلك طريقة كهربائية⁽¹²⁾ ، كما استخدمت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء- الطور العكوس RP-HPLC^(13,14) ، كما استخدمت طريقة حركية⁽¹⁵⁾ وتفاعل زرقة بروسيان⁽¹⁶⁾ و تفاعلات تكوين معقدات الشحنة المنقلة⁽¹⁷⁾ .

ولقد طورت في هذا البحث طريقة طيفية لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء بشكله النقي وفي مستحضراته الصيدلانية (كبسول) بالاعتماد على اقترانه مع الكاشف المؤزوت 4،2-ثنائي نيتروانيلين في الوسط القاعدي ليعطي صبغة ازوية ملونة ومستقرة لها اقصى امتصاص عند 555 نانوميتر .

الجزء العملي:

الاجهزة المستعملة

استعمل جهاز المطياف الضوئي UV-1800 PC UV – spectrophotometer Shimadzu Double beam Visible ، مع خلايا كوارتز ذات عرض 1سم ، كما تم تسخين المحاليل باستعمال حمام مائي من نوع BS-11 Lab Companion –Korea وأجري الوزن باستعمال ميزان حساس من نوع KERN ABS–Germany ، وتم استعمال جهاز المحرك المغناطيسي نوع Elektro.mag لغرض اكمال الاذابة .

المواد الكيميائية المستخدمة

كل المواد المستعملة في البحث كانت على درجة عالية من النقاوة ومصنعة من شركات عالمية معتمدة مثل شركة Fluka و BHD و AIFa .

وتم الحصول على الاموكسيسيلين ثلاثي الماء من قبل شركة ادوية سامراء – العراق (SDI) .

محلول اموكسيسيلين ثلاثي الماء القياسي (100 مايكروغرام/مللتر)

حُضِر المحلول باذابة 0.0100 غرام من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء النقي في 10 مللتر من الماء، ثم خفف المحلول بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مللتر.

محلول 4,2-ثنائي نيترو أنيلين (0.1%)

حُضِر المحلول باذابة 0.1000 غم من 4,2-ثنائي نيتروأنيلين (DNA-2,4) في 50 مللتر من الاسيتونتريل، ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مللتر⁽¹⁸⁾ (حيث انه غير ذائب في الماء) .

محاليل الحوامض المعدنية (1 عياري)

حُضِرَت المحاليل بتخفيف الكمية المناسبة من كل حامض مركز في قنينة حجمية سعة 100 مللتر باضافتها الى الماء المقطر ثم التكملة بالماء المقطر الى حد العلامة .

محاليل القواعد (1 عياري)

حُضِرَت بإذابة الكمية المناسبة من كل قاعدة بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مللتر .

محلول نترتيت الصوديوم (1%)

حُضِر بإذابة 1غم من نترتيت الصوديوم بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مللتر .

محلول حامض السلفاميك (2%)

حُضِر بإذابة 2غم من حامض السلفاميك بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مللتر .

محاليل المواد الفعالة سطحياً (0.1 و 1%)

حُضِرَت المحاليل بإذابة 0.1000 غم من كل من Cetyl Trimethylammonium Bromide (CTAB) وكبريتات الصوديوم الدوديكالية (SDS) وإذابة 1 غم من توين- 20 بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مللتر .

طريقة العمل والمنحني القياسي

أضيف 1.5 مللتر من الكاشف DNA-2,4 بتركيز 0.1% الى سلسلة من القناني الحجمية سعة 25 مللتر ، ومن ثم اضافة 0.5 مللتر من حامض الهيدروكلوريك (1عياري) تبعها اضافة 1 مللتر من نترتيت الصوديوم (2%) مع الرج لمدة 10 دقائق لاتمام التفاعل ، ومن ثم اضافة 0.5 مللتر من حامض السلفاميك (2%) مع التحريك لمدة 3 دقائق لغرض التخلص من النترتيت الفائض

يتبعها اضافة حجوم متزايدة من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء لتغطية المدى التقديري (3-16) مايكروغرام/ملتر ثم جعل الوسط قاعدياً باضافة 1 ملتر من هيدروكسيد البوتاسيوم 1 عياري ومن ثم اضافة 2 ملتر من المادة الفعالة سطحياً (1% توين- 20) . ثم اكملت الحجوم بالماء المقطر الى حد العلامة وتركت في درجة حرارة الغرفة 20 م° وقيس الامتصاص للمحاليل الملونة مقابل المحلول الصوري لها بعد 10 دقائق من التخفيف عند الطول الموجي 555 نانوميتر .

تقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في مستحضراته الصيدلانية :

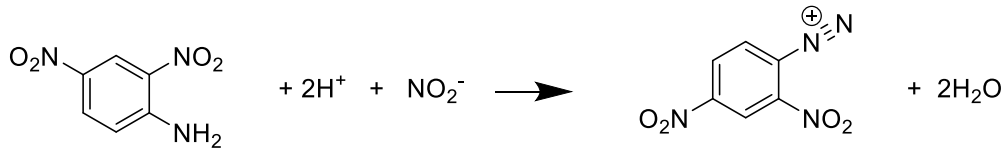
الكبسول

تم وزن محتوى خمس كبسولات (تحتوي كل كبسولة على 500 ملغم من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء) وبعد مزجها جيداً وُزن من المسحوق ما يكافئ 500 ملغم (محتوى قرص دوائي واحد) وتم اذابتها في 400 ملتر من الماء المقطر ثم تركت على جهاز المحرك المغناطيسي لمدة ساعة لاكمال الاذابة ثم رُشح المحلول ونُقل الى قنينة حجمية سعة 1000 ملتر واكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر للحصول على 500 مايكروغرام/ملتر من محلول الكبسولات الدوائية , وحُضر منه محلول بتركيز 100 مايكروغرام/ملتر . وتم معاملتها وفق طريقة العمل المعتمدة.

النتائج و المناقشة

مبدأ الطريقة

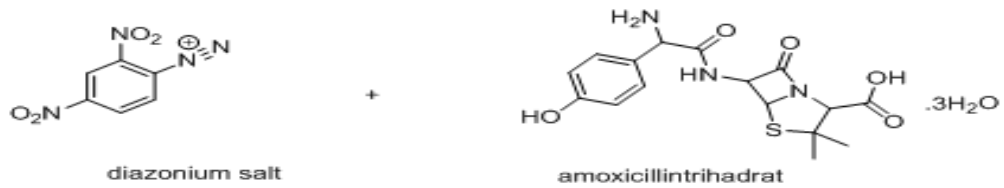
تم مفاعلة الكاشف 4,2-ثنائي نيتروأنيلين مع نترت الصوديوم بوجود حامض الهيدروكلوريك لتكوين ملح الديازونيوم بحسب المعادلة الاتية⁽¹⁹⁾:



2, 4-Dinitroaniline

Diazonium salt

ثم يقترن الكاشف 4,2-ثنائي نيتروأنيلين المؤزوت مع الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في الوسط القاعدي ليعطي صبغة ازوية لها اقصى امتصاص عند الطول الموجي 510 نانوميتر :



Diazonium salt

Amoxicillin Trihydrate

Red Azo dye

دراسة الظروف المثلى

درست مختلف المتغيرات المؤثرة على تفاعل تكوين الصبغة الازوية لغرض الحصول على الظروف المثلى لتكوينها باستخدام كمية ثابتة من المركب الدوائي (4 مايكروغرام/مللتر) وعند درجة حرارة 20°م .

تأثير الكمية المثلى من الكاشف

تم اختيار الكاشف 4,2-ثنائي نيترو أنيلين في هذا البحث لانه كاشف اقتران قوي لوجود مجموعتي نيترو ساحبة للالكترونات حيث تزيد من استقرارية الصبغة الناتجة بسبب حالة الرنين العالية .
تمت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الكاشف (0.05 - 0.2%) على امتصاص الصبغة المتكونة . وتشير النتائج في الجدولين 1 و2 بان استخدام 1.5 مللتر من 0.1% من الكاشف هي الكمية المثلى لاعطائها اعلى امتصاص.

جدول (1) تأثير تركيز كاشف الاقتران على امتصاص الصبغة الناتجة

Concentration of reagent (%)	Absorbance
0.05	0.068
0.1	0.112
0.15	Turbid
0.2	Turbid

جدول (2) تأثير كمية الكاشف 42-ثنائي نيتروأنيلين على امتصاص الصبغة الناتجة.

Volume of 0.1% of reagent (ml)	Absorbance
0.5	0.098
1	0.114
1.5	0.118
2	0.099

تأثير نوع الحامض على تكوين ملح الدايزونيوم

تم إجراء ازوتة الكاشف 4,2-ثنائي نيتروأنيلين في وسط حامضي باستخدام حوامض مختلفة (H_2SO_4 و HCl و HNO_3 و CH_3COOH) وتشير النتائج المبينة في الجداول 3 و4 و5 بأن استخدام 0.5 مل من 1 عياري من حامض الهيدروكلوريك هي الكمية المثلى لتكوين ملح الدايزونيوم للكاشف 4,2-ثنائي نيتروأنيلين

جدول (3) تأثير نوع الحامض على امتصاص الصبغة المتكونة.

Type of acid (1N)	Absorbance
HCl	0.116
H ₂ SO ₄	0.097
HNO ₃	0.114
CH ₃ COOH	0.062

جدول (4) تأثير تركيز حامض الهيدروكلوريك على امتصاص الصبغة المتكونة.

