------مجلة علوم الرافدين، المجلد 25، العدد 2، ص104-121، 2014------

الاستخدام التحليلي لزرقة بروسيا في تقدير الهيدروكسي يوريا في الكبسول

قاسم محمد حسين العباسي **رشا ناظم محمود**

قسم الكيميـاء

كلية العلـوم

جامعة الموصل

(أستلم 23 / 4 / 2013 ؛ قُبل 10 / 6 / 2013)

الملخص

تضمن البحث طريقة طيفية بسيطة لتقدير مركب الهيدروكسي يوريا في الوسـط المـائي. أذ شـملت الدراسة خطوتين :

الخطوة الأولى تعتمد على اختزال ايون الحديد الثلاثي إلى الحديد الثنائي بوساطة مركب الهيدروكـسي يوريا وفي الخطوة الثانية يتم مفاعلة ايون الحديد الثنائي المتكون مع كاشف سداسي سـيانو حديـدات (III) البوتاسيوم (Potassium Ferricyanide) لتكوين صبغة بروسيا الزرقاء في وسط منظم بدالة حامـضية 4.5 وكانت الصبغة الناتجة مستقرة وذائبة بالماء وتعطي أعلى امتصاص عند الطـول المـوجي 700 نـانوميتر وتراوحت حدود قانون بير في مدى التراكيز (1 - 100) مايكروغرام هيدروكسي يوريا في حجم نهـائي 20 مللتر (0.05 – 5 جزء/ مليون) وبلغت قيمة معامل الامتصاص المولاري 2.35 × 10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$ وقيمة دلالة ساندل 0.0023 مايكروغرام/ سم^2 وان معدل قيم الانحراف القياسي النسبي كانت ± 0.33 % اعتمادا على مستوى التركيز وان نسبة ارتباط الكاشف مع ايون الحديد الثنائي كانت 1:1. وأظهر اختبـار t توافق الطريقة المقترحة مع احدى الطرائق المنشورة (Majid, 2012) لتقدير مركب الهيدروكـسي يوريـا حيث بلغت قيمة (t) 0.91 وهي اقل من قيمتها الجدولية 2.361 عند مستوى ثقة 95 % لعدد درجات الحرية =8 دلالة على مصداقية الطريقة.

وقد طبقت الطريقة بنجاح في تقدير محتوى الهيدروكسي يوريا في مستحضره الصيدلاني بشكل كبسول.

الكلمات الدالة: الهيدروكسي يوريا، زرقة بروسيا، كاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم.

Analytical Use of Prussian Blue to Assay of Hydroxyurea in Capsule

Kasim M. Al-Abbasi **Rasha N. Mahmood**
Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The research involves a simple and sensitive spectrophotometric method for the determination of hydroxyurea in aqueous solution by two steps. The first step depends on the reduction of ferric ions by hydroxyurea to ferrous ions, and in the seconed step the later reacts with potassium ferricyanide to form a stable prussian blue. This dye is soluble in water and gives absorption maxima at 700 nm. Beer's law was obeyed over the range 1-100 µg of hydroxyurea per 20 ml (i.e 0.05 – 5 ppm) with a corresponding molar absorptivety of $2.4\times10^{4}1.mol^{-1}.cm^{-1}$, Sandell's sensitivity index of 0.0032µg cm^{-2} and average relative standard deviation of ± 0.33%, depending on the concentration level, and the t-test value comes to be (0.91) which is less than its table value(2.361) at a confidence level of 95% for 8 degrees of freedom which applies credibility to the suggested method.

The method had been applied successfully to determination of hydroxyurea in capsule.

Keywords: Hydroxyurea, potassium ferricyanide, prussian blue.

المقدمة

إن تطور تقنيات الحياة وزيادة نسبة الإصابة بـالأمراض الـسرطانية جعـل البـاحثين فـي مختلـف الاختصاصات يهتمون بالبحوث والدراسات الخاصة في هذا المجال. ومن هذه الدراسات إيجاد طرائق سريعة وحساسة لتقدير الادوية المستخدمة في علاج هذه الامراض ومـن هـذه الادويـة الهيدروكـسي يوريـا أو الهيدروكسي كاربمايد ويسمى تجاريا باسماء عدة منها

(Hydrea, Marlian, Biosu pressin, Droxia and Hidroks. Us Pharmacopeial Convention,1998).

صنفت منظمة الصحة العالمية (World health organization, WHO) عقار الهيدروكسي يوريـا ضـمن الادوية النموذجية والضرورية لمعالجة المصابين بسرطان الدم والرقبة والرأس (WHO, 2009). إذ يعد من العلاجات الكيمياوية المتعلقة بعمليات الايض داخل جسم الإنسان لان عقار الهيدروكسي يوريا ينتمـي إلـى صنف مانعات الايض (Richardson, 2002) اذ يعمل على تثبـيط عمليـات تكـوين الأحمـاض النوويـة (King, 2003) وبالتالي منع نمو الخلايا السرطانية الجديدة (Zhox *et al*., 2002) لذلك أوصـت الوكالـة الأمريكية للغذاء والدواء باستخدام عقار الهيدروكسي يوريا لعلاج العديد من الامراض السرطانية لاسيما مـا يتعلق منها بامراض فقر الدم (Wang *et al*., 2002).

إن عقار الهيدروكسي يوريا فضلا عما ذكر سابقا يعد علاجاً فعالاً للـصدفية (Sharma *et al*., 2004) وفايروس العوز المناعي البشري (الايدز) HIV (Frnak *et al*., 2004) والفشل الكلوي وامـراض الجهـاز العصبي المركزي وحالات تورم الايدي والاقدام اضافة الى استخدامه في علاج الامراض السرطانية الكتلية مثل سرطان عنق الرحم (Whitey *et al*., 1997).

يتم ايض العقار المتعاطي عن طريق الكبد بمعدل زمني ما بين (3- 4) ساعات إذ يطـرح التركيـز الفائض من العقار بعد العلاج عن طريق الكلى فضلا عن طرح الغازات الناتجة من عملية ايضه عن طريق الرئتين (Rodriguez *et al*.,1998).

