مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الرابع والعشرون - المجلد الرابع - علوم الكيمياء - تشرين ثاني 2024 م
doi.org/10.52866/esj.2023.04.24.03

تطوير طريقة طيفية لتقدير الالوبيورينول في المستحضرات الصيدلانية بأستخدام تفاعل الاقتران التأكسدي

استبرق قحطان رشاد
المديرية العامة لتربية صلاح الدين قسم تربية الدور

مستخلص:

تم تطوير طريقة طيفية حساسة ودقيقة لتقدير الالوبيورينول بتفاعل الاقتران التأكسدي وتعتمد الطريقة على تفاعل الالوبيورينول مع كاشف الميتول بوجود بيريودات البوتاسيوم كعامل مؤكسد في وسط حامضي ، حيث يتكون ناتج ذو لون بنفسجي، وأعطى أعلى امتصاص عند الطول الموجي 523 نانومتر ويتبع قانون بير في مدى التراكيز 7.2-0.8 مايكروغرام/ مل، وكانت قيمة الامتصاصية المولارية 1.7×10^4 لتر/ مول.سم وقيمة دلالة ساندل 0.0079 مايكروغرام/ سم^2 وقيمة حد الكشف 0.0629 مايكوغرام/ مل والحد الكمي0.2099 مايكروغرام/ مل، إذ كانت الطريقة على درجة عالية من الدقة والتوافقية فقد كانت قيمة الاسترجاعية 100.63-99.80 ٪ وقيمة الانحراف القياسي النسبي لا تتجاوز 2.61 ٪ وقد طبقت الطريقة بنجاح على الالوبيورينول في في المستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية : طريقة طيفية ، الالوبيورينول ، الميتول . اقتران تاكسدي .

Development of a Spectrophotometric Method for the Determination of Allopurinol in Pharmaceutical Preparations Using an Oxidative Coupling Reaction

Istibraq Qahtaan Rashad
General Directorate of Education of Salah al-Din, Department of Education of al-Dur

Abstract :

includes the development of The spectrophotometric method for The determination of allopurinol via oxidative coupling with the metol reagent in presence of oxidizing agent potassium periodate as oxidizing in the acidic medium (acetic acid) to form a violet colored product, which is soluble in water and showed the highest intensity of absorption at λ_{max} 523 nm. the method has obeyed Beer's Law in the concentration range (0.8-7.2µg/ml), with molar absorptivity of 1.4×10^4 L/mol.cm. Sandel Index value 0.0079 µg/cm^2, the detection limit 0.0629 µg/ml, The quantitative limit 0.2099 µg/ml, and the recovery was 99.80-100.63 %, the relative standard deviation of the method does not exceed 2.61%. The proposed method was applied successfully for the determination of allopurinol pharmaceutical preparation (Tablets) by both direct and standard addition methods.The evaluations of results of this method were achieved by applying t and F tests, the results showed that there is no significant difference between the proposed and standard method, and thus the proposed method is of a good validity for the determination of allopurinol in its pharmaceutical preparations.

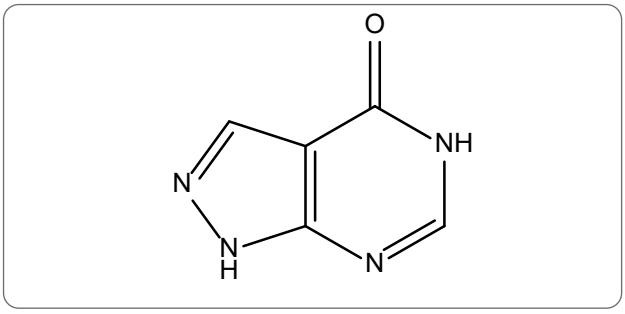
Keywords: allopurinol, Metol, Oxidative coupling, Spectrophotometric.

المقدمة

1-1 الالوبيورينول (Allopurinol):

الاسم العلمي :

1,5-Dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one



هو مسحوق ذو لون أبيض ، صيغته الجزيئية $C_5H_4N_4O$ ووزنه الجزيئي 136.1 غم/ مول ، وقليل للذوبان في الماء و الإيثانول.[1] هو دواء يستخدم لعلاج النِقْرِس وحصى الكلى عن طريق تقليل إنتاج حامض اليوريك (المسؤول عن التسبب في النِقْرِس وحصى الكلى إذا زاد في جسم الإنسان ويؤخذ فمويا فقط وموجود بشكل اقراص بمسميات تجارية Hy-poric, Zyloric[2] ويوجد في المستحضرات الصيلانية على شكل اقراص دوائية وشراب[1].

1-1-1 الطرائق المستخدمة في تقدير دواء الالوبيورينول :

1-1-1-1 الطرائق الطيفية:

قام الباحث Najim [2] بتطوير طريقة طيفية لتقدير الالوبيورينول في شكله النقي وفي المستحضرات الصيدلانية ، وذلك بالاعتماد على صفته الاختزالية من خلال إخماده لطيف معقد اليوديد الثلاثي (I_3^-) ذو اللون الأصفر والذي له أعلى امتصاص عند الطول الموجي 350 نانومتر، ووجد إن مدى التراكيز الخاضعة لقانون بير 9-1 مايكروغرام/ مل وإن الامتصاصية المولارية 27229 لتر/ مول. سم ودلالة ساندل 0.0053 مايكروغرام/ سم^2 وإن الخطأ النسبي 1.83-0.5 ٪ والانحراف القياسي النسبي 2.6-2.1 ٪ .

تم تقدير الالوبيورينول طيفيا عن طريق تفاعل انتقال الشحنة بوصفه مانح لالكترونات (n-) Electron donor مع مركبات مستقبلة للالكترونات (π-Electron acceptor) وهي 3.2-ثنائي كلورو-6-5-ثنائي سيانو-بارا-بنزوكوينون (DDQ) و6-3-ثنائي كلورو-5-2-ثنائي هيدروكسي-بارابنزوكوينون (P-CLA) حيث اعطى كل منهم اعلى قيمة للامتصاص عند طول موجي 450 ،515 نانومتر والامتصاصية المولارية 1.95×10^3 ، 0.16×10^3 لتر/ مول.سم وقيمة دلالة ساندل 0.0035 ، 0.0043 مايكروغرام/ سم^2 وبحدود خطية 60-2.50 ، 50-5 مايكروغرام/ مل والانحراف القياسي النسبي 0.74-0.12 ، 0.18-0.99 وحد كشف 7.96 ، 1.70 مايكروغرام/ مل[3].

استطاع الباحث Khayoon[4] وجماعته من تقدير الالوبيورينول والكاتيكول بوجود الحديد الثنائي ليعطي ناتج ذو لون ازرق يكون اعلى امتصاص له عند طول موجي 580 نانومتر وكانت حدود الخطية 10-2 مايكروغرام/ مل والامتصاصية المولارية 9.4×10^3 لتر/ مول.سم ودلالة ساندل 1.4×10^{-2} مايكروغرام/ سم^2 .

1-1-1-2 طرائق كروماتوغرافيا :

استطاع الباحثان Brown و Bye[5] من استخدام تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني عالية الأداء لتقدير الالوبيورينول داخل جسم الإنسان في كل من الدم والبول وتمت باستخدام راتنج chelex-100

في شكل النحاس الثنائي حيث تم تكوين منحنيات معايرة خطية للالوبيورينول على مدى 0.068 – 1.36 مايكروغرام/ مل في البلازما و0.07 – 15.7 مايكروغرام/ مل في البول.