Normality of HCl	Absorbance
0.5	0.061
1	0.117
1.5	0.092
2	0.014

جدول (5) تأثير كمية حامض الهيدروكلوريك على امتصاص الصبغة المتكونة.

Volume of 1N HCl (ml)	Absorbance
0.25	0.048
0.5	0.118
0.75	0.090
1	0.018

تأثير كمية النتريت

تم دراسة تأثير كمية النتريت اللازمة لازوتة الكاشف 4,2-ثنائي نيتروأنيلين وتبين ان الصبغة المتكونة تعطي اعلى شدة امتصاص عند استخدام 1 مل من 2% من النتريت بزمن 10 دقائق لاتمام عملية الازوتة كما موضح في الجدولين (6و7) .

جدول (6) تأثير تركيز النترت على شدة امتصاص الصبغة المتكونة.

Concentration % of nitrite	Absorbance
0.5	0.078
1	0.117
1.5	0.125
2	0.128
2.5	0.123
3	0.108

جدول (7) تأثير حجم نترت الصوديوم بتركيز 2% على امتصاص الصبغة المتكونة.

Volume of 2% NaNO ₂ (ml)	Absorbance
0.5	0.091
1	0.129
1.5	0.114
2	0.099

تأثير تركيز حامض السلفاميك وكميته

من الضروري التخلص من حامض النتروز الغير متفاعل في الخطوة الاولى وذلك لاحتمالية حدوث تفاعل نيترة, وعليه يتم استخدام حامض السلفاميك لتحطيم وازالة النيتروز الفائض⁽²⁰⁾, ومن الجدولين (8و9) يتضح ان استخدام 0.5 مل من 2% من حامض السلفاميك وبزمن 3 دقائق هي الكمية المثلى له وحدث تفاعل ازوتة ثابت .

الجدول (8) تأثير تركيز حامض السلفاميك على امتصاص الصبغة المتكونة.

Concentration of Sulphamic acid (%)	Absorbance
1	0.113
1.5	0.119
2	0.126
2.5	0.115
3	0.112

جدول (9) تأثير كمية حامض السلفاميك على امتصاص الصبغة الناتجة.

Volum of 2% of Sulphamic acid(ml)	Absorbance
0.25	0.124
0.5	0.129
0.75	0.122
1	0.093

تأثير نوع القاعدة وكميتها

ان تفاعل اقتران الكاشف المؤزوت 4,2-ثنائي نيتروأنيلين مع الاموكسيسيلين ثلاثي الماء يحدث في الوسط القاعدي , لهذا درس تأثير انواع مختلفة من القواعد (KOH و NaOH و Na_2CO_3) وتشير النتائج في الجداول 10 و 11 و 12 أن استخدام 1 مل من 1 عياري من KOH هي افضل كمية لاعطائها اعلى امتصاص للصبغة الناتجة .

جدول(10) تأثير نوع القاعدة على امتصاص الصبغة المتكونة.

Type of base (1N)	NaOH	KOH	Na_2CO_3
Absorbance	0.115	0.126	0.022

جدول(11) تأثير تركيز هيدروكسيد البوتاسيوم على امتصاص الصبغة المتكونة.

Concentration of KOH (N)	Absorbance
0.5	0.033
1	0.125
1.5	0.091
2	0.076

جدول (12) تأثير كمية هيدروكسيد البوتاسيوم على امتصاص الصبغة المتكونة.

Volume of 1 N KOH (ml)	Absorbance
0.5	0.028
1	0.127
1.5	0.116
2	0.104

تأثير مواد الشد السطحي

دُرِس تأثير أنواع مختلفة من المواد الفعالة سطحياً الكاتيونية والانيونية والمتعادلة على امتصاص الصبغة المتكونة وكذلك على الطول الموجي . إذ اضيف 1 ملتر من 0.1% لكل من (CTAB) و (SDS) و 1 ملتر من 1% من توين - 20 الى مزيج التفاعل و من ثم قياس الامتصاص للمحاليل عند الطول الموجي 510 نانوميتر , ومن ثم اجراء المسح لكل محلول لتحديد الطول الموجي الجديد اذ وجد أن استخدام توين - 20 المتعادل يعطي استقرار للصبغة الناتجة وكذلك زيادة في الطول الموجي من 510 الى 555 نانوميتر وزيادة في الامتصاص والتي اعتمدت في التجارب اللاحقة , كما تم دراسة تأثير كمية توين - 20 والتي كانت 2 مل من 1% من توين - 20, كما موضح في الجدولين (13 و 14).

جدول (13) تأثير المواد الفعالة سطحياً على الامتصاص والتباين.