إن آلية عمل عقار الهيدروكسي يوريا بعد ظهور اعراض مرض فقر الدم المنجلي واستخدام العقار لمدة شهرين تكمن في قيام هذا العقار بزيادة تركيز الهيموكلوبين الجنيني (HbF) والذي بدوره يعمل علـى منـع انقسام وتكاثر الخلايا المنجلية وبالتالي منع التصاقها مع بعضها لتكوين سلسلة بولمرية تكون سبباً في انسداد الاوعية الدموية الشعرية (Charche, 1997) وهذه الالية وان كانت غير واضحة المعالم إلا أنها تعتمد علـى قيام عقار الهيدروكسي يوريا بزيادة مستويات اوكسيد النتريك (Gladwin, 2002) الذي يسبب تنشيط أنـزيم الكوا نيليل سايكليز guanylyl cyclase ثم تحفيز وانتاج انزيم الكاماكلوبين الضروري لانتاج الهيموكلـوبين الجنيني (Cokic and Smith , 2003).

كذلك لوحظ أن عقار الهيدروكسي يوريا يعمل على رفع مستوى هرمون الاريثروبيوتين الـذي تفـرزه الكلى لتنشيط وحث نخاع العظم لتصنيع المزيد من كريات الدم الحمراء وبالتالي رفع مستوى الهيموكلـوبين الجنيني لذلك استخدم هذا الهرمون مع عقار الهيدروكسي يوريا لرفع قابلية الدواء العلاجية (Platt, 2008) فضلا عن ما ذكر سابقاً فان عقار الهيدروكسي يوريا يعمل على اختزال إنتاج الـ deoxyribonucleotide عن طريق تثبـيط أنـزيم الـ ribonucleotide redutase مـن خـلال إزاحـة جـذور الـ tyrosul (Charache *et al*.,1992).

تم استخدام طرائق تحليلية بشكل واسع لتقدير مركب الهيدروكسي يوريا بعد مفاعلتـه مـع مركبـات مختلفة.

قام الباحث Majid بتطوير طريقتين طيفيتين لتقدير عقار الهيدروكسي يوريا في مستحـضر الكبـسول تعتمد الأولى على اختزال ايون الحديد الثلاثي بوساطة الهيدروكسي يوريا ثم تفاعل ايون الحديد الثنائي مـع الكاشف (2 , 2^{-} - ثنائي البيريدين) في وسط مائي عند الدالة الحامضية 2.6 وبدرجة حرارة الغرفة لتكـوين معقد احمر – وردي مستقر وذائب في الماء وقد أعطى أعلى امتصاص عند الطول الموجي 522 نانوميتر.

أما الطريقة الثانية فتعتمد على اختزال ايون السيريوم الرباعي Ce (IV) بوساطة الهيدروكسي يوريا ثم تفاعل الايون المختزل مع الكاشف آرسين آزو (III) في وسط مائي وعند الدالة الحامضية 3.5 لتكوين معقد

بنفسجي مستقر وذائب في الماء وقـد أعطـى أعلـى امتـصاص عنـد الطـول المـوجي 654 نـانومتر (Majid, 2012).

وقام الباحثان Fabricius و Rajewsky بتقدير الهيدروكسي يوريا في الدم والأنسجة باستخدام طريقة طيفية محورة تعتمد على اكسدة العقار باليود لينتج عن الأكسدة مركب النتريت الذي يعمـل علـى ازوتـة حامض السلفانيلك وبعد التخلص من كمية اليود الزائدة باختزاله بمحلول ثايوكبريتات الصوديوم ثـم اقتـران حامض السلفانيلك المؤزوت لتكوين مركب ملون تم قياس الامتصاص له عند الطول الموجي 540 نـانوميتر (Fabricius and Rajewsky,1971)

كما قام الباحث El– Kosasy بتقدير الهيدروكسي يوريا الموجود في مستحضر الكبسول طيفيا باستخدام تقنية الفلـورة ومقارنتهـا مـع طريقـة كهربائيـة باسـتخدام القياسـات المجهاديـة لأقطـاب انتقائيـة (El-Kososy, 2003).

واستخدم الباحث Jong وجماعته تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء لتقدير الهيدروكسي يوريا في بلازما الدم من خلال استخدام مكشاف كهروكيميائي (Jong *et al*., 2003).

أما الباحث Pujari وجماعته فقد طوروا طريقة أخرى لتقدير عقار الهيدروكسي يوريا في بلازما الـدم والسائل البريتوني (peritoneal) بوساطة كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء ذي الطور المتعاكس وباستخدام مكشاف كهروكيميائي (Pujari *et al*.,1997).

وقام الباحث Scoot وجماعته بتقدير عقار الهيدروكسي يوريا في مصل الدم أو البلازما وباستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز المرتبط بمكشاف طيف الكتلة GC- MS (Scott *et al*., 2010).

وتمكن الباحثان El- Yazigi و Al-Rawithi من تقدير عقار الهيدروكسي يوريا في نماذج المحاليـل والمسحوق الناعم إضافة الى مستحضر الكبسول باستخدام كروماتوغرافيا الغاز إذ تم حقن الأنموذج مع مزيج الميثانول والاسيتون في عمود فصل شعري محاط بنظام حراري مبرمج لفصل العقار عن بقيـة المركبـات وكان ارتفاع الموجة خطيا مقابل التراكيز 5 و 25 و 50 مايكروغرام/ مللتر، وتراوحت قيم معامل الارتباط ما بين 0.9942 – 0.9993 (El-Yazigi and Al-Rawithi, 1992).

كما قدر الهيدروكسي يوريا حجمياً من خلال التسحيح الايودي iodimetry وذلك بإضافة زيادة معلومة من اليود القياسي إلى محلول هيدروكسي يوريا وبعد اختزال جزء من اليود بوساطة العقار تم حساب تركيز اليود المتبقي من خلال تسحيحه مع محلـول قياسـي لثايوكبريتـات الـصوديوم باسـتخدام دليـل النـشأ (British Pharmacopoeia, 1980).