تمكن الباحث Godoy [6] وجماعته تقدير كمية الالوبيورينول عن طريق تقنية HPLC لعينات بلازما الكلاب باستخدام عمود LhchoCART 125-Lichrospher 100RR-8 – 4 والطور المتحرك متكون من مزيج من الماء بنسبة ٪0.1 وحامض الفورميك ٪88 واستونتريل بنسبة ٪0.25 ويتم الفصل على باستخدام سرعة جريان قدرها 0.7 مل/ دقيقة وتم القياس باستخدام مكشاف الاشعة الفوق بنفسجية عند طول موجي 254 نانومتر. وكان الحد الكمي أقل من 0.1 مايكروغرام/ لتر وكان التحليل الخطي بتركيز 20 – 0.1 مايكروغرام/ مل.

طورت طريقة (Rp-HPLC) لتقدير الالوبيورينول في الاقراص الدوائية باستخدام العمود C18 (2.6×250 مم)، وطور متحرك يتكون من الاسيتونتريل: M 0.02 ، وخلات الامونيوم اذ تكون الدالة الحامضية 4.6 في نسبة V:V 50:50 بسرعة جريان قدرها 0.8 مل/ دقيقة، الطول الموجي للكشف 210 نانومتر وتم ذلك باستخدام مكشاف الاشعة الفوق بنفسجية ، ووجد أن زمن الاحتجاز للالوبيورينول 3.01 دقيقة وحدود الخطية 175 – 50 مايكروغرام/ مل وبلغت الدقة ٪0.83 والاسترجاعية ٪98 وحد الكشف 3 نانوغرام/ مل والحد الكمي 10 نانوغرام/ مل [7] .

تم استخدام طريقة LC-MS السريعة والحساسة في تقدير الالوبيورينول ومستقبله الرئيسي اوكسيبورينول (oxypurinol) في بلازما الدم باستخدام اللاميفودين كمعيار داخلي اذ تم استخدام طور معكوس يكون فيه العمود C8 (150 mm × 3.9 mm, 5 µm) وطور متحرك يتكون من خليط حامض الفورميك 0.01 ٪ في الماء والاسيتونتريل بنسبة ٪5 – 95 ووجد ان الطريقة ذات مدى خطية يتراوح 10 – 0.01 مايكروغرام / مل مع الحد الكمي 0.01 مايكروغرام/ مل ومعامل التباين 6.94 [8] .

1 – 1 – 1 – 3 طرائق التحليل الكهربائية:

قام الباحث Teradale [9] وجماعته من تطوير متحسس جديد لتقدير الالوبيورينول عن طريق تأثره بسطح القطب المتكون من (CTAB) cetyltrimeth-ylammoniumbromide مع محلول الفوسفات ودالة حامضية 3 في قطب عجينة الكاربون (CPE) اذ وجد أن هذه الطريقة حساسة بتراكيز منخفضة من (CTAB) ذو الاكسدة القوية اذ يظهر تأثير ملحوظ في تقدير الالوبيوررينول باستجابة خطية فولتامترية بتراكيز على نطاق 60 – 0.6 مايكرومولاري مع حد كشف وحد كمي 97.2 و 0.324 نانومولاري على التوالي وتم تطبيق هذا المستشعر بنجاح في تحديد الالوبيورينول في عينة المصل البشري اذ تبين أنه حساس وفعال.

اهمية البحث :

إن للبحث اهمية وهي إيجاد طريقة طيفية بسيطة وسريعة واقتصادية وانتقائية وحساسة لتقدير التراكيز الضئيلة جداً من الالوبيورينول Allopu-rinol عن طريق تفاعل الاقتران التأكسدي باستخدام كواشف عضوية مناسبة لهذه التفاعلات وتطبيقاتها في المستحضرات الصيدلانية .

الهدف من البحث :

ايجاد كواشف عضوية مناسبة للاقتران وذلك بوجود عوامل مؤكسدة قوية تعطي نتائج جيدة

طيفيا وبحساسية ودقة عالية وبامكانية استخدام الطريقة المقترحة في تقدير المستحضرات الصيدلانية المختلفة طيفيا وبتراكيز ضئيلة جدا .

2-1 الجزء العملي:

1-2-1 الأجهزة المستخدمة :

تم استخدام الاجهزة الأتية للقياسات منها جهاز مطياف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية والمرئية. Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1800 وجهاز قياس الدالة الحامضية WTW pH 7310 وميزان حساس KERN ACS120-4 وخلايا زجاجية .

2-2-1 الكواشف والمواد الكيميائية المستخدمة :

تم استخدام مواد كيميائية وكواشف على درجة عالية من النقاوة وهي مبينة بالجدول (1-1):

الجدول(1-1) المواد الكيميائية المستخدمة

Chemicals	Chemical formula	Assay
Allopurinol	$C_5H_4N_4O$	99%
Metol	$(C_7H_9NO)_2.H_2SO_4$	99.5%
potassium periodate	KIO_4	95.5%
Acetic acid	CH_3COOH	%٩٠
Sodium acetate	CH_3COONa	٩٩%
Bromothymol blue	$C_{27}H_{28}Br_2O_5S$	95%
Dichloroaniline	$C_6H_5Cl_2N$	%٩٠
p-aminobenzaldehyed	C_7H_7NO	99.5%
p-nitrobenzaldehyed	$C_7H_5NO_3$	90.9%
Potassium Iodate	KIO_3	٩٩.٩%
Ammonium ferric sulphate	$NH_4Fe(SO_4)_2.H_2O$	99%
Ceric sulphate	$Ce(SO_4)_2$	99.95
Ferric chloride	$FeCl_3$	٩٩%

3-2-1 محاليل المواد المستخدمة :

محلول الالوبيورينول القياسي 1000 مايكوغرام/ مل (7.346×10^{-3} مولاري):

حضر بإذابة 0.1000 غرام من الالوبيورينول النقي في كمية قليلة من الايثانول ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل.

محلول الالوبيورينول 100 مايكروغرام/ مل (7.346×10^{-4} مولاري) :

حضر بسحب 10 مل من محلول الالوبيورينول القياسي المحضر بتركيز 1000 مايكروغرام/ مل ثم وضع في قنينة حجمية سعة 100 مل وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة

محلول بيريودات البوتاسيوم بتركيز 5×10^{-3} مولاري :

حضر بإذابة 0.115 غرام من المادة النقية بالماء المقطر ثم إكمال الحجم إلى العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل.

محلول حامض الخليك 0.1 مولاري تقريبا :

حضر بسحب 6.4 مل من حامض الخليك المركز ثم يخفف في قنينة حجمية سعة 100 مل ويكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر إذ يتكون محلول حامض الخليك ذو التركيز 1 مولاري الذي أخذ منه 10 مل ووضع في قنينة حجمية سعة 100 مل وأكمل الحجم إلى العلامة لتحضير محلول بتركيز 0.1 مولاري .

المحلول المنظم M0.2 حامض الخليك- M0.2 خلات الصوديوم (دالة حامضية 4.5):

حضر بأخذ 28 مل من حامض الخليك بتركيز 0.2 مولاري و 22 مل من خلات الصوديوم بتركيز 0.2 مولاري ثم يخفف بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مل.

محلول الميتول بتركيز 10^{-2} مولاري :

حضر بإذابة 0.3444 غرام من المادة النقية بالماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل بالماء المقطر.

محلول المستحضر الصيدلاني بتركيز 100 مايكروغرام/ مل : Allopurinol tablets 100 mg) إنتاج شركة Bristol)

تم وزن محتويات 10 حبة (4.30 غرام) بدقة، وبعد سحنها ومزجها أخذ منها ما يكافئ 0.1000 غرام من الالوبيورينول النقي (0.430) واذيب في كمية قليلة من الايثانول مع التحريك، ثم رشح المحلول وتم غسله عدة مرات، وأكمل الراشح بالماء المقطر إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل . يؤخذ من المحلول المحضر 10 مل ويخفف في قنينة حجمية سعة 100 مل ويكمل بالماء المقطر إلى حد العلامة لتحضير محلول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل.