Type of surfactant	Absorbance	
	at 510 nm	at λ max (nm)
Without	0.131	0.131/510
CTAB 0.1%	0.103	0.116/534
SDS 0.1%	0.130	0.131/508.5
Tween-20 1%	0.118	0.139/555

جدول (14) تأثير كمية 1% من محلول توين - 20 على امتصاص الصبغة الناتجة.

Volume of 1% Tween-20 (ml)	Absorbance
1	0.138
1.5	0.145
2	0.149
2.5	0.146

تأثير تسلسل الاضافة

تمت دراسة تأثير تسلسل الاضافة على امتصاص الصبغة الناتجة وذلك باضافات متغيرة الترتيب للكاشف المؤزوت 2,4-DNA (R) والمركب الدوائي اموكسيسيلين ثلاثي الماء (D) والقاعدة (B) وخافض الشد السطحي Tween-20 (S) ومن النتائج المبينة في الجدول (15) يتبين لنا ان التسلسل (I) والمتبع في تثبيت الظروف المثلى اعطى اعلى امتصاص للصبغة المتكونة, لذا اعتمد هذا التسلسل في التجارب اللاحقة .

جدول(15) تأثير تسلسل الاضافة على امتصاص الصبغة المتكونة.

Order number	Order of addition	Absorbance
I	R +D+B+S	0.148
II	R +D+S+B	0.143
III	R +S+D+B	0.146
IV	R +B+S+D	-----

تأثير درجة الحرارة وزمن تكوين الصبغة الازوية

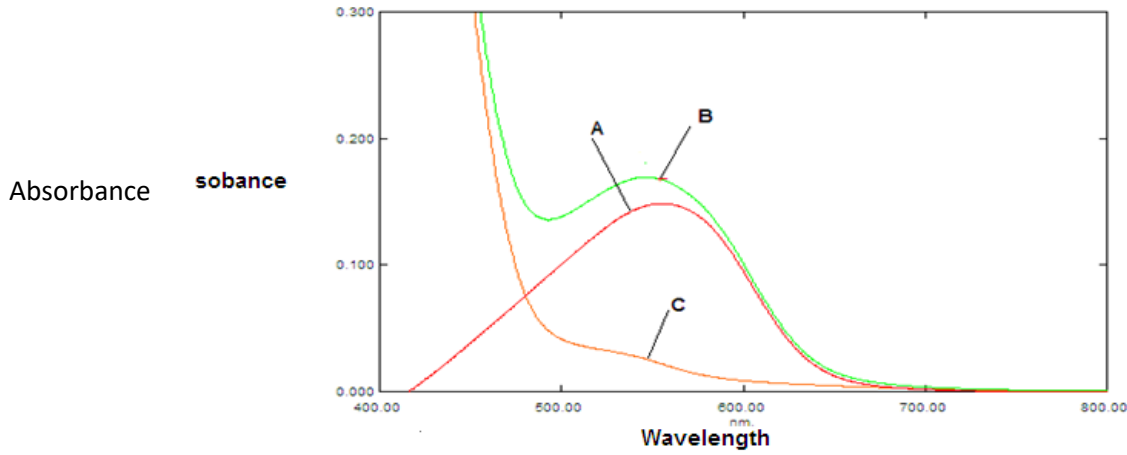
تم دراسة زمن تكوين المعقد في درجات حرارية مختلفة تراوحت بين 10-30 °م (تمت الدراسة عند 10°م بتثبيت قراءة الحمام المائي عند 10 ووضع قطع من الثلج فيه من اجل الحفاظ على درجة الحرارة عند 10°م) ، حيث وجد ان زمن تكوين الصبغة هو 10 دقائق وبزمن استقرار 50 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة (20 °م). والتي استخدمت في الدراسات اللاحقة كما هو مبين في الجدول (16).

جدول (16) تأثير درجة الحرارة على زمن تكوين الناتج الملون واستقراره

Standing time min	Absorbance/ Temperature °C		
	10°C	Room Temp 20°C	30°C
After addition	0.134	0.145	0.130
5	0.134	0.145	0.130
10	0.136	0.148	0.126
15	0.136	0.148	0.124
20	0.138	0.150	0.123
25	0.136	0.149	0.121
30	0.135	0.149	0.120
40	0.134	0.147	0.120
50	0.133	0.145	0.116
60	0.132	0.145	0.117
70	0.131	0.141	0.118
80	0.129	0.143	0.115
90	0.128	0.139	0.114
100	0.127	0.137	0.114
110	0.127	0.135	0.117
120	0.126	0.130	0.117
130	0.126	0.131	0.114
140	0.126	0.130	0.116