وتم في هذا البحث تقدير الهيدروكسي يوريا من خلال اختزال ايون الحديد الثلاثي الى الحديد الثنائي ثم مفاعلة الاخير مع كاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم لتكوين صبغة بروسيا والتي تعتمد اساسـا في عملية التقدير.

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة:

أجريـ ـت القياسـ ـات الطيفيـ ـة بوسـ ـاطة جهـ ـاز المطيـ ـاف الـ ـضوئي نـ ـوع Shimadzu UV - Visible Spectrophometer 160

واستخدمت خلايا بلاستيكية للمحاليل المائية وخلايا كوارتز في حالة استخدام المـذيبات العـضوية وبطـول مسار ضوئي (1سم) وتم قياس الدالة الحامضية للمحاليل بوساطة جهاز نوع HANA Instruments pH 211 microprocesser pH Metter إضافة إلى استخدام ميزان حساس نوع Sartorius B1 2015.

المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة:

جميع المواد الكيمياوية المستخدمة كانت على درجة عالية من النقاوة. أما المحاليل المستخدمة فشملت:

محاول الهيدروكسي يوريا القياسي (500 مايكروغرام /مللتر):

حـضر هـذا المحلـول باذابـة 0.0125 غـرام مـن مـسحوق الهيدروكـسي يوريـا (المجهز من معمل أدوية نينوى NDI) بالماء المقطر وإكمال الحجم إلى 25 مللتر باستخدام قنينة حجميـة، وتم حفظ المحلول بمكان مظلم وبارد وكان المحلول مستقراً لمدة شهر.

محاول الهيدروكسي يوريا التجريبي (100 مايكروغرام/ مللتر):

حضر هذا المحلول بتخفيف 20 مللتر من المحلول القياسي إلى 100 مللتر بالماء المقطر باستخدام قنينة حجمية وتم حفظه بنفس الظروف السابقة.

المحلول المنظم (pH=4.5):

حضر هذا المحلول بمزج 4.15 مللتر من محلول 2 مولاري من خلات الصوديوم مع 5.82 مللتر من 2 مولاري مـن حـامض الخليـك وخفـف بالمـاء المقطـر إلـى 100 مللتـر باسـتخدام قنينـة حجميـة (Perrmin and Dempsey, 1974).

محلول ايون الحديد الثلاثي (1.3×10^{-3}) مولاري:

حضر هذا المحلول باذابة 0.0213 غم من $FeCl_3$ اللامائي في الماء المقطر المضاف اليه 3 قطرات من حامض الهيدروكلوريك المركز مع التسخين ثم خفف الحجم بالماء المقطر إلى 100 مللتـر بقنينـة حجميـة وحفظ المحلول في مكان مظلم.

محلول الكاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم (1.3×10^{-3}) مولاري:

حضر هذا المحلول باذابة 0.0428 غم من الكاشف $K_3[Fe(CN)_6]$ في الماء المقطر واكمل الحجم إلى 100 مللتر في قنينة حجمية وكان المحلول مستقراً لمدة 15 يوماً.

محاليل المتداخلات (1000 مايكروغرام/ مللتر)

تم تحضيرها بإذابة 0.1 غم من كل مادة في 100 مللتر من الماء المقطر باستخدام قناني حجمية.

محاول الكبسول (500 ملغم هيدروكسي يوريا – كبسول):

حضر المحاول بإذابة كمية من مسحوق كبسولة واحدة بما يكافئ 0.0500 غم من الهيدروكسي يوريـا الحر لكي يتضمن مدى التراكيز المطبقة بالمنحنى القياسي وتم التخفيف بالماء المقطر.

محاليل الطريقة المنشورة في الادبيات:

تم تحضير المحاليل المستخدمة في الطريقة الموسومة، التقدير الطيفي للهيدروكسي يوريا في مستحضر صيدلاني (Majid, 2012 **)**.

النتائج و المناقشة

تم استخدام تركيز 50 مايكروغرام/ مللتر من الهيدروكسي يوريا في حجم نهائي 20 مللتـر للتجـارب اللاحقة مع حجم 1.5مللتر لكل من العامل المؤكسد والكاشف وتم قياس الامتصاص للمحاليل مقابل المحلـول الصوري.

مبدأ الطريقة: تتضمن الطريقة الطيفية الحالية خطوتين أساسيتين:

الخطوة الأولى: تعتمد على تفاعل الأكسدة والاختزال بين الهيدروكسي يوريا وايون الحديد الثلاثـي والـذي يختزل إلى ايون الحديد الثنائي بوساطة مركب الهيدروكسي يوريا.

الخطوة الثانية: تتضمن تفاعل ايون الحديد الثنائي المتكون مع الكاشـف سداسـي سـيانو حديـدات (III) البوتاسيوم فيتكون معقد ملون ازرق يعطي اعلى امتصاص عند الطول الموجي 700 نانوميتر وتم تثبيت هذا الطول الموجي في التجارب اللاحقة.

دراسة الظروف المثلى للتفاعل:

تمت دراسة تأثير مختلف الظروف المؤثرة في امتصاص المعقد المتكون في المحلول المائي.

تأثير الدالة الحامضية:

تم ضبط الدالة الحامضية المثلى للحصول على تفاعل جيد بين ايون الحديد الثنائي مع الكاشف سداسـي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم لتكوين صبغة ملونة ذائبة في الماء ومستقرة ذات امتـصاص عـالي، فقـد حضرت محاليل بدوال حامضية مختلفة وذلك باضافة حجوم مختلفة مـن خـلات الـصوديوم بتركيـز 0.1 مولاري إلى مزيج التفاعل واكمل الحجم إلى 20 مللتر بالماء المقطر واجريت قياسـات الامتـصاص لكـل محاول مقابل المحاول الصوري عند الطول الموجي 700 نانوميتر، ثم قيست الدالة الحامضية النهائية لكـل محاول وكما مبين في الجدول (1).