3-1 النتائج والمناقشة :

1-3-1 مبدأ الطريقة :

مبدأ الطريقة هو اقتران الالوبيورينول بالميتول بوجود العامل المؤكسد بيريودات البوتاسيوم في وسط حامضي، إذ يتكون ناتج ذو لون بنفسجي يعطي أعلى امتصاص عند الطول الموجي 523 نانومتر مقابل المحلول الصوري.

2-3-1 الاختبارات الأولية :

أضيفت 3 مل من بيريودات البوتاسيوم 5×10^{-3} مولاري إلى 1 مل من محلول الالوبيورينول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل ، بعدها تم إضافة 4 مل من كاشف الميتول بتركيز 10^{-2} مولاري وإضافة 1.5 مل من حامض الخليك بتركيز 0.1 مولاري . لوحظ تكون ناتج ذو لون بنفسجي ، ثم خفف بالماء المقطر إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 25 مل. اذ أعطى أعلى امتصاص عند الطول الموجي 523 نانومتر مقابل المحلول الصوري.

3-3-1 دراسة ظروف التفاعل المثلى :

لغرض الحصول على حساسية عالية ، تمت دراسة واختيار الظروف المثلى التي تعطي أعلى امتصاص للناتج . تم باستخدام قناني حجمية سعة 25 وخلايا زجاجية 1 سم.

1-3-3-1 اختيار أفضل كاشف :

تم أخذ 4 مل من كل من محاليل الكواشف المستخدمة ذي التركيز $10x1^{-2}$ مولاري ، وأضيفت إلى قنان حجمية سعة 25 مل تحتوي كل منها 1 مل من الالوبيورينول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل و 3 مل من بيريودات البوتاسيوم بتركيز $10x5^{-3}$ مولاري ثم إضافة و1.5 مل من المحلول المنظم (عند دالة حامضية 4.5)، ثم إكمال الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة. وتم قياس طيف الامتصاص لكل نموذج

مقابل محلوله الصوري بعد مرور 15 دقيقة والنتائج موضحة في الجدول (1-2) .

الجدول (1-2) تأثير نوع الكاشف

Reagent	Chemical formula	λ_{max}	Absorbance
Metol	$(C_7H_9NO)_2,H_2SO_4$	٥23	0.674
Bromothymol blue	$C_{27}H_{28}Br_2O_5S$	613	٠.431
Dichloroaniline	$C_6H_5Cl_2N$	٤29	0.151
p-aminobenzaldehyed	C_7H_7NO	412	٠.281
p-nitrobenzaldehyed	$C_7H_5NO_3$	400	0.023

أذ وجد أن أفضل كاشف للأقتران هو الميتول، لذلك تم استخدامه في التجارب اللاحقة .

1-3-3-2 تأثير كمية الكاشف :

تمت دراسة تأثير كمية كاشف الاقتران بأخذ حجوم مختلفة (1- 6 مل) من محلول الميتول ذي التركيز 10^{-2} مولاري مع حجوم مختلفة (0.5 ، 1، 1.4 مل) من محلول الالوبيورينول ذي التركيز 100 مايكروغرام/ مل بوجود 3 مل من بيريودات البوتاسيوم وإضافة 1.5 مل من المحلول المنظم (عند دالة حامضية 4.5) في حجم نهائي 25 مل وتم قياس طيف الامتصاص بعد مرور 15 دقيقة والنتائج مبينة في الجدول (1-3).

الجدول (1-3) تأثير كمية الكاشف

Ml of metol 10^{-2}	Allopurinol of 2 ppm	Allopurinol of 4 ppm	Allopurinol of 5.6
1	0.001	0.143	0.620
2	0.095	0.259	0.760
3	0.112	0.469	0.887
4	0.254	0.677	0.987
5	0.224	0.667	0.943
6	0.195	0.510	0.900

لوحظ من النتائج المبينة في الجدول (1-3) أعلاه أن حجم 4 مل من محلول الميتول بتركيز 10^{-2} مولاري أعطى أعلى قيمة للامتصاص ، لذا تم اعتمادهُ في التجارب اللاحقة.

1-3-3-3 أختيار أفضل عامل مؤكسد :

تم استخدام عدة عوامل مؤكسدة بتركيز $10x5^{-3}$ مولاري أضيفت الى 1 مل من الالوبيورينول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل وبعدها تمت إضافة 4 مل من الميتول بتركيز 10^{-2} مولاري و1.5 مل من المحلول المنظم (عند دالة حامضية 4.5)، وأكمال الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 25 مل. وتم قياس طيف الامتصاص بعد مرور 15 دقيقة لكل نموذج مقابل محلوله الصوري في مدى من الطول الموجي بين (400-800 نانومتر) والنتائج مبينة في الجدول (4-1).

الجدول (1-4) تأثير العامل المؤكسد في الامتصاص

Oxidizing agent 5×10^{-3}	Chemical formula	λ_{max}	Absorbance
Potassium periodate	KIO_4	523	0.676
Potassium Iodate	KIO_3	512	0.265
Ammonium ferric sulphate	$NH_4Fe(SO_4)_2.H_2O$	420	0.113
Ceric sulphate	$Ce(SO_4)_2$	----	----
Ferric chloride	$FeCl_3$	422	0.123

اذ وجد أن أفضل عامل مؤكسد هو بيريودات البوتاسيوم، لذلك تم استخدامهُ في التجارب اللاحقة.

1-3-3-4 تأثير كمية العامل المؤكسد :

تمت دراسة تأثير كمية العامل المؤكسد من محلول بيريودات البوتاسيوم ذي التركيز $5x10^{-3}$ مولاري من خلال إضافة حجوم مختلفة منه (1-6 مل) إلى قنان حجمية سعة 25 مل تحتوي على 1 مل من الالوبيورينول ذي التركيز 100 مايكروغرام/ مل، ومن ثم إضافة 4 مل من محلول الكاشف الميتول و1.5 مل من المحلول المنظم(عند دالة حامضية 4.5) وإكمال الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر. وبعد مرور 15 دقيقة تم قياس طيف الامتصاص للمحاليل عند طول موجي 523 نانومتر، والنتائج مبينة في الجدول (1-5).

الجدول (1-5) تأثير كمية العامل المؤكسد

ml of KIO_4	1	2	3	4	5	6
Absorbance	0.499	0.598	0.675	0.572	0.539	0.541

ولوحظ من النتائج أن أفضل حجم يُعطي أعلى امتصاص للناتج الملون هو 3 مل من بيريودات البوتاسيوم.

1-3-3-5 تأثير الدالة الحامضية :

1-3-3-5-1 تأثير القاعدة:

تمت دراسة تأثير القاعدة باستخدام هيدروكسيد الصوديوم والامونيا التي تعمل كل منها على تعكر المحلول لذلك تم استبعادها.

1-3-3-5-2 تأثير الحامض :

تمت دراسة تأثير الدالة الحامضية على الامتصاص باستخدام عدة حوامض بتراكيز 1 مولاري واخذ 1 مل من كل حامض، إذ لوحظ أن حامضية كل من حامض الكبريتيك والهيدروكلوريك تعمل على تعكر المحلول لذلك تم استبعادها اما حامض الخليك فيحافظ المحلول على لونه لذلك تم استخدامه لاحقا.

