Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 29, No: 3, 2020 (11-31)

Indirect Spectrophotometric Determination of Cefalexin monohydrate, Ceftriaxone Sodium and Cefotaxim Sodium in Pharmaceuticals Using N-Bromosuccinimde and Evans Blue Dye

Mohamed Th. Aghwan[1], Elham S. Salih[2]*

[1,2]Department of Chemistry, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [1]Mohamed.aghwan@gmail.com, [2*]altalibee_59@yahoo.com

(Received July 21, 2019; Accepted October 24, 2019; Available online September 01, 2020)

DOI: 10.33899/edusj.2019.125959.1009, © 2020, 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:

An indirect sensitive and selective spectrophotometric method has been developed for the determination of cephalexin monohydrate (CEM) ceftriaxone sodium (CFX) and cefotaxim sodium (CEF) in bulk and pharmaceutical formulation. The method is based on the oxidation of (CEM), (CFX) and (CEF) in hydrochloric acid medium with known excess on N-Bromosuccinimde and subsequent determination of unreacted oxidant by decolorization of Evans blue dye (EB) and measure the absorbance of residual dye at 608 nm. Calibration curves of evans blue dye in the presence of drugs were rectilinear over the ranges 1.0-9.0 , 1.0-8.0 and 1.0-9.0 µg/ml with molar absorptivity 2.75×10^4 , 9.28×10^4 and 7.81×10^4 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ and average recoveries 98.97, 102.08 and 100.08% for CEM, CFX and CEF respectively with RSD of less than 3.29%. The method was free from interference of many excipients and additives commonly found in pharmaceutical formulations. The developed method was successfully applied for determination of the studied drugs in their pharmaceutical formulation resulted in a good agreement with certified value and standard addition procedure.

Keywords: Spectrophotometry, Cefalexin, Ceftriaxone, Cefotaxim, Evans Blue Dye.

التقدير الطيفي غير المباشر للسيفالاكسين احادي هيدرات والسيفترياكسون صوديوم والسيفوتاكسيم صوديوم في المستحضرات الصيدلانية باستعمال N-بروموسكسينميد وصبغة ايفانز الزرقاء

محمد ثامر اغوان[1]، إلهام سعد الله صالح[2*]

[1و2]قسم الكيمياء، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

تم تطوير طريقة طيفية غير مباشرة حساسة وانتقائية لتقدير السيفالاكسين احادي هيدرات والسيفترياكسون صوديوم والسيفوتاكسيم صوديوم باشكالها النقية وفي المستحضرات الصيدلانية. إذ تعتمد الطريقة على اكسدة المركبات الدوائية في وسط حامض الهيدروكلوريك بزيادة محسوبة من محلول N-بروموسكسينميد ثم تقدير المتبقي من العامل المؤكسد N- بروموسكسينميد

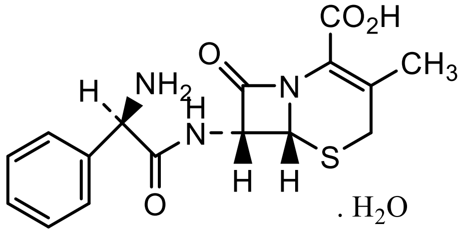
من خلال قصر لون صبغة ايفانز الزرقاء وقياس امتصاص المتبقي من صبغة ايفانز الزرقاء عند الطول الموجي 608 نانوميتر. إذ وجد أن امتصاص الصبغة يزداد خطياً مع زيادة تركيز المركبات الدوائية ضمن المدى 1.0-9.0 و 1.0-8.0 و 1.0-9.0 مايكروغرام/ مللتر بامتصاصية مولارية مقدارها 2.75×10^{4} و 9.28×10^{4} و 7.81×10^{4} لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ وبمعدل نسبة استرجاع 98.97 و 102.08 و 100.08% لكل من السيفالاكسين هيدرات والسيفترياكسون صوديوم والسيفوتاكسيم صوديوم على التوالي بانحراف قياسي نسبي اقل من 3.29%. لاتعاني الطريقة من تداخل مواد السواغ والمضافات المتواجدة المعتادة في المستحضرات الصيدلانية, وطبقت الطريقة بنجاح على المستحضرات الصيدلانية للمركبات الدوائية المدروسة، وكانت الطريقة متفقة مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية وطريقة الإضافة القياسية.

الكلمات المفتاحية: تقدير طيفي وسيفالاكسين وسيفترياكسون وسيفوتاكسيم وصبغة ايفانز الزرقاء.

المقدمة

السيفالاكسين احادي هيدرات Cefalexin monohydrate

وهو عبارة عن مشتق نصف مصنع (Semi-synthetic) من السيفالوسبورين وله فعالية مضادة للجراثيم موجبة الگرام وسالبة الگرام[1]. يستعمل على نطاق واسع في العلاج الكيميائي السريري ومضادا للجراثيم في حالات اصابات الجهاز التنفسي والبولي والجلد والتهاب الاذن الوسطى. كما يوصى للمرضى الذين قاموا باجراء عمليات استبدال المفصل وجراحات الاسنان[2]. يمتلك السيفالاكسين التركيب الكيميائي الاتي[3]:



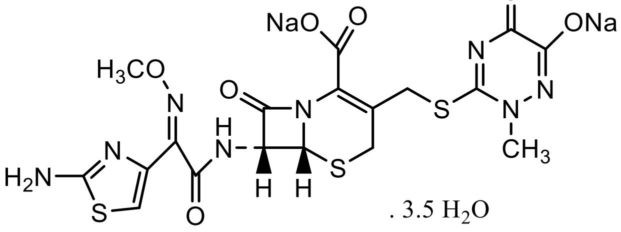
$C_{16}H_{17}N_3O_4S.H_2O$

(6*R*,7*R*)-7-[[(2*R*)-2-Amino-2-phenylacetyl]amino]-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo [4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate.

Molar mass = 365.4 g/mol

السيفترياكسون صوديوم Ceftriaxone sodium

يمثل السيفترياكسون الجيل الثالث نصف مصنع من المضاد الحيوي السيفالوسبورين[3] وتظهر فعاليته على مدى واسع من الكائنات المجهرية سالبة وموجبة الگرام. يستخدم العقار في علاج الالتهاب الرئوي والتهاب السحايا الجرثومي ومرض السيلان والالتهابات البكتيرية في الجلد او في الانسجة الرخوة مثل الخراج والدمامل, والنزلات المعوية البكتيرية والتهاب الغشاء البريتوني والتهابات الجيوب الانفية وتلوث الدم البكتيري[5,4]. يمتلك السيفترياكسون التركيب الكيميائي الاتي[3]:



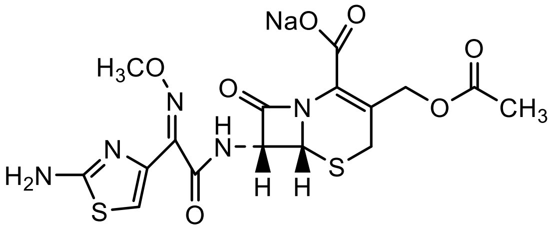
$C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3.\ 3.5H_2O$

sodium (6*R*,7*R*)-7-((*E*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)-3-(((2-methyl-6-oxido-5-oxo-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)thio)methyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

Molar mass = 662 g/mol

السيفوتاكسيم صوديوم Cefotaxime sodium

يعد السيفوتاكسيم صوديوم الجيل الثالث من المضاد الحيوي السيفالوسبورين. يستخدم بشكل رئيسي في علاج الاصابات الجرثومية للجلد والدماغ والمعدة والانسجة الرخوة والمجاري البولية والمجاري التنفسية والجيوب الانفية والاذن والتهاب العظم والمفاصل, فضلاً عن دوره في علاج السيلان والزهري وحمى التيفوئيد[7,6].ويمتلك العقار التركيب الكيميائي الاتي[3]:



$C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$

sodium (6*R*,7*R*)-3-(acetoxymethyl)-7-((*E*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

Molar mass = 477.4 g/mol

استعملت طرائق تحليلية مختلفة لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة، وفيما يأتي مراجعة لبعض هذه الطرائق.

نشرت طرائق طيفية يسيرة لتقدير كلاً من السيفالاكسين وسيفترياكسون وسيفوتاكسيم, تعتمد إما على مفاعلتها مع الكاشف الكروموجيني 2,1–نفثوكوينون–4–سلفونات (NQS) في وسط قاعدي لتكوين نواتج ذوات لون برتقالي تقاس عند اطوال موجية 475 و 480 نانوميتر[8-10], او مفاعلة نواتج تحللها القاعدي مع محلول اليودات في وسط حامضي لتحرير اليود كمياً اذ يؤكسد صبغة الفاريامين الزرقاء الى ناتج بنفسجي يقاس امتصاصه عند 556 نانوميتر[11].