الجدول 1: تأثير إضافة خلات الصوديوم على امتصاص المعقد الملون

ml of 0.1 M sodium acetate solution	Absorbance*		pH
	Sample vs blank	Blank vs distilled water	
0	Turbid	0.011	2.50
0.1	Turbid	0.012	2.63
0.3	Turbid	0.010	2.85
0.5	Turbid	0.008	3.31
0.7	0.425	0.006	3.62
0.9	0.557	0.006	3.90
1.0	0.675	0.005	4.13
1.3	0.678	0.004	4.36
1.5	0.679	0.004	4.50
1.7	0.678	0.004	4.63
1.9	0.678	0.004	4.72
2.0	0.671	0.005	4.85
2.3	0.669	0.004	5.25
2.5	0.668	0.005	5.45

*Measured at 700 nm

من نتائج الجدول (1) نلاحظ ان اعلى امتصاص تم الحصول عليه عند الـدوال الحامـضية مـا بـين (4.36 و 4.72) وتم اختيار الدالة الحامضية 4.5 كقيمة وسطية، ولضبط هذه الدالة في محلول التفاعـل تـم تحضير محاليل منظمة بهذه القيمة ودراسة تاثيرها في امتصاص المعقد الملون المتكون وشـملت المحاليـل المنظمة المختارة:

Sodium acetate – acetic acid (B_1), Citric acid – NaOH (B_2) Formic acid – sodium formate (B_3) and Tartaric acid – NaOH (B_4)

والجدول (2) يوضح تأثير المحاليل المنظمة بكميات مختلفة على شدة اللون والدالة الحامضية لخليط التفاعل النهائي.

الجدول 2: تأثير المحاليل المنظمة على امتصاص المعقد المتكون

ml of buffer solution	Absorbance / ml of buffer solution added			
	B_1	B_2	B_3	B_4
1.0	0.682	0.612	0.315	0.377
2.0	0.698	0.625	0.301	0.378
2.5	0.736	0.630	0.312	0.376
3.0	0.738	0.633	0.315	0.377
3.5	0.738	0.631	0.317	0.379
4.0	0.737	0.632	0.314	0.378
5.0	0.737	0.630	0.315	0.375
6.0	0.736	0.632	0.315	0.374
Final P^H	4.35-4.71	4.31-4.65	3.09- 4.32	3.92- 4.39

يلاحظ من النتائج في الجدول (2) ان المحلول المنظم B_1 يعطي افضل امتصاص مقارنة مع باقي المحاليل المنظمة وقد تم اختيار حجم 3 مللتر من B_1 في التجارب اللاحقة لاعطائه اعلى امتصاص للمعقد الملون المتكون. كذلك تم دراسة تاثير تسلسل اضافة المحلول المنظم الجدول (3).

الجدول 3: تسلسل إضافة المحلول المنظم على الامتصاص

Serial number	Order	Abs. sample vs blank	Abs. blank vs distilled water
I	Hu +O +B+R	0.741	0.004
II	Hu+B+O+R	0.335	0.005
III	Hu+O+R+B	Turbid	0.005

Hu = Hydroxyurea, B= Buffer, R= Reagent , O= Oxidant(Fe^{+3})

من النتائج المبينة في الجدول (3) تم اعتماد التسلسل I في التجارب اللاحقة لأنه اعطى افضل امتصاص بينما التسلسل II اعطى امتصاصاً قليلاً والتسلسل III اعطى محلولاً معكراً.

تأثير كمية العامل المؤكسد (Fe^{+3})

تمت دراسة تأثير حجوم مختلفة من العامل المؤكسد بتركيز 1.3×10^{-3} مولاري على امتصاص المحاليل الحاوية على كميات مختلفة من الهيدروكسي يوريا والنتائج موضحة في الجدول (4).

الجدول 4: تأثير كمية العامل المؤكسد

ml of oxidant solution (1.3×10^{-3}M)	Absorbance / µg of hydroxyurea						
	5	10	25	50	75	Blank	r^2
1.0	0.061	0.134	0.261	0.518	0.815	0.005	0.997
2.0	0.070	0.140	0.358	0.748	1.089	0.004	0.999
2.5	0.074	0.150	0.371	0.754	1.137	0.004	0.999
3.0	0.076	0.151	0.379	0.755	1.138	0.004	0.999
5.0	0.071	0.148	0.372	0.755	1.132	0.005	0.999
7.0	0.059	0.148	0.370	0.753	1.127	0.005	0.999

توضح نتائج الجدول (4) ان الحجوم من2-7 مللتر من العامل المؤكسد أعطت اعلى امتصاصاً وتم اختيار الحجم 3 مللتر لضمان استقرار الامتصاص واستخدم في التجارب اللاحقة.

تأثير كمية الكاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم

تمت دراسة تأثير حجوم مختلفة من الكاشف بتركيز 1.3×10^{-3} مولاري على امتصاص المحاليل الحاوية على كميات مختلفة من الهيدروكسي يوريا.

الجدول 5 : تأثير كمية الكاشف

ml of reagent solution (1.3×10^{-3} M)	Absorbance / µg of hydroxyurea						
	5	10	25	50	75	Blank	r^2
1.0	0.065	0.131	0.268	0.521	0.820	0.005	0.997
2.0	0.060	0.131	0.341	0.731	1.055	0.004	0.998
2.5	0.073	0.151	0.382	0.774	1.148	0.004	0.999
3.0	0.0741	0.154	0.385	0.775	1.151	0.004	0.999
5.0	0.073	0.151	0.385	0.773	1.149	0.004	0.999
7.0	0.065	0.151	0.363	0.771	1.132	0.004	0.999

يوضح الجدول (5) ان حجم 3 مللتر من الكاشف أعطى أفضل نتائج وعليه استخدم في اجراء التجارب اللاحقة.

تأثير زمن اختزال الحديد الثلاثي

تم دراسة تأثير الزمن اللازم لإتمام عملية اختزال الحديد الثلاثي بعدها تم إضافة محلول الكاشـف ثـم قيس الامتصاص ضد المحلول الصوري وكما في الجدول رقم (6A).

الجدول A6 : تأثير زمن اختزال الحديد الثلاثي

Time / min.	Absorbance
Immediately	0.741
5	0.776
10	0.775
20	0.775
30	0.776

يلاحظ من النتائج في الجدول (6A) ان التفاعل سريع لاتمام عملية الاختزال ومع هذا تم اختيار الـزمن 5 دقائق لضمان الاختزال الكامل واستخدم هذا الزمن في التجارب اللاحقة.