1-3-3-5-3 اختيار أفضل كمية من الحامض :

أجريت هذه الدراسة لبيان تأثير الوسط الحامضي، باستخدام حجوم مختلفة من حامض الخليك بتركيز 1 مولاري ووجد أنه لايعمل على زيادة الامتصاص لذلك تم استخدام حامض الخليك بتركيز 0.1 مولاري باحجام مختلفة تتراوح بين 2.5-0.5 مل أضيفت الى قنان حجمية سعة 25 مل تحتوي كل منها على 1 مل من محلول

الالوبيورينول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل و3 مل من محلول البيريودات بتركيز 5×10^{-3} مولاري و 4 مل من محلول الميتول بتركيز 10^{-2} ، ثم خففت بالماء المقطر الى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 25 مل.

وتم قياس الامتصاص بعد 15 دقيقة لكل نموذج مقابل محلوله الصوري عند 523 نانومتر، والنتائج موضحة في الجدول (6-1).

الجدول (1-6) اختيار أفضل كمية من الحامض

ml of 0.1M CH_3COOH	Absorbance	pH
Without	0.636	5.6
0.5	0.654	4.6
1	0.667	4.5
1.5	0.685	4.5
2	0.669	4.4
2.5	0.648	4.4

أذ لوحظ من الجدول أعلاه كمية الحامض التي تعطي أعلى قيمة للامتصاص هي 2-1 مل، لذلك تم استخدام 1.5 مل من محلول حامض الخليك (الدالة الحامضية 4.5) في التجارب اللاحقة

1-3-3-5-4 تأثير كمية المحلول المنظم :

تم تحضير المحلول المنظم[10] 0.2 مولاري حامض الخليك-0.2 مولاري خلات الصوديوم بدالة حامضية 4.5 واستخدم أحجام متزايدة منه لضبط الدالة الحامضية والنتائج مبينة في الجدول (1-7).

الجدول (1-7) تأثير كمية المحلول المنظم

V (ml) of Buffer solution	0.0	0.5	1	1.5	2	2.5
Absorbance	0.656	0.678	0.675	0.685	0.678	0.661

تبين من النتائج ان استخدام 2-0.5 مل تعطي اعلى امتصاص بالدالة الحامضية المطلوبة لذلك تم اعتماد حجم 1.5 مل من المحلول المنظم.

1-3-3-6 تسلسل الاضافات :

تمت دراسة تأثير تغيير تسلسل إضافة مواد التفاعل على امتصاص الناتج الملون بإجراء عدد من التجارب، وقد وجد أن تغيير تسلسل الإضافة لايؤثر على امتصاص الناتج الملون وقد تم اعتماد التسلسل رقم 1 كما مبين في الجدول (1-8).

الجدول (1-8) تسلسل الاضافات

Order number	Order of addition	Absorbance
1	D+O+R+B	0.687
2	D+R+O+B	0.679
3	R+O+D+B	0.691
4	O+D+R+B	0.678

إذ ان D: المادة المراد تقديرها ، R: الكاشف ، O: العامل المؤكسد ، B : المحلول المنظم .

1-3-3-7 تأثير درجة الحرارة :

تم دراسة تأثير درجة الحرارة على امتصاص الناتج الملون حسب ظروف التفاعل باستخدام درجات حرارة 60-5 °م عند طول موجي 523 نانومتر والنتائج مبينة في الجدول (1-9).

الجدول (1-9) تأثير درجة الحرارة

Temperature C°	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Absorbance	0.533	0.607	0.654	0.681	0.685	0.679	0.684	0.693	0.687	0.689	0.688	0.679

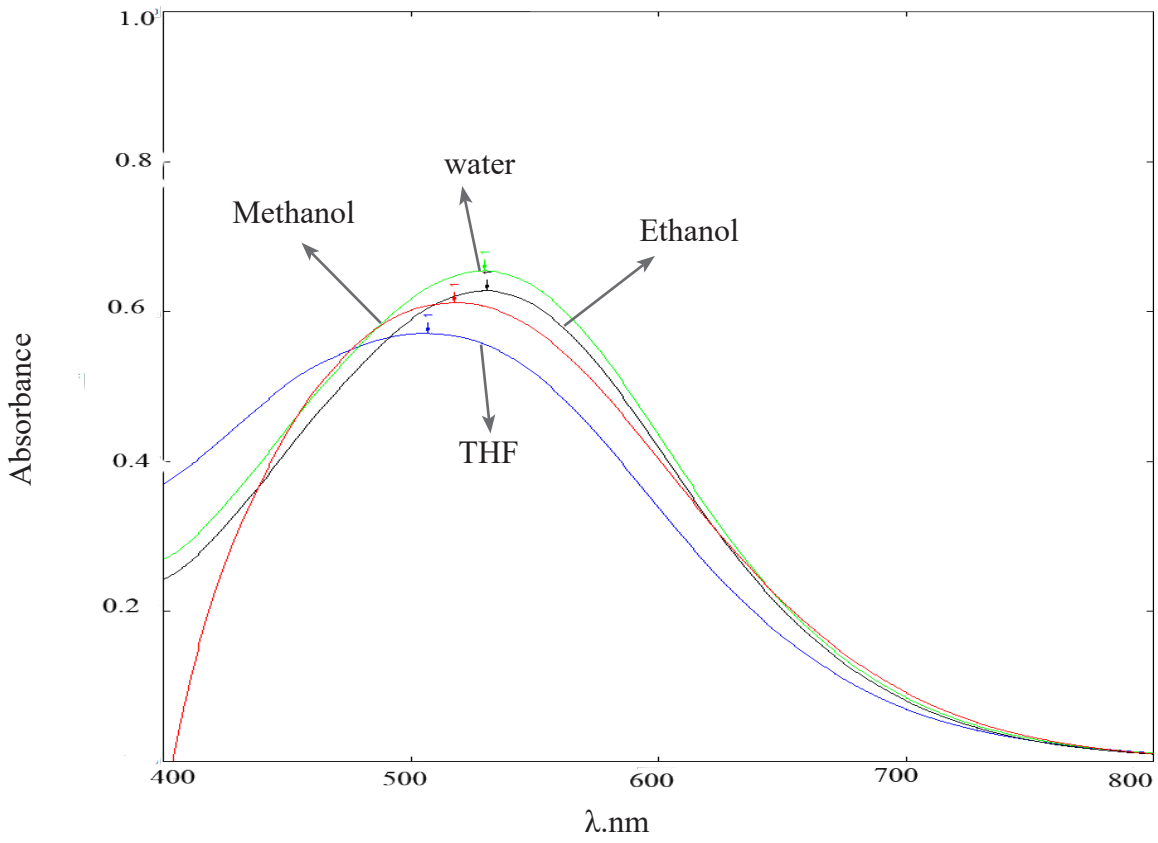
من الجدول أعلاه يتبين أن تغيير درجة الحرارة لا يؤثر على امتصاص المحلول الملون ، لذلك تم العمل في درجة حرارة المختبر.

1-3-3-8 تأثير المذيبات:

تم دراسة تأثير بعض المذيبات على امتصاص الناتج الملون من تفاعل الالوبيورينول مع الميتول بوجود بيريودات البوتاسيوم في وسط حامضي بعد أكتمال الإضافات ثم إكمال الحجم إلى 25 مل بمذيبات مختلفة . وتم تسجيل طيف الامتصاص بعد مرور 15 دقيقة لكل محلول مقابل محلوله الصوري، النتائج مدونة في الجدول(1-10) والشكل (1-1).

الجدول (1-10) تأثير المذيبات

Solvent	λ_{max}	Absorbance
Ethanol	523	0.667
Methanol	520	0.659
THF	518	0.615
Water	523	0.680



الشكل (1-1) تأثير المذيبات

من النتائج يتبين ان الماء يعطي أعلى امتصاص عند الطول الموجي 523 نانومتر لذلك تم اختياره كأفضل مذيب.