امكن تقدير السيفالاكسين طيفيا وذلك اعتماداً على تكوينه معقد المزدوج الايوني مع صبغة بروموفينول الزرقاء في وسط ميثانول– اسيتونتريل[12]. أو اكسدته المباشرة مع محلول برمنكنات البوتاسيوم وقياس امتصاص المنغنات عند 610 نانوميتر[13]. أو باستعمال انظمة التفاعل N–بروموسكسينيميد–بارا–انسيدين[14] وكلوريد الحديد (III)– 10,1– فينانثرولين[15] وايون السيريوم(IV) – صبغة المثيل البرتقالي[2] والقياس عند الاطوال الموجية 522 و 510 و 570 نانوميتر على التوالي. وطبقت تقنيات الفولتامتري[16-18] و HPLC ذو الطور العكوس المقترن بمكشاف UV [20,19] وتقنية كروماتوكراف الصفائح الرقيقة [21]لتحليل السيفالاكسين في المستحضرات الصيدلانية.

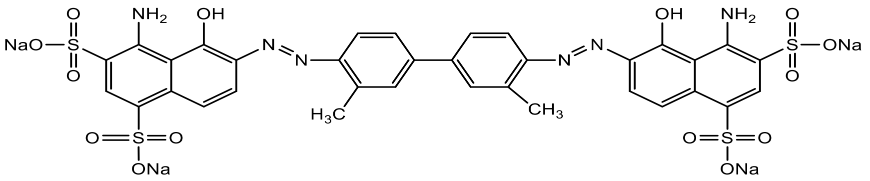
وصفت تفاعلات الازوته والاقتران في التقدير الطيفي للسيفترياكسون صوديوم في وذلك إما من خلال ازوتته واقترانه مع β– نفثول[22]. أو 3–امينوفينول في وسط قاعدي لتكوين صبغتي الازو تقاس امتصاصها عند 510 و 500 نانوميتر على التوالي[23]. وطبقت انظمة التفاعل 2,2'–ثنائي بريديل –كلوريد الحديد(III)[24]. و $K_3[Fe(CN)_6]/FeCl_3$ [25]. و–N–بروموسكسينميد-صبغة الرودامين–B [26] في التقدير الطيفي غير المباشر للسيفترياكسون صوديوم. كما امكن تحليل المركب الدوائي في عينات مختلفة بتطبيق تقنيات البريق الكيميائي–الحقن الجرياني[27] وفولتامتري النبضي التفاضلي والحلقي[28] والهجرة الكهربائية–المنطقة الشعرية[29] وHPLC ذو الطور العكوس المقترن بمكشاف UV[31,30] او HPLC– المزدوج الايوني[32].

وقدرت كميات مايكروغرامية من سيفوتاكسيم الصوديوم طيفياً في مستحضراته الصيدلانية اعتماداً على تكوينه إما معقدات الشحنة المنتقلة نوع n-σ مع محلول اليود في وسط ثنائي كلوروميثان ونوع n-π مع المستقبلات حامض الكلورانيليك وDDQ وTCNQ في وسط الاسيتونتريل[33] أو معقد المزدوج الايوني مع صبغة ايروكروم–T الاسود واستخلاصه الى طبقة الكلوروفورم[34]. وقدر العقار تفلورياً من خلال اخماده لتفلور صبغة 7,2- ثنائي كلورو فلوريسين أو تعكيرياً بالاقتران مع الحقن

الجرياني بتفاعله مع $K_3[Fe(CN)_6]$ لتكوين راسب معقد المزدوج الايوني[35] ونجحت تقنيات فولتامتري الحلقي والخطي[36] وطبقت تقنية HPLC المقترن بمكشاف UV[38,37] او مطياف الكتلة[39] في تحليل المركب الدوائي في المستحضرات الصيدلانية والعينات الحيوية.

صبغة الايفانز الزرقاء Evans blue dye

الايفانز الزرقاء هي صبغة ازوية وتدعى ايضا Direct blue 53 تكون بشكل مسحوق ازرق غامق وذات درجة ذوبان عالية في الماء ولها امتصاصية قصوى عند 610 نانوميتر. تمتلك الصبغة التركيب الكيميائي الاتي[40]:



tetrasodium (6E,6'E)-6,6-[(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-diyl)di(1E)hydrazin-2-yl-1-ylidene]bis(4-amino-5-oxo-5,6-(dihydronaphthalene-1,3-disulfonate

Molar mass = 960.81 g/mol

إن لصبغة ايفانز الزرقاء تاريخ طويل باعتبارها صبغة حيوية وعامل تشخيصي سريري منذ استخدامها لاول مرة في عام 1914م من قبل عالم التشريح Herbert McLean Evans. وبسبب ذوبانها العالي في الماء, وبطء طرحها خارج الجسم وارتباطها الوثيق بزلال المصل (البومين المصل) فانها استعملت على نطاق واسع في مجال الطب الحياتي عند تقدير حجم الدم (Blood volume), وتقييم نضوحية الاوعية الدموية (Vascular permeability) للجزيئات الكبيرة, وفي الكشف عن العقد اللمفاوية, وتحديد مواقع اصابات الاورام[41]. وان لصبغة الايفانز الزرقاء ميل للخلايا الميتة او المصابة بالنخر (Necrosis) وذلك لان الزلال المرتبط بصبغة الايفانز الزرقاء يدخل الى الخلايا التالفة ولايخترق الخلايا السليمة , ويبقى داخل الخلايا التالفة, لذا يمكن استخدام الصبغة في تقييم حيوية الانسجة[42].

استخدمت صبغة الايفانز الزرقاء بوصفها كاشفاً كروموجينياً في تطوير طرائق لونية يسيرة وسريعة وحساسة في التقدير المباشر للعديد من المركبات الدوائية بهيئتها النقية وفي مستحضراتها الصيدلانية وذلك بتكوينها معقدات المزدوج الايوني مع المركب الدوائي, إذ امكن تقدير المضادات الحيوية امينوكليكوزيد (Aminoglycoside antibiotics) والمتمثلة بكبريتات نيوميسين وكاناميسين والجنتاميسين وثوبراميسين وذلك إما بقياس امتصاصات المزدوجات الايونية المتكونة في وسط منظم دالته الحامضية 7-2 عند اطوال الموجية تراوحت بين 672 و 676 او قياس النقصان بامتصاص صبغة الايفانز الزرقاء عند 620 نانوميتر الذي يتناسب خطياً مع زيادة تراكيز المركبات[43].

كما امكن تقدير العقار رالوكسيفين (Raloxifene) بمفاعلته مع صبغة الايفانز الزرقاء في وسط محلول خلات الصوديوم–حامض الهيدروكلوريك المنظم (pH 1.4-2.5) وتكوين معقد المزدوج الايوني[44].

ونظراً لاهمية الصبغة ووفرتها وعدم وجود طرائق طيفية تعتمد في تقدير المركبات الدوائية على استعمال نظام التفاعل صبغة الايفانز الزرقاء–العامل المؤكسد لذا يهدف البحث الى استحداث طريقة يسيرة ودقيقة وحساسة لتقدير عدد من مضادات الحيوية السيفالوسبورين بهيئاتها النقية وفي المستحضرات الصيدلانية.

الجزء العملي

الأجهزة المستعملة

تم اجراء قياسات الامتصاص ورسم اطياف الامتصاص بوساطة جهاز المطياف مزدوج الحزمة نوع Shimadzu UV-1800 PC, UV-Visible double-Spectrophotometer باستخدام خلايا الكوارتز ذات السمك 1سم .

قيست الدالة الحامضية باستخدام جهاز الدالة الحامضية نوع Thermo RL 060P Electron Company-Singapore مرتبط بقطب مجهز من الشركة ذاتها. واجريت عملية الوزن باستخدام ميزان حساس نوع KERN ABS-Germany. تمت عمليات التسخين بوساطة حمام مائي نوع BS-11 من شركة Lab Companion-Korea . واجريت عمليات الاذابة باستخدام جهاز Ultrasonic Cleaner للرج بالموجات فوق الصوتية نوع Power Sonic 405 مجهز من شركة Lab Tech-Korea.