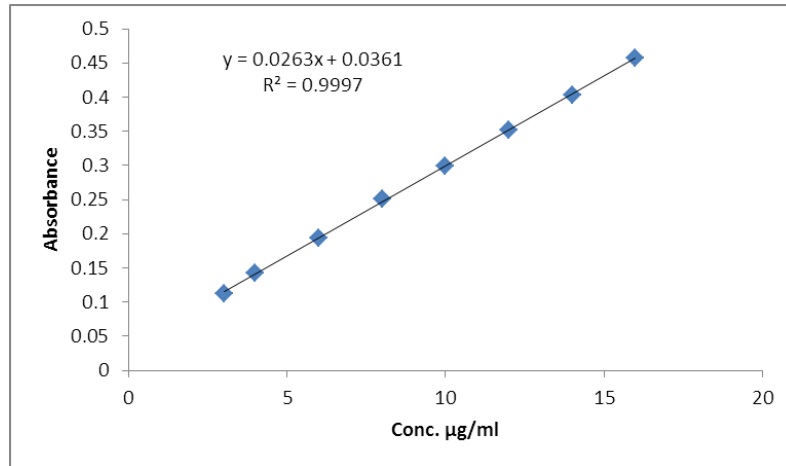
طيف الامتصاص النهائي

أجريت دراسة طيف الامتصاص النهائي للصبغة الازوية الناتجة من تفاعل اموكسيسيلين ثلاثي الماء مع الكاشف المؤزوت 4,2-ثنائي نيتروأنيلين في الوسط القاعدي وعند اطوال موجية من 400-800 نانوميتر , وقد أظهر رسم طيف الامتصاص اقصى شدة امتصاص للصبغة عند طول موجي 555 نانوميتر مقابل محلولها الصوري , في حين تبين ان المحلول الصوري له امتصاص ضعيف مقابل الماء المقطر في هذه المنطقة كما هو موضح في الشكل (2) .



شكل (2) طيف الامتصاص النهائي لصبغة الـ نيتروأنيلين المؤزوت في الوسط القاعدي. (A) طيف امتصاص الصبغة معيار الصوري , (B) طيف امتصاص الصبغة مقابل الماء المقطر , (C) طيف امتصاص المحلول الصوري مقابل الماء المقطر .
التقدير الكمي

أظهر رسم المنحني القياسي للامتصاص مقابل التراكيز المختلفة للاموكسيسيلين ثلاثي الماء ان الطريقة المقترحة تتبع قانون بير ضمن المدى 3-16 مايكروغرام/مللتر من المركب الدوائي مع انحراف سالب عن قانون بير بعد اعلى تركيز كما هو موضح في الشكل (3) , وكانت الطريقة ذات حساسية عالية اذ بلغت الامتصاصية المولارية $10^4 \times 1.1$ لتر.مول⁻¹.سم⁻¹، وقد تم حساب حد الكشف وكان 0.1464 مايكروغرام/مللتر وحد التقدير الكمي 0.4880 مايكروغرام/مللتر .



الشكل 3: المنحني القياسي لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء

دقة الطريقة وتوافقها

تم استخدام ثلاثة تراكيز مختلفة من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء لحساب الدقة والتوافق للطريقة المقترحة . وتشير النتائج في الجدول (17) الى ان الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين حيث ان معدل نسبة الاسترجاع كان 100.43% في حين كان معدل الانحراف القياسي RSD اقل من 1.4% .

الجدول (17) دقة الطريقة وتوافقها لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء

Amount of Amoxicillin trihydrate($\mu\text{g/ml}$)		Recovery (%)	Average Recovery*(%)	RSD * (%)
Taken	Found			
4	4.11	102.75	100.43	1.12
8	8.01	100.13		1.33
14	13.78	98.43		0.89

*Average of five determinations

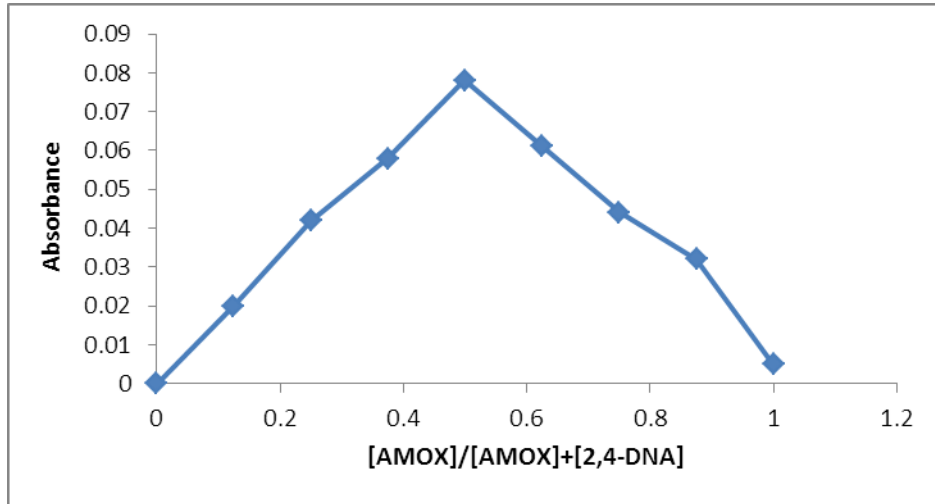
الجدول (18) ملخص الخصائص الطيفية والبيانات الاحصائية للطريقة المقترحة