1-3-3-9 استقرارية ناتج التفاعل :

تمت هذهِ الدراسة بأخذ ثلاثة أحجام مختلفة (0.5، 1، 1.4 مل) من محلول الالوبيورينول ذي التركيز 100 مايكروغرام/ مل تراكيزها النهائية 2 ، 4 ، 5.6 مايكروغرام/ مل على التوالي وإضافة 3 مل من محلول بيريودات البوتاسيوم ذي التركيز $10x5^{-3}$ مولاري وإضافة 4 مل من محلول الميتول ذي التركيز 10^{-2} مولاري 1.5 مل من المحلول المنظم في قنينة حجمية سعة 25 مل وإكمال الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر، ثم قياس الامتصاص لكل نموذج مقابل محلوله الصوري، والنتائج مبينة في الجدول (1-11) . وجد بأن اكتمال الناتج يحدث بعد 15 دقيقة ويبقى مستقر لمدة لا تقل عن 60 دقيقة وتعد مدة مناسبة لإتمام العديد من القياسات.

الجدول (1-11) استقرارية الناتج

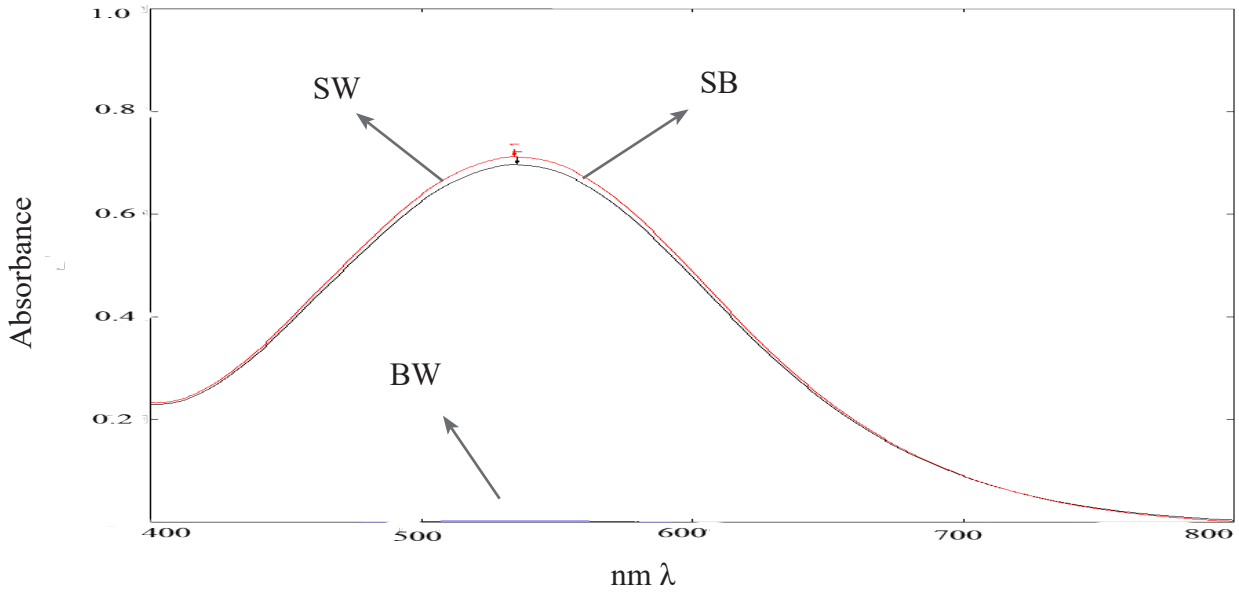
Time (min.)	Absorbance of Allopurinol		
	µg/ml2	µg/ml4	5.6 µg/ml
0	0.122	0.323	0.511
5	0.321	0.541	0.569
10	0.335	0.643	0.698
15	0.398	0.679	0.831
20	0.341	0.681	0.837
25	0.395	0.682	0.840
30	0.398	0.680	0.841
35	0.397	0.685	0.837
40	0.341	0.681	0.834
45	0.342	0.679	0.836
50	0.339	0.677	0.838
55	0.340	0.687	0.833
60	0.339	0.684	0.837
65	0.335	0.676	0.837
70	0.331	0.674	0.836

1-3-4 طيف الامتصاص النهائـي :

بعد تثبيت الظروف المثلى وهي استخدام 3 مل من محلول بيريودات البوتاسيوم ذي التركيز $5x10^{-3}$ مولاري و 4 مل من محلول الميتول ذي التركيز $1x10^{-2}$ مولاري و1.5 مل من المحلول المنظم وإكمال الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 25 مل الحاوية على 1 مل من الالوبيورينول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل. ثم قياس طيف الامتصاص الناتج البنفسجي اللون بعد مرور 15 دقيقة، وجد أنهُ يعطي أعلى أمتصاص عند الطول الموجي 523 نانومتر في حين أن محلوله الصوري لم يُعط أي امتصاص عند هذا الطول الموجي ، وكما موضح في الشكل (2-1). أذ أن SW يمثل طيف امتصاص الالوبيورينول مقابل الماء المقطر، SB يمثل طيف امتصاص محلول الالوبيورينول مقابل المحلول الصوري، BW يمثل طيف امتصاص المحلول الصوري مقابل الماء المقطر.

الجدول (1-12) الظروف المثلى للتفاعل

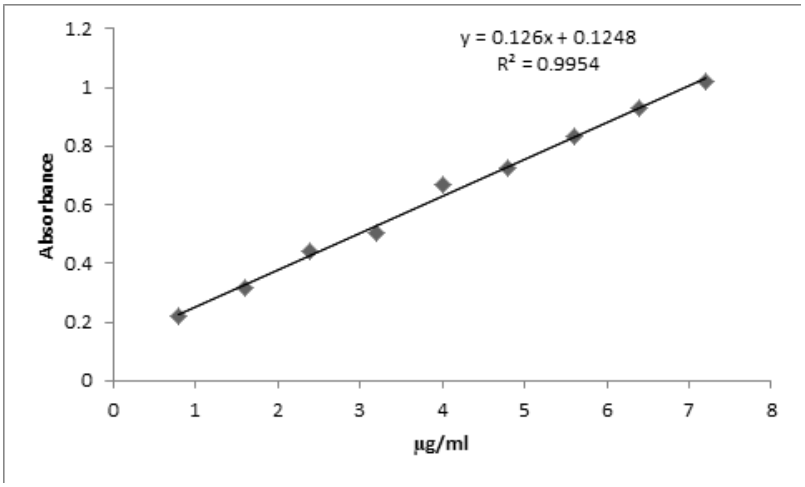
الميتول	$1x1^{-2}$ مولاري	ml 4
بيريودات البوتاسيوم	$5x10^{-3}$ مولاري	ml 3
المحلول المنظم	----	1.5
الطول الموجي	nm 523	------
زمن اكتمال التفاعل	------	15 دقيقة
تسلسل الاضافة	D+O+R+B	----