الكواشف والمواد الكيميائية المستخدمة

محاليل المواد المستعملة

1- محاليل السيفالاكسين احادي هيدرات والسيفترياكسون صوديوم والسيفوتاكسيم صوديوم تحضر المحاليل بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر وذلك باذابة 0.0100 غرام من المركبات الدوائية قيد الدراسة بصيغتها النقية في 200 مللتر من الماء المقطر وللتأكد من اتمام الاذابة توضع القناني الحجمية في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة 5 دقائق وتحفظ المحاليل في الثلاجة وتبقى مستقرة لمدة اسبوع.

2- محلول N-بروموسكسينميد يحضر بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر باذابة 0.0100 غرام من المركب في 100 مللتر من الماء المقطر ويبقى مستقراً لمدة اسبوع واحد في الثلاجة.

3- محلول الكلورامين-T يحضر بتركيز 200 مايكروغرام/مللتر باذابة 0.0200 غرام من المركب في 100 مللتر من الماء المقطر يحفظ في الثلاجة ويبقى مستقراً لمدة اسبوع واحد.

4- محلول برومات- بروميد يحضر محلول اولي بتركيز 0.002 مولاري برومات البوتاسيوم مع 0.02 مولاري بروميد البوتاسيوم وذلك باذابة 0.0334 غرام من برومات البوتاسيوم و 0.2380 غرام من بروميد البوتاسيوم في 100 مللتر ماء مقطر ليكون تركيز المحلول الاولي 334 مايكروغرام/مللتر من برومات البوتاسيوم ومنه يحضر محلول بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر ويبقى مستقراً لمدة اسبوع واحد.

5- محلول صبغة ايفانز الزرقاء يحضر المحلول بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر باذابة 0.025 غرام من الصبغة في 250 مللتر ماء مقطر ولضمان الاذابة التامة للصبغة توضع القنينة الحجمية في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة 5 دقائق ويحفظ المحلول في قنينة معتمة ويبقى مستقراً لمدة شهر.

6- محلول حامض الهيدروكلوريك يحضر محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2 مولاري بتخفيف 50 مللتر من الحامض المركز (10 مولاري) بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 250 مللتر.

7- محاليل المتداخلات تحضر بتركيز 1000 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.1000 غرام منها في 100 مللتر من الماء المقطر.

طريقة العمل

اضيفت الى مجموعة من قنان حجمية سعة 10 مللتر حجوم متزايدة (مللترات) من محاليل المركبات الدوائية المدروسة بتركيزي 10 و 50 مايكروغرام/مللتر لتغطية مديات التركيز 1.0-9.0 و 1.0-8.0 و1.0-9.0 مايكروغرام/مللتر لكل من السيفالاكسين هيدرات والسيفترياكسون والسيفوتاكسيم صوديوم على التوالي والكميات المثالية من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2 مولاري يليه اضافة 1.2 مللتر من N- بروموسكسينميد (100 ماكروغرام/مللتر) وتترك المحاليل لمدة 10 دقائق مع الرج, ثم يتبعها اضافة 2.5 مللتر من محلول صبغة ايفانز الزرقاء بتركيز (100 مايكروغرام/مللتر) واكمال الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة. وتقاس امتصاصات المحاليل عند الطول الموجي 608 نانوميتر مقابل محاليلها الصورية بعد 5 دقائق عند درجة حرارة الغرفة.

تحليل كبسول السيفالاكسين احادي هيدرات

وزن محتوى 10 كبسولات بدقة من كل مستحضر دوائي (Cefex Capsules Micro Labs Limited India و Cephadar Forte Capsules Dar Al Dawa , Na'ur – Jordan) وبعد طحنها ومزجها جيداً وزن ما يكافئ كبسولة واحدة (500 ملغرام من السيفالاكسين) ثم اذيب بالماء المقطر واكمل الحجم الى حد العلامة في قنينة حجمية سعتها 500 مللتر. رشح المحلول بعد الرج في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة 5 دقائق ليتم الحصول على محلول تركيزه 1000 مايكروغرام/مللتر يحضر منه محلول من السيفالاكسين تركيزه 50 مايكروغرام/مللتر وأخذت منه كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة. وتم إيجاد تركيز السيفالاكسين في قرص كل مستحضر دوائي من المنحني القياسي للسيفالاكسين بصيغته النقية.

تحليل حقن السيفترياكسون صوديوم

مزجت محتويات ثلاث حقن (تحتوي كل حقنة على 1.0 غرام من السيفترياكسون) لكل من المستحضرين الدوائيين (Ceftriaxone Laboratorios Torlan, S.A.Ctra Barcelona Spain و Triaxone Tabuk Pharmaceutical Saudi Arabia) ثم وزن بدقة مايعادل حقنة واحدة اذيب واكمل الحجم بالماء المقطر الى 500 مللتر في قنينة حجمية ترج في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لاتمام الاذابة, ثم رشح المحلول للحصول على السيفترياكسون بتركيز 2000 مايكروغرام/مللتر ثم حضر منه محلول بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر وأخذت منه كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة. وتم إيجاد تركيز السيفترياكسون صوديوم في كل مستحضر دوائي من المنحني القياسي للسيفترياكسون بصيغته النقية.

تحليل حقن السيفوتاكسيم صوديوم

تم مزج محتويات ثلاث حقن لكل من الانموذجين الدوائيين(Brucitaz Brawn laboratories limited India و Deforan Deva Holding A,S Turkey) ووزن مايكافئ حقنة واحدة (1.0 غرام من السيفوتاكسيم) اذيب بالماء المقطر واكمل الحجم الى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 500 مللتر, ثم رشح المحلول بعد الرج بالموجات فوق الصوتية للحصول على التركيز 2000 مايكروغرام/مللتر وحضر منه محلول بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر وأخذت منه كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة. وتم ايجاد تركيز السيفوتاكسيم باستعمال المنحنى القياسي للمركب الدوائي بصيغته النقية.

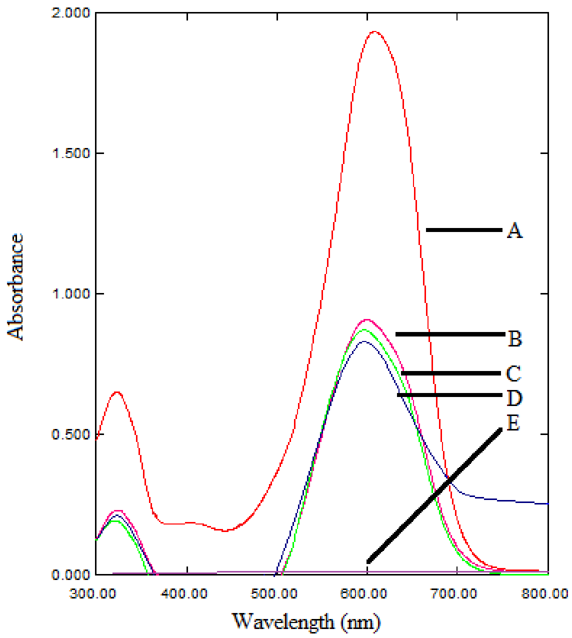
النتائج والمناقشة

الدراسة التمهيدية وطيف امتصاص صبغة ايفانز الزرقاء

بغية تطوير طريقة طيفية يسيرة وحساسة لتقدير المركبات الدوائية المدروسة اجريت تجارب اولية لبيان امكانية استخدام صبغة ايفانز الزرقاء في التقدير, فقد تمت اولاً دراسة طيف امتصاص محلول صبغة ايفانز الزرقاء في وسط حامض الهيدروكلوريك عند مدى اطوال موجية بين 380 و800 نانوميتر فوجد من الشكل1 ان الصبغة تعطي اقصى امتصاص عند 608 نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

وثانيا وجد تجريبياً حدوث اكسدة كمية لصبغة ايفانز الزرقاء بوساطة كميات مايكروغرامية من محاليل العوامل المؤكسدة (المتمثلة بكلورامين– T و N– بروموسكسينميد و برومات –بروميد) في وسط حامض الهيدروكلوريك, اذ انخفضت امتصاصية الصبغة بزيادة تركيز العامل المؤكسد وذلك من خلال قصر لونها. وبالاعتماد على هذه الخصيصة درس امكانية التقدير الطيفي

غير المباشر للمركبات الدوائية المدروسة (السيفالاكسين والسيفترياكسون والسيفوتاكسيم) إذ تمت اكسدة كميات مايكروغرامية من المركبات قيد الدراسة في قنان حجمية سعة 10 مللتر مع زيادة محسوبة من العوامل المؤكسدة التي تحدث قصر للصبغة في وسط حامض الهيدروكلوريك. وتركت المحاليل 5 دقائق مع الرج بدرجة حرارة الغرفة, واضيفت بعدها كمية ثابتة من صبغة ايفانز الزرقاء واكمل الحجم بالماء المقطر. فقد اشارت النتائج المستحصل عليها حدوث زيادة خطية في طيف امتصاص الصبغة عند 608 نانوميتر بزيادة تركيز المركب الدوائي, او بمعنى اخر ان تركيز العامل المؤكسد يقل بزيادة تركيز المركب الدوائي مؤديا الى ظهور امتصاص اعلى للصبغة وهذا يشير الى امكانية استخدام صبغة ايفانز الزرقاء كاشفا كروموجينيا في تقدير المركبات الدوائية طيفيا, الشكل 1.