وكذلك تمت دراسة الزمن بعد إضافة محلول الكاشف إلى محلول الهيدروكسي يوريا ومحلول العامل المؤكسد والنتائج مبينة في الجدول رقم (6B).

الجدول B6: تأثير زمن إضافة الكاشف

Time / min.	Absorbance
Immediately	0.760
5	0.775
10	0.774
20	0.775
30	0.773

نلاحظ من النتائج في الجدول (6B) أن لون الصبغة يتكون بسرعة وان زمن إضافة الكاشف ليس له تـأثير ومع هذا تم اختيار زمن 5 دقائق بوصفه زمناً مناسباً لاستقرار الصبغة الملونة في التجـارب اللاحقـة.

تأثير المواد الفعالة سطحيا

تستخدم المواد الفعالة سطحيا في الطرائق الطيفية لتحسين ناتج التفاعل لأنها تعمل امـا علـى زيـادة الحساسية او ازاحة الطول الموجي للمعقد الملون المتكون باتجاه الازاحة الحمراء فضلا عن زيـادة قابليـة ذوبان المركبات العضوية في الماء.

تمت دراسة تأثير المواد الفعالة سطحيا من خلال إضافة 3 مللتر من أنواع مختلفة من المـواد الفعالـة سطحيا الموجبة والسالبة والمتعادلة إلى محلول التفاعل وبتسلسلات مختلفة والنتائج موضحة في الجدول (7).

الجدول 7: تأثير المواد الفعالة سطحيا

Surfactant solution (3 ml)	Absorbance / order of addition				
	I	II	III	IV	V
CTAB, 1×10^{-3} M	0.775	Turbid solution			
Triton X -100, 1%	0.776	0.731	0.732	0.740	0.737
SDS, 1×10^{-3} M	0.775	0.753	0.754	0.761	0.762

I=Hu+O+B+R+DW, II= Hu+S+O+B+ R+D, III= Hu+O+S+B+R+DW
IV=Hu+O+B+S+R+DW, V=Hu+O+B+R+S+DW

اذ ان S= Surfactant وان DW=distilled water.

من النتائج في الجدول (7) نلاحـظ بعـدم وجـود تأثيرمحـسوس لمـواد الـشد الـسطحي علـى قيمـة الامتصاص للمعقد الناتج لذا تم استبعادها.

استقرارية ناتج التفاعل

تمت دراسة تأثير الزمن على الامتصاص للمحلول الملون عنـد أزمـان مختلفـة. اذ تمـت دراسـة الاستقرارية لثلاث تراكيز مختلفة من الهيدروكسي يوريا (25 و 50 و 75 مـايكروغرام/ مللتـر) وكانـت النتائج كما في الجدول (8).

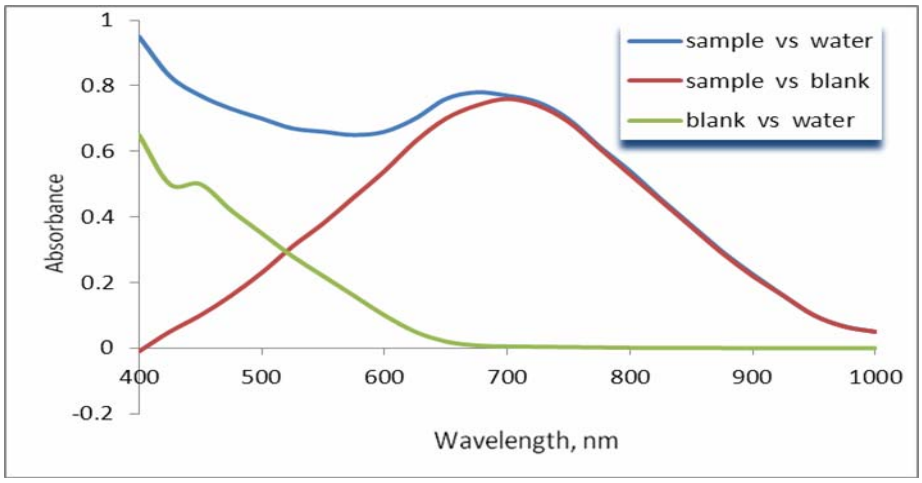
الجدول 8: تأثير الزمن على نتائج التفاعل

Time (min.)	Absorbance /µg hydroxyurea		
	25	50	75
0	0.362	0.758	1.145
5	0.378	0.775	1.157
15	0.379	0.776	1.158
30	0.378	0.775	1.157
40	0.378	0.775	1.156
50	0.378	0.774	1.157
60	0.377	0.775	1.157

من النتائج المبنية في الجدول (8) يلاحظ ان الناتج المتكون مستقراً لمدة ساعة وهـذا يكفـي لإكمـال الإضافات وأجراء عدة قياسات في نفس الوقت.

طيف الامتصاص النهائي

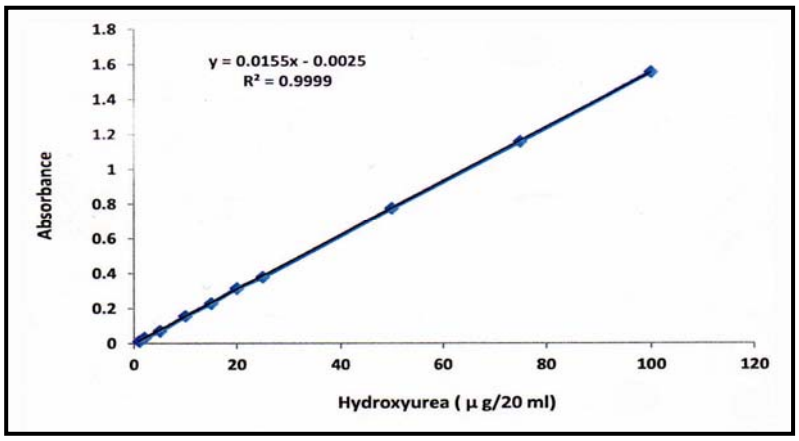
تم رسم الطيف النهائي للناتج الملون المتكون من معاملة 50 مايكروغرام من الهيدروكسي يوريا وفـق الطريقة المقترحة، والشكل (1) يبين طيف الامتصاص النهائي للناتج الملـون المتكـون مقابـل المحلـول الصوري عند الطول الموجي 700 نانوميتر والذي تم اعتماده في التجارب اللاحقة فضلا عـن ان الـشكل يحتوي على طيف امتصاص الناتج الملون مقابل الماء المقطر وطيف امتصاص المحلول الـصوري مقابـل الماء المقطر.