Limit of detection(LOD) ($\mu\text{g/ml}$) [*]	0.1448
Limit of quantitation(LOQ) ($\mu\text{g/ml}$) [*]	0.4825
Molar absorptivity ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	1.1×10^4
Slope	0.0263
Intercep	0.0361
Determination coefficient(R^2)	0.9997

* For ten determinations of blank solution

طبيعة الصبغة المتكونة

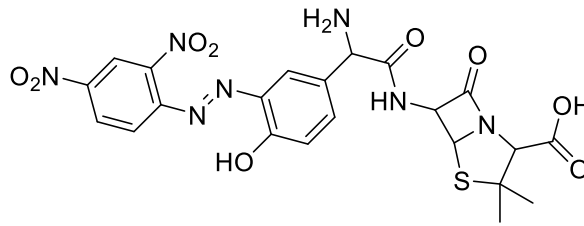
درست طبيعة الصبغة الناتجة باستخدام طريقة التغيرات المستمرة (طريقة جوب Jop)⁽²¹⁾, وأشارت النتائج بان الصبغة تكونت بنسبة 1:1 من الكاشف المؤزوت والدواء (AMOX, 2,4-DNA) والشكل (4) يبين ذلك.



الشكل 4: طريقة جوب لـ 4,2-ثنائي نيتروأنيلين المؤزوت والمقترن مع الاموكسيسيلين ثلاثي الماء

بناءً على ما استنتج من هذه الدراسة فان الصيغة الكيميائية المقترحة للصبغة المتكونة من تفاعل الكاشف المؤزوت مع

الاموكسيسيلين ثلاثي الماء ربما تكون بالشكل التالي :



وقد احتسب ثابت استقرار الصبغة الازوية الناتجة⁽²²⁾, إذ بلغت قيمته 1.767×10^5 لتر . مول⁻¹ والذي يشير الى

الاستقرارية العالية للصبغة الناتجة .

تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية

طبقت الطريقة المقترحة لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في مستحضراته (الكبسول) . وتشير النتائج في الجدول (19) الى ان الطريقة ذات صلاحية تطبيق جيدة بالمقارنة مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية المدروسة . كما تم فحص دقة الطريقة من خلال اختبار t- بمقارنة معدل الكمية المحسوبة \bar{X} وانحرافها القياسي S مع الكمية الحقيقية للدواء μ باستخدام المعادلة التالية⁽²³⁾:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\mu - \bar{X}| \times \sqrt{n}}{S}$$

اذ تم حساب قيم t_{exp} للمستحضرات الصيدلانية للاموكسيسيلين ثلاثي الماء على شكل كبسول وقد اظهرت النتائج المبينة في الجدول (19) ان قيم t العملية عند مستوى ثقة 95% ولاربع درجات حرية (خمس مكررات) اقل من قيمتها الجدولية (2.78) مما يدل على عدم وجود فرق معنوي بين القيمة الحقيقية والقيمة المقاسة للمركب الدوائي.

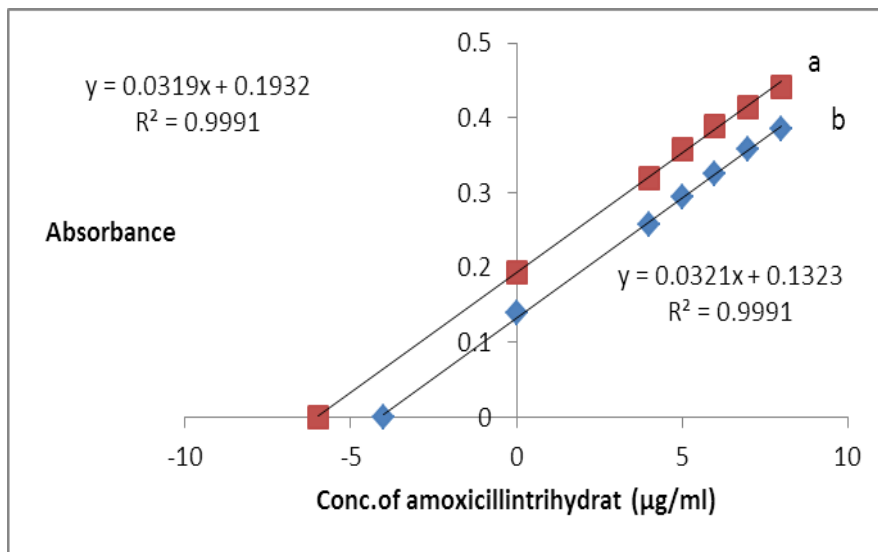
الجدول (19) تقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في المستحضرات الصيدلانية