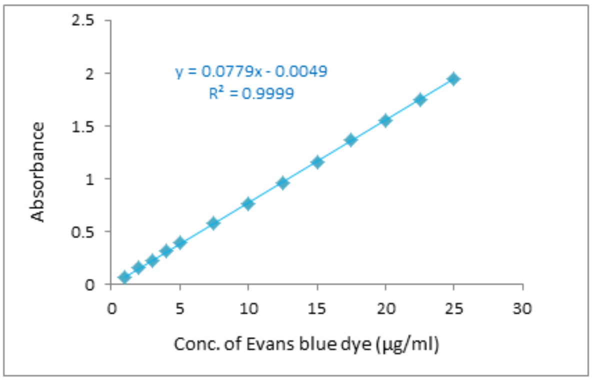
الشكل 1: اطياف امتصاص صبغة ايفانز الزرقاء (25 مايكروغرام/مللتر) في وسط حامضي (A), وعند تقدير السيفالكسين (8 مايكروغرام/مللتر) بوجود , N– بروموسكسينميد (B), كلورامين –T (C) برومات – بروميد (D), مقابل محاليلها الصورية, المحلول الصوري مقابل الماء المقطر (E)

ضبط الظروف المثلى لتقدير المركبات الدوائية

أجريت التجارب التالية في قنانٍ حجمية سعة 10 مللتر بوجود 1.6 مللتر بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر من محاليل المركبات الدوائية (السيفالاكسين والسيفترياكسون والسيفوتاكسيم) يتبعها اضافة الكميات المناسبة من الحامض والعامل المؤكسد والصبغة وقياس امتصاص صبغة ايفانز الزرقاء عند 608 نانوميتر.

2 دراسة كمية صبغة ايفانز الزرقاء

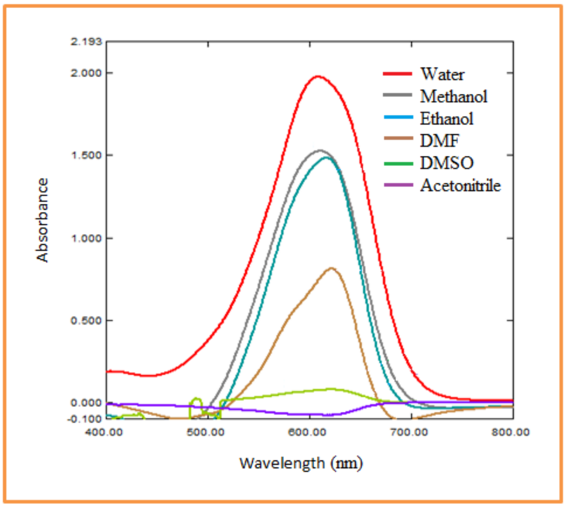
لتحديد الكمية المثلى من صبغة ايفانز الزرقاء التي يمكن استخدامها في تقدير المركبات الدوائية المدروسة والتي تطيع قانون بير اضيفت حجوم متزايدة (0.1-2.5 مللتر) من محلول الصبغة بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر الى قنان حجمية سعة 10 مللتر تحتوي على 1.0 مللتر من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2 مولاري واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة وقيس الامتصاص عند 608 نانوميتر, فوجد من النتائج المبينة في الشكل 2 ان مدى التركيز الخطي لصبغة ايفانز الزرقاء 0.1-25 مايكروغرام/مللتر وعليه ثبت التركيز 25 مايكروغرام/مللتر للتقدير في الدراسات اللاحقة.



الشكل 2: المنحنى القياسي لصبغة ايفانز الزرقاء

تاثير نوع المذيب في امتصاص صبغة ايفانز الزرقاء

من اجل الحصول على افضل مذيب يعطي اقصى امتصاص لصبغة ايفانز الزرقاء, فقد تم دراسة تاثيره على كل من ذوبانية الصبغة والتخفيف باستخدام مذيبات مختلفة قابلة للامتزاج مع الماء والمتمثلة بالايثانول والميثانول و DMF و DMSO و الاسيتونتريل فضلاً عن الماء وذلك باضافة 2.5 مللتر من محلول صبغة ايفانز الزرقاء بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر الى قنان حجمية 10 مللتر تحتوي على 1.0 مللتر حامض الهيدروكلوريك (2 مولاري) و 3.5 مللتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى حد العلامة بالمذيب وقيست امتصاصات المحاليل مقابل محاليلها الصورية. وتبين من النتائج التي تم الحصول عليها من الشكل 3 أن الاذابة والتخفيف بالماء المقطر أعطى اقصى امتصاص للصبغة لذلك تم اعتماده في الدراسات اللاحقة.

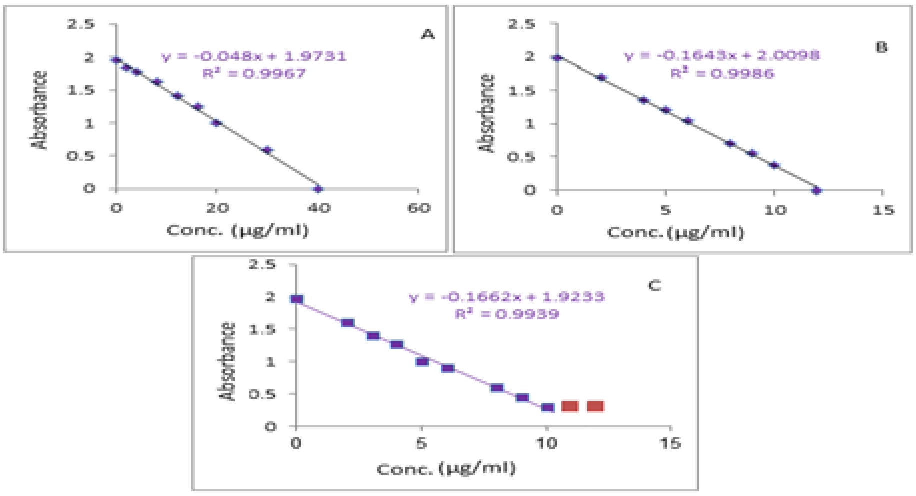


الشكل 3: اطياف امتصاص صبغة ايفانز الزرقاء (25 مايكروغرام/مللتر)

تاثير كمية العامل المؤكسد في قصر لون صبغة ايفانز الزرقاء

أُجريت هذه الدراسة لتحديد الكمية المثلى من العوامل المؤكسدة واللازمة لقصر لون صبغة ايفانز الزرقاء تركيزها 25 مايكروغرام/مللتر وذلك اعتماداً على مفاعلتها مع كميات مايكروغرامية من محاليل كلورامين– T بتركيز (200 مايكروغرام/مللتر) و N– بروموسكسينميد و بروموات – بروميد كل منهما بتركيز (100 مايكروغرام/مللتر) وقياس الامتصاصات بعد 5 دقائق من التخفيف بالماء المقطر الى حد العلامة. وتم الاستدلال من المنحنيات القياسية في الشكل 4 ان التراكيز المثلى التي تطيع قانون بير واللازمة لقصر صبغة ايفانز الزرقاء لكل من محاليل

كلورامين- T و N- بروموسكسينميد و برومات- بروميد كانت 40 و 12 و10 مايكروغرام/مللتر على التوالي وعليه اعتمدت في الدراسات اللاحقة لاكسدة المركبات الدوائية المدروسة.



الشكل 4: المنحنيات القياسية لاختيار كمية العامل المؤكسد في قصر 25 مايكروغرام/مللتر من صبغة ايفانز الزرقاء في الوسط الحامضي.

A: كلورامين- T ، B: N-بروموسكسينميد ، C: برومات – بروميد

اختيار العامل المؤكسد للمركبات الدوائية المدروسة

تمت دراسة تاثير العوامل المؤكسدة كلورامين- T وN- بروموسكسينميد وبرومات- بروميد بكمياتها المحسوبة كلا على انفراد في اكسدة كميات مايكروغرامية متزايدة من المركبات الدوائية قيد الدراسة في وسط حامض الهيدروكلوريك اذ تم الاستدلال من النتائج المدرجة في الجدول 1 ان N- بروموسكسينميد هو الافضل اذ اعطى اعلى قيم للحساسة وافضل مديات للتقدير كما ان معامل الارتباط كان ممتازا وعليه اعتمد في الدراسات اللاحقة.