الشكل 1: طيف الامتصاص النهائي لـ 50 مايكروغرام من الهيدروكسي يوريا

طريقة العمل المعتمدة والمنحنى القياسي

تم الحصول على المنحنى القياسي بإضافة حجوم متزايدة من محلول 50 مـايكروغرام /مللتـر مـن الهيدروكسي يوريا إلى مجموعة من القناني الحجمية سعة 20 مللتر ثم اضيف حجم 3 مللتـر مـن العامـل المؤكسد بتركيز 1.3×10^{-3} مولاري وبعد مرور 5 دقائق اضيف حجم 3 مللتر من المحلول المنظم بعـدها اضيف حجم 3 مللتر من الكاشف المستخدم بتركيز 1.3×10^{-3} مولاري، واكمل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة وبعد مرور زمن قدره 5 دقائق تم قياس الامتصاص عند الطـول المـوجي 700 نـانوميتر مقابـل المحلول الصوري ومن خلال رسم الامتصاصات مقابل التراكيز تم الحصول على المنحنى القياسي الموضح بالشكل (2).

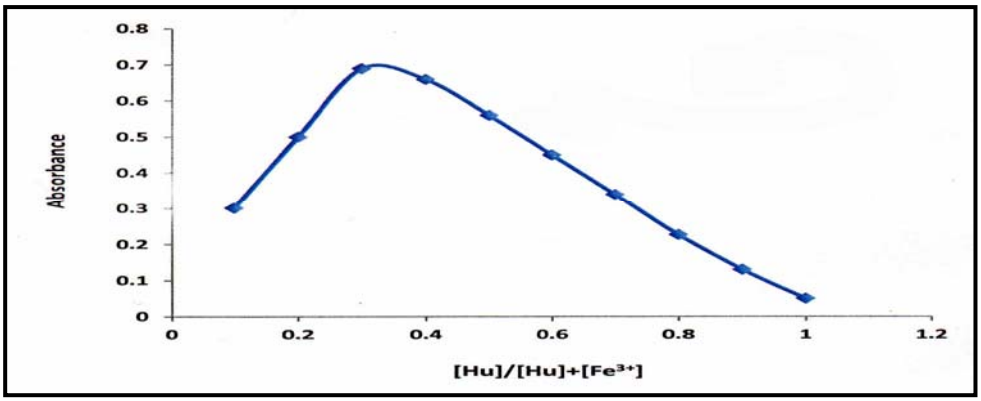


الشكل 2: المنحنى القياسي لتقدير الهيدروكسي يوريا اعتماداً على تفاعل الحديد الثنائي الناتج مع الكاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم

يبين الشكل (2) ان الطريقة المقترحة تتبع قانون بير بمدى تراكيز من (1-100) مـايكروغرام مـن الهيدروكسي يوريا/ 20 مللتر حجم نهائي والذي يعادل(0.05 -5) جزء لكل مليون، وبلغـت قيمـة معامـل الامتصاص المولاري 2.35×10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$ وقيمة دلالة ساندل 0.0032 مـايكروغرام/ سـم^2. كانت قيمة معامل التقدير للمنحني القياسي جيدة اذ بلغت r^2=0.999 مما يؤكد ان المنحنى القياسـي يمتلـك مواصفات خطية عالية.

طبيعة الناتج المتكون

استخدمت طريقة التغايرات المـستمرة (Job's method of continuous variations) لايجـاد نـسبة التفاعل بين الهيدروكسي يوريا والحديد الثلاثي إذ تم تحضير عدد من المحاليل التي تحتوي على الحجوم من (0-5) مللتر من الهيدروكسي يوريا وحجوم مكملة إلى (5) مللتر من العامل المؤكسد وبتراكيز 6.5×10^{-4} مولاري لكل واحد منهما ثم اضيفت الحجوم المثلى من المحلول المنظم والكاشف واكمل الحجم إلى 20 مللتر بالماء المقطر في قنينة حجمية ثم قيس الامتصاص لكل أنموذج مقابل محلوله الصوري والنتائج موضحه في الشكل (3).

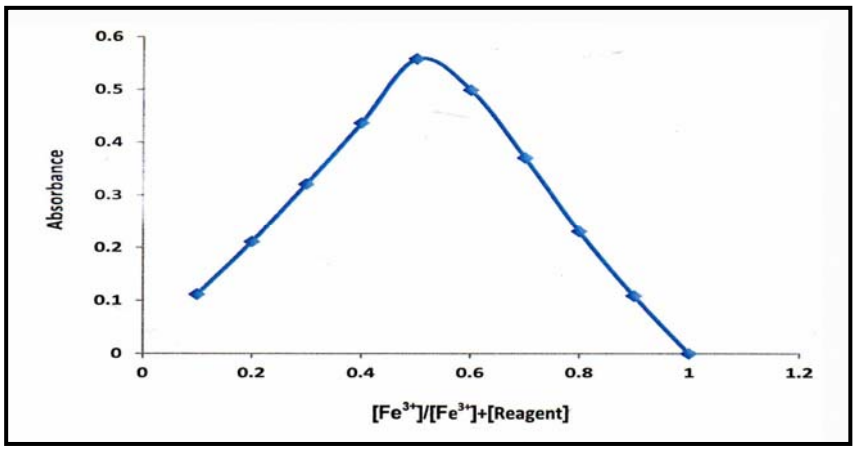


الشكل 3: المنحنى الناتج باستخدام طريقة التغايرات المستمرة بين (Fe^{+3}: Hu)

يلاحظ من الشكل رقم (3) إن النسبة المولية بين Hu: Fe^{+3} كانت 2:1 وعليه يكون التفاعل المقترح متوافق مع المعادلة الآتية (Kujundzic *et al.*, 2004)

$$H_2NCONHOH + 2Fe^{+3} \rightarrow \text{mono(hydroxyureato) iron(lll)} \rightarrow 2\ Fe^{+2} + NH_4^+ + CO_2 + 1/2\ N_2$$

وبنفس الطريقة تم اجراء طريقة التغايرات المستمرة بين Fe^{+2} والكاشف $K_3\ [Fe(CN)_6]$ إذ تم تحضيرهما بتركيز 6.5×10^{-4} مولاري لكل واحد منهما واتباع نفس الطريقة اعلاه والنتائج موضحة في الشكل رقم (4).