Pharmaceutical Preparation	Certified Value(mg)	Amount Present (µg/ml)		Drug Content Found* (mg)	Recovery* %	Average Recovery %	t-test
		taken	found				
Amoxycillin capsules SDI-IRAQ	500	4	4.03	503.75	100.75	100.72	2.19
		6	6.04	503.30	100.66		
		8	8.06	503.75	100.75		
Glomox capsules UAE	500	4	4.11	513.75	102.75	101.09	2.75
		6	5.92	493.30	98.66		
		8	8.15	509.35	101.87		

*Average of five determinations

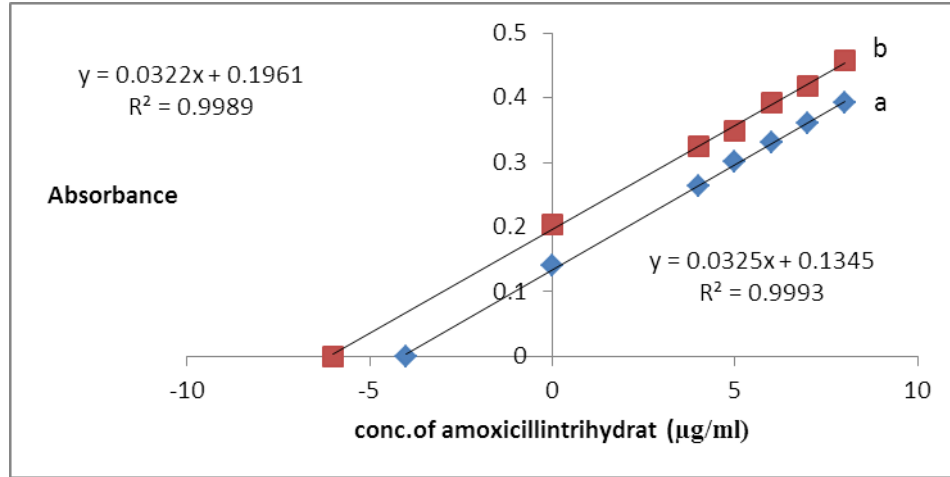
تقييم نتائج الطريقة المقترحة

لأجل اثبات كفاءة الطريقة المقترحة لتقدير دواء الاموكسيسيلين ثلاثي الماء ونجاحها في التقدير بطريقة الازوتة وخلوها من تأثير المضافات وبسبب عدم توفر متطلبات واجهزة الطريقة القياسية للدستور البريطاني⁽⁵⁾، فقد طُبقت طريقة الاضافة القياسية على تركيزين مختلفين من كلا المستحضرين (AMOXYCILLIN) و (Glomox) كما في الشكل (5) و (6) ويبين الجدول (20) ان طريقة الاضافة القياسية متفقة على نحو جيد مع الطريقة المقترحة ضمن المدى المقبول للخطأ مما يدل على ان الطريقة ذات انتقائية جيدة .



الشكل (5) منحنى الاضافة القياسي لتقدير (a = 6 , b = 4) مايكروغرام/ملتر من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في

المستحضر الصيدلاني Amoxycillin



الشكل (6) منحنى الاضافة القياسي لتقدير (a = 4 و b = 6) مايكروغرام/ملتر من الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في المستحضر الصيدلاني Glomox

الجدول (20) تقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في المستحضرات الصيدلانية بطريقة الاضافة القياسية

Pharmaceutical preparation	Certified Value(mg)	Amount Present (µg/ml)	Drug Content Found(mg)	Recovery (%)
Amoxycillin capsules	500	4	515.20	103.04
		6	504.70	100.94
Glomox capsules	500	4	517.30	103.46
		6	507.50	101.50

الاستنتاج

طورت طريقة طيفية حساسة وانتقائية لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء تعتمد على اقتران الكاشف 4،2-ثنائي نيتروأنيلين المؤزوت مع المركب الدوائي في الوسط القاعدي عند درجة حرارة 20 °م لتكوين صبغة ازوية ملونة ذائبة في الماء ومستقرة وتعطي اقصى شدة امتصاص عند الطول الموجي 555 نانوميتر ، وطبقت الطريقة بنجاح لتقدير الاموكسيسيلين ثلاثي الماء في مسحضراته الصيدلانية اذ كانت النتائج متفقة على نحو جيد مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية ومع نتائج طريقة الاضافة القياسية للطريقة المقترحة .