الجدول 1: اختيار العامل المؤكسد لتقدير المركبات الدوائية المدروسة

Drug	Parameter	Oxidizing agent (µg/ml)		
		Chloramin-T (40µg/ml)	N-bromosuccinimide (12µg/ml)	Bromate – bromide (10µg/ml)
Cefalexin monohydrate	Linearity range (µg/ml)	3.0-11.0	1.0-9.0	2.0-7.0
	Ɛ max ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	1.9×10^4	2.7×10^4	2.4×10^4
	R^2	0.9998	0.9995	0.9970
Ceftriaxone sodium	Linearity range (µg/ml)	1.0-5.0	1.0-8.0	2.5-9.0
	Ɛ max ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	8.8×10^4	9.2×10^4	6.6×10^4
	R^2	0.9930	0.9993	0.9960
Cefotaxime sodium	Linearity range (µg/ml)	4.5-10.0	1.0-9.0	1.0-6.0
	Ɛ max ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	5.7×10^4	7.8×10^4	4.8×10^4
	R^2	0.9992	0.9997	0.9970

اختيار الحامض المناسب

اثبتت النتائج العملية التي اجريت ان أكسدة صبغة ايفانز الزرقاء والمركبات الدوائية المدروسة بوساطة N− بروموسكسينميد بتركيز (12 مايكروغرام/مللتر) يسري في الوسط الحامضي, لذا تم دراسة تاثير حوامض مختلفة في التقدير. وتشير النتائج في الجدول ان التركيز 2 مولاري اعطى اعلى امتصاص لذلك تم استعماله في تفاعل الاكسدة للصبغة والمركبات الدوائية وذلك بالحصول على اعلى امتصاص, وعليه اعتمد في الدراسات اللاحقة.

الجدول 2: اختيار الحامض المناسب وسطاً في تقدير المركبات الدوائية

Drug (8 µg/ml)	Absorbance*				
	HCl	H_2SO_4	H_3PO_4	HNO_3	CH_3COOH
Cefalexin monohydrate	0.681	0.431	0.094	0.080	0.031
Ceftriaxone sodium	1.101	0.347	0.146	0.124	0.025
Cefotaxime sodium	1.183	0.541	0.130	0.154	0.027

***1.0ml of 2M acid added**

تاثير كمية حامض الهيدروكلوريك

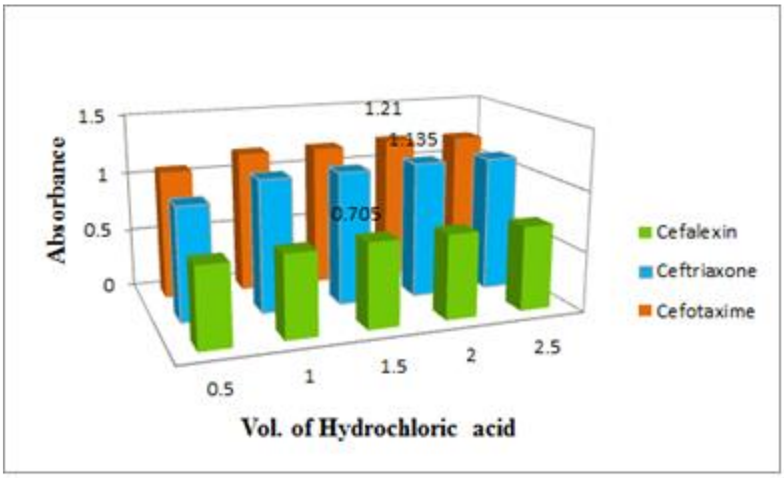
تم الاستدلال من الدراسة في الجدول 3 والتي اجريت لتثبيت تركيز حامض الهيدروكلوريك بالاعتماد على اضافة 1.0 مللتر من الحامض ضمن مدى التراكيز 0.5-5.0 مولاري, ان التركيز 2 مولاري هو الانسب في تقدير جميع المركبات الدوائية المدروسة.

الجدول 3: تاثير تركيز حامض الهيدروكلوريك في التقدير

Molarity of HCl*	Absorbance/ 8µg/ml drug		
	Cefalexin monohydrate	Ceftriaxone sodium	Cefotaxime sodium
0.5	0.581	0.934	0.974
1	0.662	0.942	1.074
2	0.683	1.102	1.188
3	0.680	1.100	1.186
4	0.680	1.099	1.185
5	0.682	1.099	1.182

***1.0ml of (X) MHCl**

كما اجريت دراسة لبيان تاثير حجوم متزايدة (0.5-2.5 مللتر) من محلول حامض الهيدروكلوريك (2 مولاري), اذ اشارت النتائج المستحصلة في الشكل5 ان الحجوم المثلى المعتمدة في الدراسات اللاحقة هي 1.5 مللتر عند تقدير السيفالاكسين و2.0 مللتر عند تقدير السيفترياكسون والسيفوتاكسيم.



الشكل 5: تاثير كمية حامض الهيدروكلوريك في تقدير المركبات الدوائية المدروسة

تأثير الزمن في أكسدة المركبات الدوائية

حُدد في هذه الدراسة الزمن اللازم لأكسدة المركبات الدوائية المدروسة وصبغة ايفانز الزرقاء والصبغة عند درجات حرارة الغرفة، إذ يبين الجدول 4 أن 10 دقائق فترة زمنية كافية لأكسدة السيفالاكسين بوصفه أنموذجاً، و5 دقائق لأكسدة صبغة ايفانز الزرقاء، وهذه الأزمنة مناسبة لأكسدة وتقدير السيفترياكسون والسيفوتاكسيم صوديوم.

الجدول 4: تأثير الزمن في أكسدة السيفالاكسين (8 مايكروغرام/ مللتر) بوصفه أنموذجاً

Standing time before adding EB & dilution (min)	Absorbance/ standing time after adding EB & dilution (min)								
	5	10	20	30	40	50	60	120	Over night
After addition	0.584	0.584	0.585	0.589	0.591	0.592	0.593	0.597	0.583
5	0.641	0.639	0.640	0.641	0.641	0.640	0.639	0.637	0.639
10	0.767	0.765	0.766	0.765	0.764	0.764	0.765	0.765	0.763
15	0.742	0.741	0.741	0.742	0.743	0.740	0.740	0.738	0.740
20	0.732	0.731	0.729	0.728	0.728	0.729	0.728	0.727	0.725

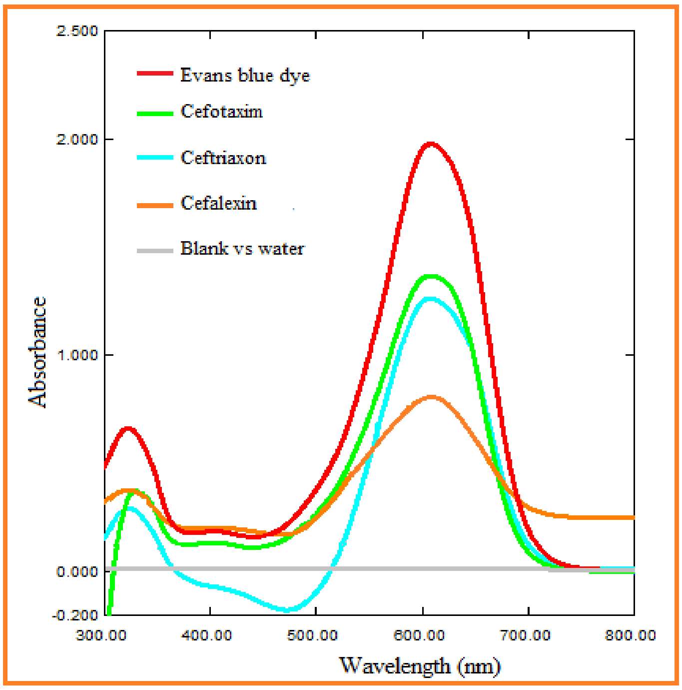
تاثير تسلسل الاضافة

تشير النتائج المستحصلة عملياً ان التسلسل المتبع في تثبيت الظروف المثلى للمركبات الدوائية ملائم في التقدير , وان حدوث اي تغير في تسلسل الاضافة يؤثر سلبا على التقدير.