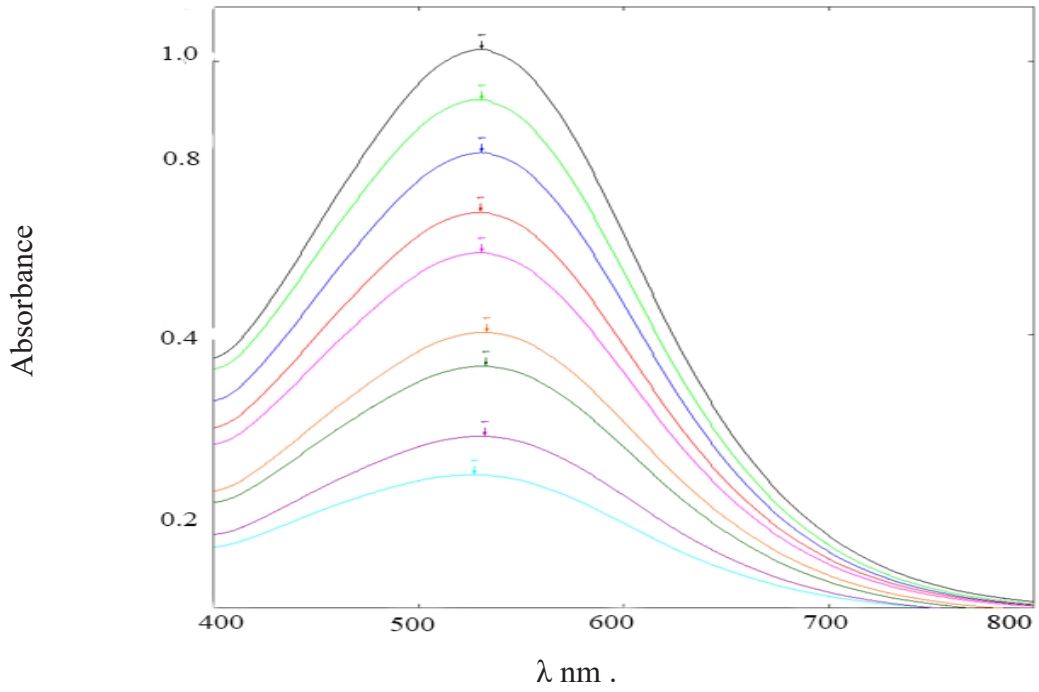
الشكل (1-2) طيف الامتصاص النهائي للالوبيورينول

1-3-5 طريقة العمل المعتمدة ومنحني المعايرة :

تم إكمال الإضافات حسب الظروف المثلى المبينة في الجدول (1 - 14) اذ اخذ سلسلة قنان حجمية سعة 25 مل تحتوي على احجام 1.8-0.2 مل محلول الالوبيورينول بتركيز 100 مايكروغرام/ مل (تراكيزها النهائية 7.2-0.8 مايكروغرام/ مل) وإضافة كل من العامل المؤكسد والكاشف والمحلول المنظم وتم قياس طيف الامتصاص للمحاليل مقابل المحلول الصوري بعد مرور 15 دقيقة، والشكلين رقم (1 - 3) و (1 - 4) يمثلان منحني المعايرة وطيف الامتصاص اذ تبين ان تراكيز قانون بير 7.2-0.8 مايكروغرام/ مل من محلول الالوبيورينول ، بمعامل الارتباط مقداره 0.9976 وتم حساب قيمة الامتصاصية المولارية وبلغت قيمتها 1.7×10^4 لتر/ مول.سم وقيمة دلالة ساندل 0.0079 مايكروغرام/ سم^2.



الشكل (1-3) منحني المعايرة للالوبيورينول



الشكل (1 – 4) طيف الامتصاص لتراكيز 0.8–7.2 مايكروغرام/ مل

1–3–6 دقة الطريقة وتوافقيتها :

تم استخدام الظروف المثلى في طريقة العمل لاختبار دقة الطريقة وتوافقيتها ، فقد تم أخذ ست قراءات لثلاث تراكيز مختلفة (0.8 ، 4 ، 5.6 مايكروغرام/ مل) من محلول الالوبيورينول ضمن حدود قانون بير في منحني المعايرة اذ تم حساب معدل الاسترجاعية والانحراف القياسي النسبي[11]، وجد ان الطريقة ذات دقة وتوافقية عاليتين كما مبينة النتائج في الجدول (1 – 13).

الجدول (1 – 13) الدقة والتوافقية

Conc. of Allopurinol (taken) µg/ml	Conc. of Allopurinol (found) µg/ml	Recovery, %	RSD,%
0.8	0.805	100.63	2.61
4	4.01	100.25	0.42
5.6	5.589	99.80	0.31

1–3–7 حد الكشف والحد الكمي :

تم حساب حد الكشف والحد الكمي [12] وذلك بقياس أدنى تركيز مأخوذ من منحني المعايرة 0.8 مايكروغرام/ مل ولست مرات وعند الظروف المثلى، والنتائج مبينة في الجدول (1–14) إذ بلغت قيمة حد الكشف 0.0629 مايكروغرام/ مل والحد الكمي 0.2099 مايكروغرام/ مل .

الجدول (1-14) حد الكشف والحد الكمي

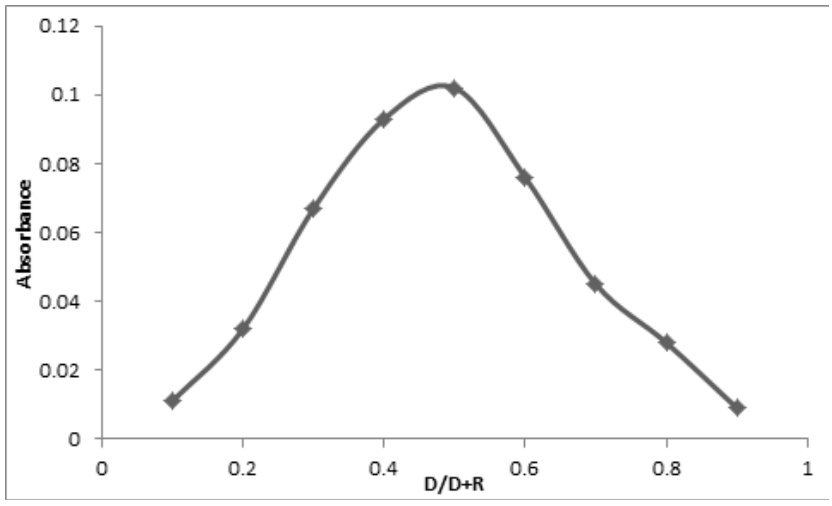
Conc. of Allopurinol	$\overline{X}$	S	D.L µ/ml	LOQ µ/ml
0.8	0.78	0.0204	0.0629	0.209

إذ ان D.L: حد الكشف و : LOQ الحد الكمي و Conc. Of Allopurinol: أدنى تركيز لالالوبيورينول في منحني المعايرة و $\overline{X}$: معدل تركيز لستة قراءات .

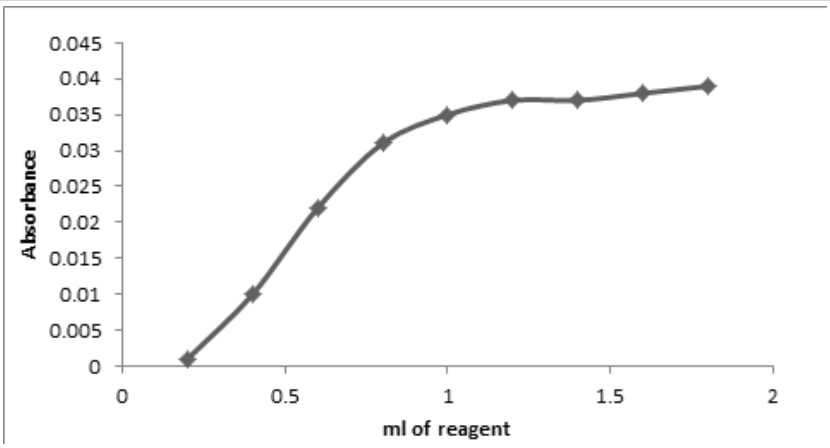
1-3-8 طبيعة الناتج المتكون :

لمعرفة طبيعة الناتج المتكون ونسبة ارتباط العقار مع الكاشف فقد تم تطبيق طريقتي التغيرات المستمرة (طريقة جوب) وطريقة النسبة المولية [13] . وفي كلا الطريقتين يكون كلٌ من محلول الالوبيورينول ومحلول الميتول في نفس التركيز(10^{-4} مولاري) . ففي طريقة جوب تم وضع إحجام مختلفة من محلول العقار تتراوح بين 0.5- 4.5 مل، وأضيفت مكملات هذهِ الإحجام إلى حجم 5 مل من محلول الكاشف في سلسلة من قنان حجمية سعة 25 مل ثم أضيف 3 مل من محلول بيريودات البوتاسيوم، وتم التخفيف إلى حد العلامة بالماء المقطر، وتم قياس الامتصاص لهذهِ المحاليل بعد مرور15 دقيقة عند الطول الموجي 523 نانومتر والشكل (5-1) يبين أن النسبة هي 1:1.