الشكل 4: المنحنى الناتج باستخدام طريقة التغايرات المستمرة بين Fe^{+2} : $K_3\ [Fe(CN)_6]$

يلاحظ من الشكل رقم (4) ان النسبة المولية بين Fe^{+2} : $K_3\ [Fe(CN)_6]$ كانت 1:1. والصيغة المقترحة لزرقة بروسيا هي $KFe[Fe(CN)_6]$ (Buser *et al.*, 1977).

ثابت استقرار الناتج الملون

تم حساب ثابت الاستقرارية للناتج الملون المتكون من تفاعل ايون الحديد الثنائي مع الكاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم بنسبة 1:1 وذلك بتحضير محاليل تحتوي على نسبة مولية متساوية من كلا المادتين وتم قياس امتصاص الناتج والذي يعبر عنه بالقيمة (As) ثم قيس امتصاص نفس المحاليل تحتوي نفس الكمية من الحديد الثنائي وكمية زائدة من الكاشف والذي يعبر عنه بالقيمة (Am) وبعد ذلك طبقت العلاقة التالية:

$$K = \frac{1 - \alpha}{\alpha\ (n\ \alpha\ C)^n}$$

ومن هذه العلاقة وحسب نسبة الارتباط 1:1 تصبح المعادلة

$$K = \frac{1 - \alpha}{\alpha^2\ C}$$

إذ ان:

K= ثابت الاستقرارية للمعقد الناتج

C = التركيز المولاري للهيدروكسي يوريا

α = درجة التفكك وتتمثل بـ (Am-As)/Am

ومن نتائج الجدول (9) نلاحظ ان معدل قيم ثابت الاستقرار $K= 5.4 \times 10^5\ M^{-1}$ وهذا يدل على ان زرقة بروسيا ذو استقرارية جيدة.

الجدول 9: يبين قيم ثابت الاستقرارية

Hydroxyurea (µg/ml)	Absorbance		α	$K\times10^{-5}(M^{-1})$
	As	Am		
20	0.109	0.310	0.648	6.3
40	0.320	0.605	0.471	4.5
60	0.565	0.912	0.380	5.4

تأثير المذيبات العضوية

تمت دراسة تأثير عدد من المذيبات العضوية على الخواص الطيفية للناتج المتكون وتم قياس الامتصاص لهذه المحاليل مقابل المحلول الصوري لها. والجدول (10) يوضح النتائج المستحصلة.

الجدول 10: تأثير المذيبات العضوية

Solvent	Abs . λ_{max} at 700 nm.	$\varepsilon_{max} \times 10^{-4}$, $1.mol^{-1}.cm^{-1}$
Acetone	1.100	3.3
1,4 Dioxane	0.832	2.5
DMSO	0.741	2.3
Ethanol	0.877	2.6
Formic acid	0.518	1.6
Methanol	0.741	2.3
n-Propanol	0.904	2.7
Pyridine	0.058	0.18
Water	0.776	2.4

يوضح الجدول (10) ان الماء يبقى المذيب المفضل لان معظم المذيبات العضوية غالية الثمن فضلا عن مخاطرها الصحية اثناء الاستخدام مع عدم توفر بعضها.

تأثير المتداخلات

لغرض معرفة انتقائية الطريقة وإمكانية تطبيقها على الأقراص الدوائية، تمت دراسة تأثير تداخل عدد من المضافات الدوائية حيث أضيفت كميات مختلفة من المتداخلات إلى 50 مايكروغرام من محلول الهيدروكسي يوريا في قناني حجمية سعة 20 مللتر مع إضافة بقية مكونات التفاعل بالكميات المثلى والتسلسل المعتمد ثم قيس الامتصاص عند الطول الموجي 700 نانوميتر وتم مقارنة هذه النتائج مع المحلول القياسي الذي لا يحتوي على اية كمية من المتداخلات والجدول (11) يوضح النتائج.

الجدول 11: تأثير المتداخلات

Foreign compounds	Recovery % of 50 µg hydroxyurea / µg foreign compound present			
	25	50	100	500
Ascorbic acid	112.7	130.4	162.7	350.9
Citric acid	99.5	99.8	100.5	66.3
Glucose	99.5	99.8	99.3	102.1
Gum acacia	100.5	100.9	101.9	103.7
Hydrazine sulphate	101.1	100.2	103.2	113.8
Hydroxylamine HCl	117.3	135.2	182.9	361.5
Lactose	91.7	89.7	88.8	88.5
Paracetamol	107.9	115.2	123.9	142.7
Starch	98.7	100.1	97.3	100.8
Sorbitol	99.3	99.0	98.2	99.7
Sodium hydrogen phosphate	80.3	78.5	74.7	81.9
Sodium dodecyl sulphate	98.2	95.3	92.3	88.5
Thiourea	121.1	130.9	158.1	205.1
Urea	92.4	93.2	94.8	92.8

يلاحظ من النتائج في الجدول (11) ان معظم المواد المتداخلة هي خارج المواد المضافة إلـى الـدواء النقي لتحويله إلى عقار يستعمل كعلاج.

الجزء التطبيقي

تم تطبيق الطريقة المقترحة لتقدير الهيدروركسي يوريا في الكبسول وذلك باخذ تراكيـز 20 و40 و60 مايكروغرام من محلول القرص الدوائي المحضر مسبقا، والنتائج موضحة في الجدول(12).