السيفالاكسين (S) + الوسط الحامضي (A) + N− بروموسكسينميد (NBS) + صبغة ايفانز الزرقاء (EB)

طيف الامتصاص النهائي

رُسمت اطياف الامتصاص النهائية لتقدير المركبات الدوائية المدروسة بعد تثبيت الظروف المثلى للتفاعل وذلك بإضافة الكميات المثلى من محاليل العامل المؤكسد والحامض وصبغة ايفانز الزرقاء في قناني حجمية 10 مللتر وقياس الامتصاصات عند 608 نانوميتر كما مبين في الشكل 6.



الشكل 6: أطياف الامتصاص لمحلول صبغة ايفانز الزرقاء (25 مايكروغرام/مللتر) لوحدها أو بوجود (8 مايكروغرام/مللتر) من الأدوية المقدرة في وسط التفاعل

القيم الاحصائية وحساسية الطريقة المقترحة

من خلال رسم المنحنيات القياسية لتقدير السيفالاكسين احادي هيدرات والسيفترياكسون صوديوم والسيفوتاكسيم صوديوم (شكل 7) تم الحصول في الجدول 5 على القيم التحليلية والاحصائية والامتصاصية المولارية ودلالة ساندل، فضلاً عن قيم حدود الكشف والتقدير الكمي التي حسبت بأخذ عشرة مكررات لاقل تركيز وقياس الامتصاص مقابل الماء المقطر وتطبيق المعادلات الاتية[45]

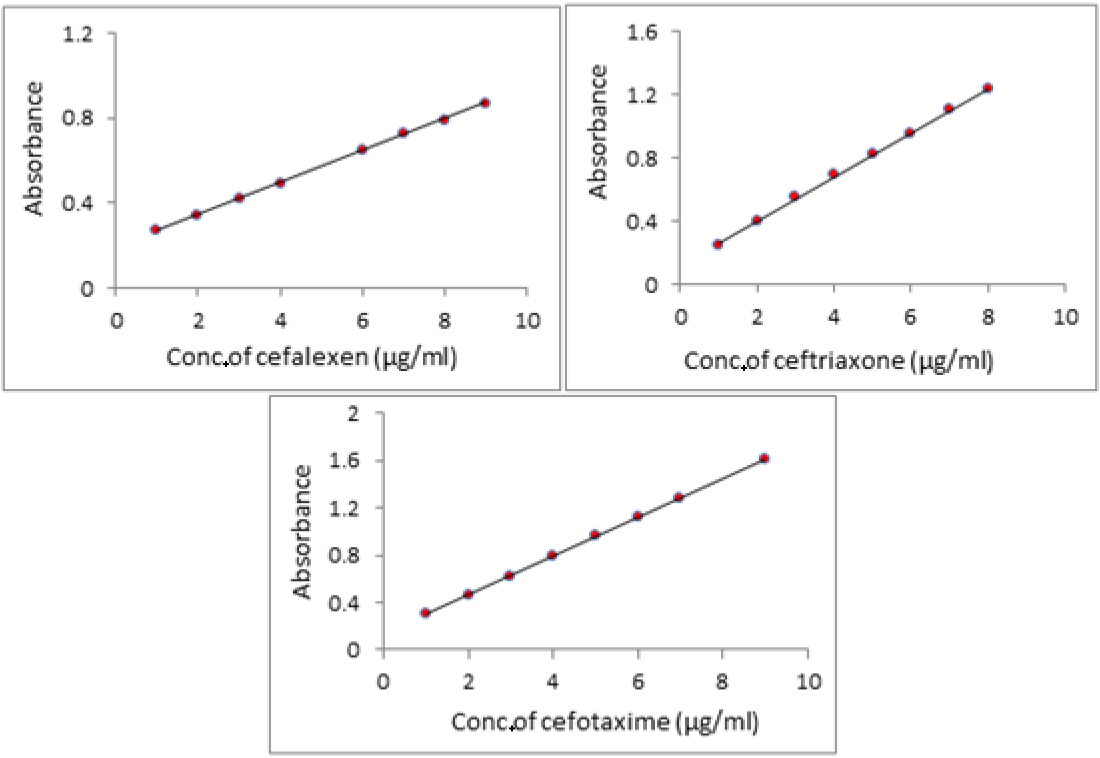
$$LOD = \frac{3\sigma C_{low}}{\bar{X}} \quad , \quad LOQ = \frac{10\sigma C_{low}}{\bar{X}}$$

إذ ان:

σ: الانحراف القياسي النسبي لامتصاص اقل تركيز

C_{low}: اقل تركيز

$\bar{X}$: معدل امتصاص اقل تركيز



الشكل 7: المنحنيات القياسية لتقدير المركبات الدوائية

الجدول 5: القيم التحليلية الاحصائية للمنحنيات القياسية والامتصاصية المولارية وحدود الكشف والتقدير الكمي في تقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة

Parameter	Cefalexin	Ceftriaxone	Cefotaxime
Linearity range(µg/ml)	1.0-9.0	1.0-8.0	1.0-9.0
Intercept	0.1927	0.1193	0.1373
Slope	0.0753	0.1402	0.1637
Correlation coefficient (R^2)	0.9995	0.9993	0.9997
Standard deviation of the intercept	0.0037	0.0074	0.0056
Standard deviation of the slope	0.0006	0.0014	0.0010
Molar absorptivity ($l.mol^{-1}.cm$)	2.75×10^4	9.28×10^4	7.81×10^4
Sandell Sensitivity (ng/cm^2)	13.29	7.06	6.11
LOD*(µg/ml)	0.023	0.019	0.014
LOQ*(µg/ml)	0.079	0.063	0.047

*Average of ten determinations of C_{low} of drug

دقة الطريقة وتوافقها

اختبرت دقة الطريقة وتوافقها بحساب نسب الاسترجاع والانحراف القياسي النسبي لأربعة تراكيز مختلفة لكل مركب دوائي ودونت النتائج في الجدول6 التي تشير إلى دقة الطريقة وتوافقها.

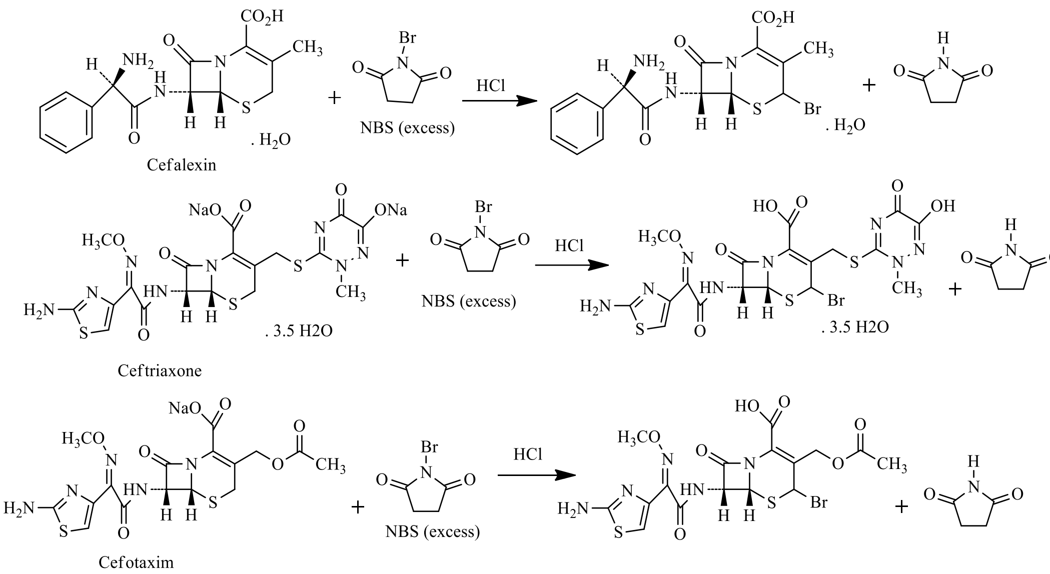
الجدول 6: دقة الطريقة وتوافقها لتقدير المركبات الدوائية

Drug	Conc of drug (µg/ml)		Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
	Taken	Found			
Cefalexin monohydrate	2	1.95	97.50	98.97	2.18
	4	3.95	98.75		1.22
	6	6.04	100.66		3.29
Ceftriaxon sodium	2	1.99	99.50	102.08	1.50
	4	4.09	102.25		2.29
	6	6.27	104.50		1.27
Cefotaxime sodium	2	1.96	98.00	100.08	2.12
	4	4.01	100.25		2.07
	6	6.12	102.00		3.08

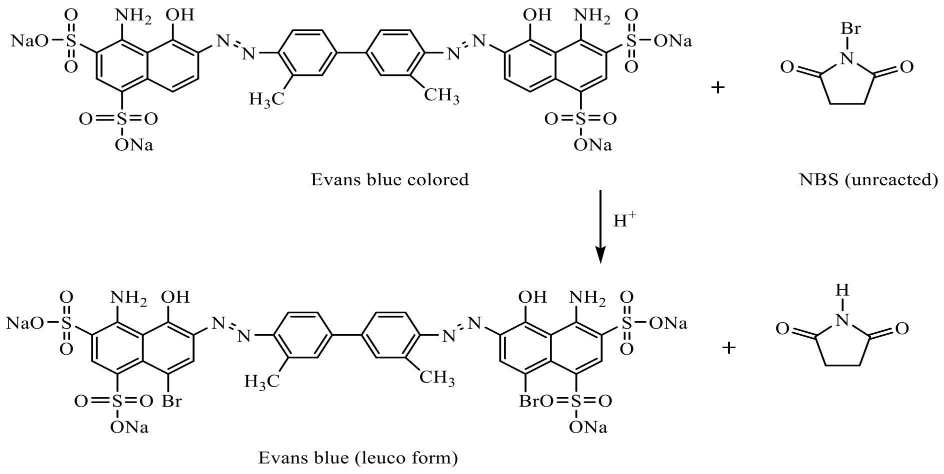
*Average of six determinations.