أما في طريقة النسب المولية فقد تم وضع 1 مل من محلول العقار في سلسلة قنان حجمية سعة 25 مل ، واضيف اليها محلول الكاشف بأحجام تتراوح بين 2-0.2 مل ثم اضافة 3 مل من محلول بيريودات البوتاسيوم ذي التركيز $5x10^{-3}$ مولاري وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر .وبعد مرور 15 دقيقة تم قياس طيف الامتصاص لهذه المحاليل عند الطول الموجي 523 نانومتر مقابل المحلول الصوري لكل منها، ولقد وجد أن النسبة المولية تتفق مع طريقة التغيرات المستمرة وتحقق النسبة (1:1) وكما هو مبين في الشكل(6-1).

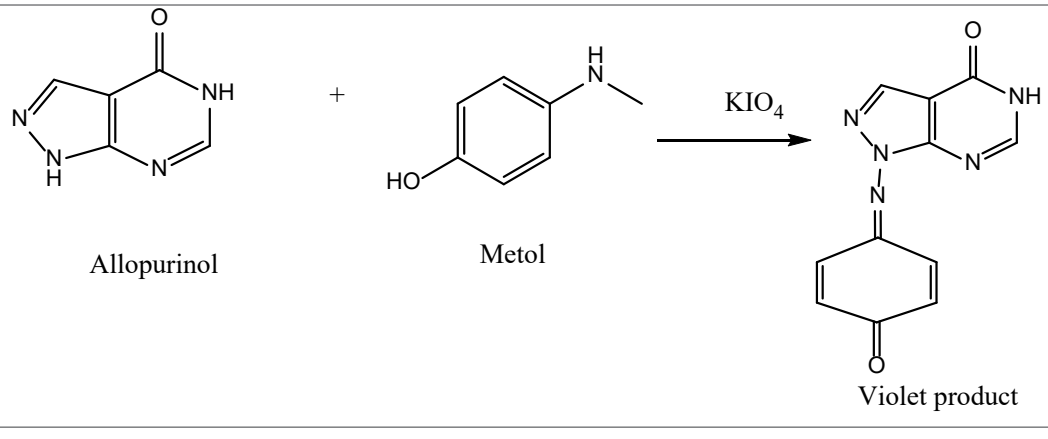


الشكل (1-5) طريقة جوب



الشكل (1-6) النسبة المولية

وعليه تكون المعادلة المقترحة:



1-3-9 التطبيقات :

أمكن تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية الحاوية على الالوبيورينول وهو المستحضر الصيدلاني على شكل حبوب (Allopurinol tablets 100 mg انتاج شركة Bristol).

1-3-9-1 طريقة القياس المباشرة:

أخذت ثلاث تراكيز مختلفة من محلول المستحضر (0.8 ، 4 ، 6.4 مايكروغرام / مل) وعوملت المحاليل بنفس الخطوات المتبعة عند تحضير منحني المعايرة ومن ثم قياس الامتصاص لها عند الطول الموجي 523 نانومتر مقابل المحلول الصوري ، و تم حساب معدل القراءات لكل تركيز بالإضافة إلى حساب الاسترجاعية والنتائج مبينة في الجدول (1-15).

الجدول (1 - 15) الاضافات المباشرة للمستحضر

Type of Pharmaceutical	Conc. of Allopurinol (taken) mg/ml	Conc. of Allopurinol (found) mg/ml	RSD,%	Recovery,%	Average Recovery
Tablet	0.8	0.85	1.21	106.25	101.47
	4	3.97	0.68	99.25	
	6.4	6.33	0.26	98.91	

تبين من الجدول أعلاه أن قيمة معدل الاسترجاعية 101.47 ٪ في الحبوب. مما يدل على نجاح الطريقة المقترحة في تقدير الالوبيورينول في المستحضرات الصيدلانية الحاوية عليه.

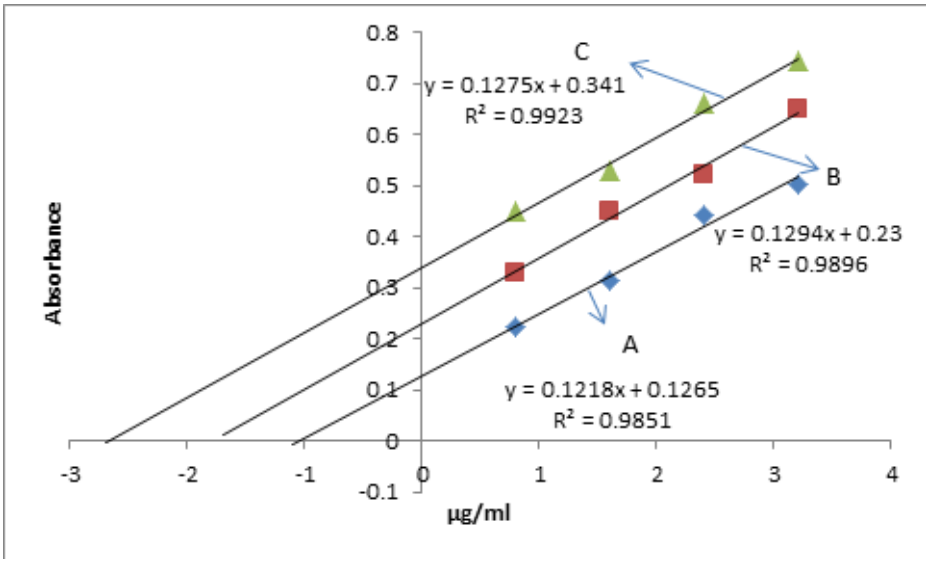
1-3-9-1 طريقة الإضافات القياسية :

من اجل بيان أن الطريقة المقترحة أعلاه خالية من التداخلات، طبقت طريقة الإضافات القياسية[14] في تقدير الالوبيورينول في مستحضراته الصيدلانية، تضمنت الطريقة اضافة كميات ثابتة (0.2 ، 0.4 مل) من محاليل المستحضرات الصيدلانية المحضرة انفا بتركيز 100 مايكروغرام/مل ، في سلسلتين من القناني الحجمية سعة 25 مل، ثم إضافة حجوم متزايدة (0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8 مل) من المحلول القياسي لالالوبيورينول النقي ذي التركيز 100 مايكروغرام/ مل ، وتم معاملة المحاليل أعلاه بنفس الطريقة المتبعة في منحني المعايرة ، حيث تم قياس الامتصاص (معدل ست قراءات) لكل محلول مقابل محلوله الصوري عند الطول الموجي 523 نانومتر، والنتائج مبينة في الجدول (1-16) والشكل (1 - 7).

الجدول (1 - 16) الاضافات القياسية للمستحضر

Type of Pharmaceutical	Conc. of Allopurinol (taken) mg/ml	Conc. of Allopurinol (found) mg/ml	RE,%	Recovery,%
Tablet	0.8	0.74	-7.5	92.5
	1.6	1.64	2.5	102.5

يتبين من نتائج الجدول أعلاه أن طريقة الإضافات القياسية متفقة وبشكل جيد مع الطريقة المباشرة ضمن المدى المقبول للخطأ مما يدل على ان الطريقة مرضية .