References

1. Wilson O.C., Ole G. and Delgado N.J. (2004).Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 11th Ebn, Lippincott Williams and Wilkns , 351 West Camden Street, Baltimore.MD21201, 310-317.
2. Broden RN. , Heel RC. , Speight TM. and Avery CS. (1979.Amoxicillin injectable: a review of its antibacterial soectrum . pharmacokinetics and therapeutics use. Drugs, 18(3), 169-184.
3. Kagan .B, (1977). Ampicillin rash.Western J.of Medicine , 126(4), 333-335.
4. Toda P.A, Benfield P, Amoxicillin/clavulanic acidn; an ubdate of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use .Drugs; 1990. 39:264-307.

5. British Pharmacopeia, (2013), CD-ROM, system simulation, the stationery office Ltd, London.
6. Sean. C, Sweet man, Martindale; The Complete Drug Reference, 33rd edition, The Pharmaceutical press. UK, 2002, 149.
7. Maryadele .J.O, Neil P. (2006), The Merck Index; Encyclopedia of chemicals, 14th edition, Merck Research Laboratories, USA, 92.
8. Othman. N and Al-Saffar S. R. (2017). "Spectrophotometric Determination of Amoxicillin by Coupling with Diazotized m-Nitroaniline", International Journal of Enhanced Research in Science, Technology and Engineering, 6(5):60-66.
9. Qader, H. A., and Fakhre, N. A. (2017). "Spectrophotometric determination of amoxicillin trihydrate in pure and pharmaceutical dosage forms". Ibn AL-Haitham Journal for Pure and Applied Science, 28(3), 142-153.
10. Antakli, S., Nejem, L., and Ahmad, W. A. (2019). "Determination of Amoxicillin Trihydrate by Analytical Spectrophotometry". Research Journal of Pharmacy and Technology, 12(6), 2716-2720.
11. Radhi, E. R. and Ali, K. J. (2019). Spectrophotometric Study for Comparison of Amoxicillin Trihydrate and Levofloxacin Hemihydrate Determination Using Bromocresol Green. International Journal of Pharmaceutical Research, 11(1):1107- 1113.
12. Kaur R., Kushwaha .J and Singh N., (2019)," Electro-Oxidation of Amoxicillin Trihydrate in Continuous Reactor by Ti/RuO₂ Anode". Sci, Total Environment , 677 : 84-97.
13. Hassouna M. and Mohamed M., (2018). "Development and Validation of RP-HPLC Method for Determination of Amoxicillin Residues and Application to NICOMAC Coating Machine". Journal of Analytical and Pharmaceutical Research, 7(5), 586-594.
14. Rajput, S., Bhamre, P., and Bambhrolia, S. (2014)., "RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Ambroxol Hydrochloride, Potassium Clavulanate and Amoxicillin Trihydrate in Bulk Drugs and Laboratory Synthetic Mixture".J . Adv. Pharm. Edu and Res. 4(2):178-185.
15. Karpova, S., and Ivashurr, M. (2014). "Quantitative Determination of Amoxicillin Trihydrate in Medical Forms Using Kinetic Method". Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 6(4), 1120-1125.
16. Farhadi .K, Ghadamgahi .S, Maleki, R .and Asgari .S, (2002)," Spectrophotometric Determination of Selected Antibiotics Using Prussian Blue Reaction", J. Chinese. Chem. Soci, 49: 993-997.
17. Amin, A. S., Moustafa, M. E., and Issa, Y. M. (1994). "Spectrophotometric Microdetermination of Ampicillin and Amoxicillin with Picric and Picramic Acids". Microchemical journal, 50(1), 6-13.
18. Saleem M. S., AL-Mtwaiti S.M. and AL-Ramadhani, T. S. (2013). "Spectrophotometric Determination of Salbutamol Sulphate by Coupling with Diazotized 2, 4-Dinitroaniline. Journal of Education and Science, 26(2), 54-64.
19. Panti M. and Neha, (2016)," Diazotization and Coupling Reaction of Differently Substituted Aromatic Amines and Investigation of Their Solvent-Chromic Behavior ", Der Chemica Sinica, 7(2): 93-100.
20. Clayden J., Greeves N., Warren S., and Wathers P.,(2001),"Organic Chemistry" ,2th Edn. Oxford uni. Press, London, pp.477.
21. Harvey D., (2000), "Modern Analytical Chemistry", Mc Graw-Hill Higher Edu. USA.
22. Haris L.G (1988), "Analytical Chemistry ", Springer-Verlag, Berlin, Germany, P .67.
23. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J. and Crouch S.R., (2004)," Fundamentals of Analytical of Analytical Chemistry", 8 Edition, Thomson Learning, USA.