التفاعل الكيميائي المقترح

استناداً الى ميكانيكية التفاعلات والدراسات الحركية المنشورة في الادبيات العلمية فان N–بروموسكسينميد يعد عاملاً مؤكسداً وكاشف برومة (Bromonation agent) في الوسط الحامضي للمركبات العضوية الاليفاتية والاروماتية[46], لذا افترضت حدوث برومة للمركبات الدوائية المدروسة السيفالاكسين والسيفترياكسون والسيفوتاكسيم (السيفالوسبورينات) (مخطط 1) بواسطة كمية محسوبة من N–بروموسكسينميد في وسط حامض الهيدروكلوريك ليتبعها تقدير الكمية المتبقية من محلول العامل المؤكسد من خلال اكسدة صبغة الايفانز الزرقاء وقصر لونها وقياس امتصاص المتبقي من الصبغة عند الطول الموجي 608 نانوميتر والذي يتناسب خطياً مع تراكيز المركبات الدوائية المدروسة (مخطط 2)



(المخطط 1)



(المخطط 2)

تأثير المتداخلات

درس تاثير بعض مواد السّواغ والمضافات الدوائية والاملاح بهدف امكانية تطبيق الطريقة الطيفية المطورة على المستحضرات الصيدلانية. وتبين من الجدول7 انتقائية الطريقة في تقدير السيفالاكسين بوصفه انموذجاً لبقية المركبات الدوائية المدروسة وملاءمة تطبيقها على المستحضرات الصيدلانية لعدم حدوث تداخل يمكن ان تحدثه هذه المواد على اعتبار ان نسبة الخطأ النسبي المسموح بها ±5 % .

الجدول 7: تأثير المتداخلات

Foreign compound	Recovery (%) of 80 µg Cefalexin per µg of foreign compound added			
	100	250	500	1000
Glucose	101.43	101.98	102.27	103.51
Fructose	100.75	101.10	102.51	103.28
Lactose	99.53	100.63	101.98	102.51
Sucrose	98.67	99.11	99.90	101.32
Accacia	100.37	100.95	101.47	102.95
Saccharin	98.56	100.27	101.18	102.95
Starch	100.25	101.71	102.11	104.48
Sodium chloride	97,32	99.97	101.30	102.89
Potassium chloride	99.67	101.01	102.28	102.91
Magnesium carbonate	100.30	101.19	101.78	103.61

تطبيق الطريقة المطورة على المستحضرات الصيدلانية

طبقت الطريقة المطورة لتقدير المركبات الدوائية (السيفالاكسين احادي هيدرت والسيفترياكسون صوديوم والسيفوتاكسيم صوديوم) في مستحضراتها الصيدلانية والتي كانت بشكل كبسولات وحقن والمصنعة من مناشئ مختلفة كما مشار اليها في الجدول 8.

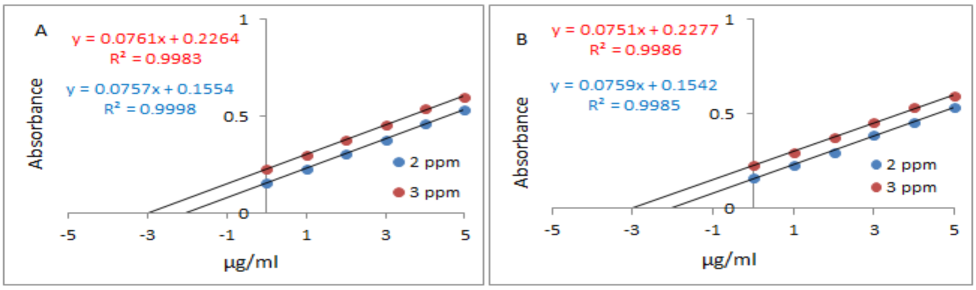
الجدول 8: تقدير المركبات الدوائية في المستحضرات الصيدلانية بالطريقة المقترحة

Pharmaceutical preparation	Certified value	Amount present (µg/ml)	Drug content found* (mg or g)	Recovery* (%)	Average recovery (%)
Cefalexin monohydrate					
Cefex Capsules India	500mg	2	515.85	103.17	101.29
		3	515.50	103.10	
		5	492.25	98.45	
		8	502.15	100.43	
Cephadar Forte Capsules Jordan	500mg	2	502.60	100.52	100.77
		3	507.25	101.45	
		5	497.75	99.55	
		8	507.80	101.56	
Ceftriaxone sodium					
Ceftriaxone vial spain	1g	2	1.0288	102.88	101.18
		3	1.0115	101.15	
		5	0.9951	99.51	
		7	1.0118	101.18	
Triaxone vial Saudi Arabia	1g	2	1.0146	101.46	101.26
		3	1.0204	102.04	
		5	0.9975	99.75	
		7	1.0179	101.79	
Cefotaxim sodium					
Brucitaz vial India	1g	2	0.9718	97.18	98.75
		5	1.0057	100.57	
		6	0.9778	97.78	
		9	0.9946	99.46	
Deforan vial Turkey	1g	2	0.9625	96.25	99.28
		3	1.0026	100.26	
		6	1.0097	100.97	
		9	0.9963	99.63	

* Average of five determinations

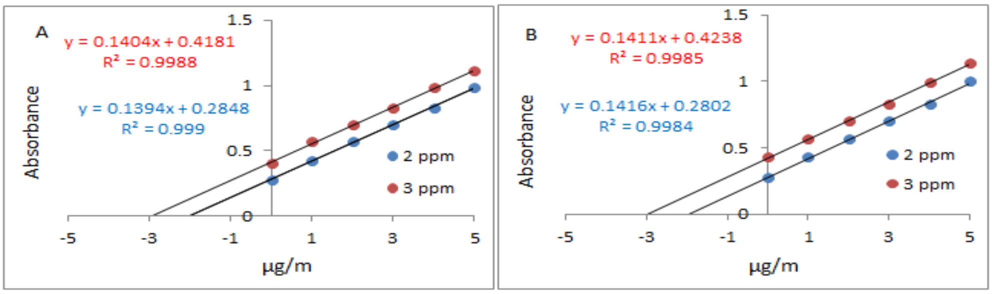
مقارنة الطريقة المقترحة مع طريقة الاضافة القياسية

لاثبات كفاءة الطريقة الطيفية المقترحة ونجاحها في تقدير المركبات الدوائية المدروسة وخلوها من تداخلات المضافات الدوائية في مستحضراتها الصيدلانية فقد تم تطبيق طريقة الاضافة القياسية على المستحضرات الصيدلانية لكل من السيفالاكسين والسيفترياكسون والسيفوتاكسيم بسبب صعوبة تطبيق الطرائق القياسية الواردة في دستور الادوية البريطاني[3] وذلك لعدم توفر المستلزمات اللازمة للتطبيق من حيث الاجهزة والمواد الكيميائية. اذ يمكن الاستدلال من الاشكال 8 و 9 و 10 والجدول 9 ان طريقة الاضافة القياسية متوافقة بشكل جيد مع الطريقة المقترحة ضمن المدى المقبول للخطأ (±5%) مما يدل ان الطريقة ذات انتقائية بشكل مرض