الشكل (1 - 7) الاضافات القياسية للالوبيورينول على شكل اقراص

A : منحني المعايرة ، B: منحني الاضافة القياسي للتركيز 0.8 مايكروغرام/ مل ،
C: منحني الاضافة القياسي للتركيز 1.6 مايكروغرام/ مل.

1-3-9-1 التقييم الاحصائي لنتائج الطريقة المقترحة

تم استخدام اختباري t و F وذلك بمقارنة الطريقة المقترحة مع الطريقة القياسية [1] والتي تتم بوزن 20 حبة تحتوي 0.1 غرام من الالوبيورينول واذابته في 20 مل من 0.05 مولاري من هيدروكسيد الصوديوم لمدة 20 دقيقة واضافة 80 مل من 0.1 مولاري حامض الخليك ثم قياس الامتصاص عند طول موجي 250 نانومتر لمعرفة مدى دقة وصلاحية التطبيقات التحليلية للطريقة المقترحة وذلك من خلال تطبيق الاختبارين[14] الاتيين:

1. اختبار t : يستخدم هذا الاختبار للمقارنة بين مصداقية الطريقتين إذ تُحسب قيمة t التجريبية من المعادلة الآتية:

$$\pm t = (\overline{X}_1 - \overline{X}_2)/S_{pooled}\sqrt{\frac{N_1N_2}{N_1+N_2}}$$

إذ أن N_2, N_1 : يمثل عدد القراءات للطريقة القياسية والطريقة المقترحة على التوالي.

$\overline{X}_1$ ، $\overline{X}_2$: يمثل معدل القراءات للطريقة المقترحة والطريقة القياسية على التوالي.

S_{pooled} : يمثل الانحراف القياسي المشترك للطريقتين ويمكن ايجاده باستخدام المعادلة الآتية:

$$S_{pooled} = \sqrt{\frac{\Sigma(X_1-\overline{X}_1)^2 + \Sigma(X_2-\overline{X}_2)^2}{N_1+N_2-2}}$$

وجد أن قيمة t التجريبية 2.07 ± أقل من قيمة t الجدولية البالغة 2.23 عند مستوى ثقة 95٪ ولعشر درجات حرية بالنسبة للمستحضر وهذا يؤكد بأنه لا يوجد فرق معنوي، وأن الطريقتان لاتختلفان من حيث المصداقية .

2. اختبار F : يتم باستخدام المعادلة الآتية لإيجاد قيمة F:

$$F = S_1^2 \ / \ S_2^2$$

إذ إن $S_1^2 > S_2^2$.

S_2^2 و S_1^2 : يمثلان التباين للطريقتين الاولى والثانية على التوالي وأن S^2 هي:

$$S^2 = \sum(X_i - \overline{X}_i)^2 / N-1$$

X_i: تمثل قراءة تحليلية معينة.

$\overline{X}_i$: معدل قراءات القيم.

N-1: مثل درجة الحرية.

وبتطبيق المعادلة الاحصائية في أعلاه وجد أن قيمة F التجريبية البالغة 2.749 أقل من قيمة F الجدولية البالغة 5.05 عند مستوى ثقة 95٪ ولاربع درجات حرية وهذا يدل على انه لا يوجد فرق معنوي بين الطريقتين، وأن الانحراف القياسي لكلتا الطريقتين ناتج عن أخطاء عشوائية، ولهذا تكون طريقة الاقتران التأكسدي المقترحة صالحة للتطبيق على المستحضر الصيدلاني.

الاستنتاج

تم تطوير طريقة طيفية حساسة ودقيقة لتقدير الالوبيورينول بتفاعل الاقتران التأكسدي حيث اعتمدت الطريقة على تفاعل الالوبيورينول مع كاشف الميتول بوجود بيريودات البوتاسيوم كعامل مؤكسد في وسط حامضي حيث يتكون ناتج ذو لون بنفسجي ووجد انه أعلى امتصاص عند الطول الموجي 523 نانومتر ويتبع قانون بير في مدى

التراكيز 7.2-0.8 مايكروغرام/ مل ووجد ان قيمة الامتصاصية المولارية 1.7×104 لتر/ مول.سم وقيمة دلالة ساندل 0.0079 مايكروغرام/ سم2 وقيمة حد الكشف 0.0629 مايكوغرام/ مل والحد الكمي0.2099 مايكروغرام/ مل حيث كانت الطريقة على درجة عالية من الدقة والتوافقية فقد كانت قيمة الاسترجاعية 100.63-99.80 ٪ وقيمة الانحراف القياسي النسبي لا تتجاوز 2.61 ٪ وقد طبقت الطريقة بنجاح على الالوبيورينول في الحبوب.

التوصيات

امكانية دراسة استخدام طرائق طيفية عديدة لتقدير عقار الالوبيورينول وامكانية دراسة استعمال عقار الترايفلوبيرازين هيدروكلوريد ككاشف اقتران مع عقار الالوبيورينول .

المصادر

British pharmacopeia on CD-ROM" 2010

A.A.Najim "A New spectrophotometric method for analysis of allopurinol in aqueous solutions and pharmaceutical preparation" Journal of Um Salma ,2009, 6(2) .

S.Dermis,E.Dinc, M.E.Kuscu, M.Biliktu, "Zero-order spectrophotometry and first-order derivative spectrophotomertry for the quantitative estimation of allopurionol a pharmaceutical formulation", Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy ", 2017, 37(2), (73-80).

W.S.Khayoon, M.Q.Al-Abaichy, M.Jasim, M.A.Al-Hamadany, "Spectrophotometric determenation of allopurinol in tablet formulation", Journal of Physical Science, 2008,19(2)..23-30.

M.Brown, A.Bye, "The determination of allopurinol and oxipurinol in human plasma and urine" Journal of Chromatography B:Biomedical Scinces and Application, 1977, 143(2), 195-202.

B.Rama, V.Venkata, B.S.Venkateswarlu, "Development and validation or reversed-phase HPLC isocaratic method for the simuitaneous estimation of iesinurod and allopurinol", Journal of pharmaceutical research, 2018,7(11), 2319-5622.

B.Rajkumar, T.Bhavy, A.A.Kumar, "Revers phase HPLC method development and validation for the simultaneous quantitative estimation of alpha lipoic acid and allopurinol in tablet ",International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences , 2014, 6 (1), 0975-1491.

X.Liu, X.J.Ni, D.W.Shang, M.Zhang, J.Q.Hu, C.Qiu, F.T.Luo, Y.G.Wen "Determination of allopurinol and oxypurinol in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" Journal of Chromatography B, 2013, 941, 10-16, 2011, 10(4).

A.B.Teradale, S.D.Lamani, S.N.Das, "UP growth effeect of cetyltrimethyl ammonium bromide determination of allopurinol and its biological activities" Anal. Bioanal. Electrochem., 2016 8(7), 814-829.

D.D. Perrin "Buffer for pH and metal ion control", Chapman and Hall, Ltd., London, 1974, p 150-151.

ثابت سعيد الغبشة ، مؤيدقاسم العباجي ، «التحليل الوصفي والحجمي» دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، 1989 ، ص421-413.

G.D.Christian ,"Analytical Chemistry" , 6th Edn , John wiley and Sons , Inc, Newyork , p90. (2004)

عبد المحسن عبد الحميد الحيدري ،((التحليل الكيميائي الألي)) المكتبة الوطنية ،دار الكتب والوثائق ،جامعة بغداد، 1999 ، ص 177-174.

D.A.Skoog, D.M.West, F.J.Holler, S.R.Crouch, "Analytical chemistry", 7th Edn., Sannders college publishing, Philadelphia, 2001, p 152-155, 135-139.