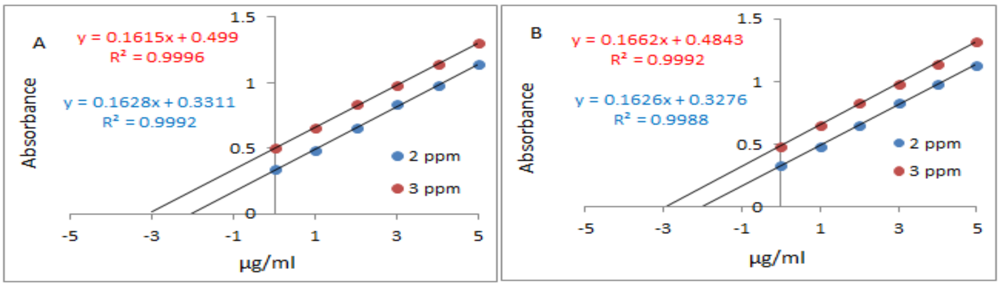
الشكل 8: منحنيات الاضافة القياسية للسيفالكسين احادي هيدرات في مستحضراته الصيدلانية

A: هندي المنشأ   B: اردني المنشأ



الشكل 9: منحنيات الاضافة القياسية للسيفترياكسون صوديوم في مستحضراته الصيدلانية

A: اسباني المنشأ   B: سعودي المنشأ



الشكل 10: منحنيات الاضافة القياسية للسيفوتاكسيم صوديوم في مستحضراته الصيدلانية

A: هندي المنشأ   B: تركي المنشأ

الجدول 9: مقارنة دقة الطريقة المقترحة للمركبات الدوائية في المستحضرات الصيدلانية مع طريقة الاضافة القياسية

Pharmaceutical preparation	Certified value	Amount present (µg/ml)	Drug content found (mg)	
			Present method	Standard addition
Cefex Capsules India	500mg	2	515.85	513.21
		3	515.50	495.83
Cephadar Forte Capsules Jordan	500mg	2	502.60	507.90
		3	507.25	505.32
Ceftriaxone vial Spain	1g	2	1.028	1.021
		3	1.011	0.992
Triaxone vial Saudi Arabia	1g	2	1.014	0.989
		3	1.020	1.001
Brucitaz vial India	1g	2	0.971	1.016
		3	1.005	1.029
Deforan vial Turkey	1g	2	0.962	1.007
		3	1.002	0.971

***Average of five determinations**

الاستنتاجات

تم اقتراح طريقة طيفية غير مباشرة باستعمال نظام تفاعل N-بروموسكسينميد وصبغة ايفانز الزرقاء في وسط حامض الهيدروكلوريك. إذ كانت الطريقة ذات انتقائية وحساسية عالية، كما تميزت بالبساطة كونها لا تحتاج الى تنظيم الدرجة الحرارية وخطوات الاستخلاص ولا تعاني من تداخلات مواد السواغ في التقدير. وطبقت الطريقة بنجاح على المستحضرات الصيدلانية للمركبات المدروسة بدقة وتوافق جيدين، فضلاً عن كونها متفقة احصائياً مع طريقة الاضافة القياسية.

المصادر

1. Bothara S. S., Kadam K. R. and Mahadik K. G., "Antibiotics". 14th ed. Principles of Medicinal Chemistry. Pune: Nirali Prakashan. p. 81 (2006).
2. Khan M. N., Ahmad J. and Jan M. N., J. Braz. Chem. Soc., 27:912-918. (2016).
3. British Pharmacopeia, CD-ROM. London, The Stationery Office Ltd., Norwich NR3 1GN (2013).
4. Liang X. Y., Zhong Y. J. and Liu Z. M., Yixue Zongshu. 20:1080-1082 (2014).
5. Naimi H. M., Rasekh H. and Yousofi H., BMC. Res. Notes, 9:86 (2016).
6. British pharmacopoeia, The stationary office London. Vol I. pp.423,666-667 (2007).
7. Chen D., Wang H. and Zhang Z.,In Spectrochim. Acta. A Mole. Biomol. Spectrosc., 78:553-557 (2011).

8. Irandoust M., Shariati-Rad M. and Khodabakhshi M., Int. J. Pharm. Sci. Res., 5:97-103 (2014).
9. Kumar CH. A, Gurupadayya B. M. and Sloka S. N., T. J. Pharm. Res.,10:81-88 (2011).
10. Kumar H. A., Kumar T. A. and Gurupadayya B. M., , Scholar Res. Library, 2:278-287 (2010).
11. Pasha C. and Narayana B., Eclet. Quim., 33: 41-46 (2008).
12. Jugade R. and Keskar M., pharm. Anal. Acta., 6:360-366 (2015).
13. Al-Kahdimy A. S. H. and Ahmed M. A., Baghdad Sci. J., 13:480-488 (2016).
14. Hassan R. O., , Chem. Sci. Trans., 2:1110-1117 (2013).
15. Khan M. N., Kalsoom S. and Hussain R., Pak. J. Anal. Environ. Chem., 17:118-123 (2016).
16. Feier B., Gui A. and Cristea C., Anal. Chem. Acta., 976:25-34 (2017).
17. Zhao X-J., Li Y-Q. and Bal W-D., China. J. Anal. Chem., 44:1927-1933 (2016).
18. Feier B., Blidar A. and Pusta A., Biosensors, 9:1-17 (2014).
19. Alfeen A. and Elias B., Chem. Mater. Res., 7:66-73 (2015).
20. Rao A. L., Prasanthi T. and Spandana U. S., Int. J. Res. In AYVSH Pharm. Sci., 1:137-146 (2017).
21. Jeswani R. M., Sinha P. K. and Topagi K. S., Int. J. Pharm. Tech. Res., 1:527-536 (2009).
22. Ilyas S. A., Imran M. and Kumar N., Int. J. Pharma. Sci. Res., 6:5164-5173 (2015).
23. Roopa K. P. and Jayanna B. K., Anal. Chem. Lett., 6:143-152 (2016).
24. Qian Y. J., Pan X-P. and Yixing J., Chin. J. Anal. Lab., 5:470-480 (2012).
25. Nkeoma N. O., Godwin I. C. N. and Nkechinyere U., Sci. Res. Academ., J., 2:342-347 (2007).
26. Pranitha G. and Venkateshwavlu G., World J. Pharm. Pharm. Sci., 5:2249-2260 (2016).
27. Zhang D., Ma Y. and Zhou M., Anal. Sci., 22:183-186 (2006).

28. Aleksic M. M., Lijeskic N. and Pantic J., Facta Uni. Ser. Phys. Chem. Tech., 11, 55-66 (2013).
29. Solangi A., Memon S. and Mallah A.,Turk. J. Chem., 34:921-933 (2010).
30. El-Bagary R. I., Abo-Talib N. F. and El-Hakeem M. M., Curr. Pharm. Anal., 14, 461-474 (2018).
31. Bhagyasree A. L., Kiran B. S. S. and Muneer S., J. Pharm. Res., 11:522-524 (2017).
32. Gaudin K., Langlois M- H. and Kauss T., Pharm. Anal. Acta., 6:1-5 (2015)
33. Frag E. Y., Mohamed G. G. and Farag A. B., Insight Pharm.Sci.,1:47-54 (2011).
34. Sayed R. A., Hassan W. S. and El-Mammli M. Y., Orient. J. Chem., 28:639-650 (2012).
35. Al-Awadie N. S. T. and Ibraheem M. H., I.J.R.P.C., 6:891-909 (2016).
36. Zhang F., Gu S. and Ding Y., J. Elec. Chem., 698:25-30 (2013).
37. Arbianto A. D., Rahayu M. D. and Kusumaningrum S., R.J.P.B.C.S., 8:22-29 (2017).
38. Arafat M., Golocorbin- kon S. and Mikov M., Int. J. Pharm. pharm. Sci., 7:343-346 (2015).
39. Saranya C. H. L., Thejaswini J. C. and Gurupadayya B. M., I.O.S.R. J. pharm., 4:12-18 (2014).
40. Tambe Y. B. and Kothari S., Int. J. Sci. Res., 5:1847-1851(2016).
41. Yao L., Xue X. and Chen F., Contrast Media Mol Imaging, 2018:10 (2018).
42. Smith S. J., Horstickand E. J.and Dowling J., J. Vis. Exp., 30:105 (2015).
43. Jiang Eb- H., Liu S. P. and Hu X. L., Chinese J. Anal., 31:1053-1057 (2003).
44. Qin Eb-Z. H., Fan L. and Liu S. P., Chinese J. Anal., 30:1486-1489 (2002).
45. Ravisankar P., Navya C. N., Pravallika D. and Sri D. N., JOSRJ. Pharm., 5:7-19 (2015).
46. Inam-ul-Haque, Hussain S. A. and Aslam N., Sci. Int. (Lahore), 19:111-123 (2007).