الجدول 12: الجزء التطبيقي للطريقة

Hydroxyurea amount (µg)	Absorbance		Recovery*, %	RSD*,%
	Pure drug	Assay		
20	0.315	0.322	102.2	±0.34
40	0.631	0.619	98.1	±0.32
60	0.930	0.938	100.9	±0.33

* Average of five determinations

تشير النتائج أعلاه إلى نجاح الطريقة المقترحة للتقدير

مقارنة الطريقة

لأجل إثبات إن الطريقة المقترحة للتطبيق خالية من التداخلات فقد تم اختيار طريقة مثبتة في الأدبيـات للمقارنة (Majid, 2012) إذ تم تقدير الهيدروكسي يوريا باستخدام كلتا الطريقتين وتـم اعتمـاد اختبـار (t) كمعيار للتوافق بين الطريقتين وكما يلي:

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

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

X_1 و $\overline{X_1}$ = النسبة المئوية ومعدل قيمها على التوالي للاستعادة حسب الطريقة المقترحة .

X_2 و $\overline{X_2}$ = النسبة المئوية ومعدل قيمها على التوالي للاستعادة حسب طريقة المقارنة .

N_1 و N_2 = عدد القراءات التي قيست حسب الطريقة المقترحة وطريقة المقارنة على التوالي.

الجدول 13: قيم اختبار (t) ومقارنة الاسترجاعية للطريقتين

Drug amount	Recovery, % *		(t) practical value
	Present method	Literature method**	
Hydroxyurea 50 µg of (500 mg/capsule)	99.84	99.88	0.91

* Average of five determinations. ** (Majid, 2012)

يلاحظ من قيمة اختبار (t) المحسوبة عمليا أنها اقل من قيمتها النظرية المأخوذة من الجدول الإحصائي (Christain, 2004) عند مستوى ثقة 95% والتي تساوي (2.361) مما يدل على ان الطريقة المقترحة لتقدير الهيدروكسي يوريا ذات مصداقية جيدة من خلال مقارنتها مع الطريقة المنشورة.

تمت مقارنة الطريقة والجدول (14) يبين نتائج المقارنة بين الطريقة المقترحة والمستخدمة للمقارنة.

الجدول 14: المقارنة بين الطريقة المقترحة والطريقة المنشورة

Analytical parameter	Literature method *	Present method
pH	2.6	4.5
λ_{max} , nm.	522	700
Principal reagent	2,2¯ – bipyridyl	$K_3[Fe(CN)_6]$
Determination range	(0.25 – 7.5)ppm	(0.05 -5) ppm
ε_{max} , $l.mol^{-1}.cm^{-1}$	1.7×10^4	2.35×10^4
Reaction stoichiometry	1:3	1:1
RSD, %	± 0.9	± 0.33
Application	Hydroxyurea in capsule	Hydroxyurea in capsule

* (Majid, 2012)

تبين نتائج الجدول (14) ان الطريقة المقترحة أكثر حساسية من الطريقة المستخدمة للمقارنـة ويمكـن ملاحظة ذلك من قيمة معامل الامتصاص المولاري.

الاستنتاجات

تبين من خلال الدراسة الحالية لتقدير الهيدروكسي يوريا في المستحضر الصيدلاني بطريقة الاكسدة والاختزال المتبوعة بالتقدير الطيفي، أنها تمتاز بالدقة فضلا عن كونها طريقة سهلة وسريعة، وتعتمد على اختزال الحديد الثلاثي بوساطة الهيدروكسي يوريا ثم مفاعلة الحديد الثنائي المختزل مع الكاشف سداسي سيانو حديدات (III) البوتاسيوم لينتج معقداً مستقراً ذا لون ازرق اعطى اعلى امتصاص عند الطول الموجي 700 نانوميتر. وتم تطبيق الطريقة بنجاح في تقدير المركب الدوائي قيد الدراسة في مستحضره الدوائي (الكبسول).

المصادر

British Pharmacopoeia, (1980). "Her Majesty's Stationery Office". London, UK. 231 p.

Buser, H.J.; Schwarzenbach, D.; Peter, W.; Ludi, L. (1977). Formation and stability of iron blue. *Inorg. Chem.*, **16**, 2704-2710.

Charche, S. (1997). Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Semin. Hematol*. **34**, 15-21.

Charche, S.; Dover, G.J.; Moore, R.D. (1992). Hydroxyurea effect on hemoglobin fetal production in patients with sickle cell anemia. *J. Blood*, **79**, 2556-2556.

Christain ,G.D.(2004). "Analytical Chemistry". 6th ed. John Wiley and Sons, Inc., 90 p.

Cokic, V.P.; Smith, R.D. (2003). Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide – dependent activation of soluble guanylyl cyclose. *J. Clin. Iinvest.,* **23**(2), 231-239.

El-Kososy, A.(2003). Determination of hydroxyurea in capsules and biological fluids by ion- selective potentiometry and fluorimetry. *J. AOAC Intern.*, **86**, 15-21.

El-Yazigi, A.; Al- Rawithi, S.(1992). Analysis of hydroxyurea in capsules and aqueous solution and stability study with capillary gas chromatography and thermionic (N-P) specific detection. *Pharm. Res.*, **9**, 1-10.

Fabricius, E.; Rajewsky, F. (1971). Determination of hydroxyurea in mammalian tissues and blood. *Rev. Eur. Etudes Chin. Biol.*, **16**, 679-683.

Frank, I.; Bosch, R.J.; Fiscus, S. (2004). Activity, safety and immunological effects of hydroxyurea added to didanosice in antiretroviral – naive and experienced HIV type 1-infected subjects: a randomized, placebocontrolled trial. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **20** (9), 916-926.

Gladwin, M.T. (2002). Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *British J. Hematol.*, **16**, 436-444.

Jong, Y.; Hsu, H.; Wu, H.; Kou, H.; Kou, S. (2003). Analysis of hydoxyurea in human plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta*, **488**, 223- 230.

King, S.P. (2003). Nitric oxide production from hydroxyurea. *Current Med. Chem.,* **10**, 437-452.

Kujundzic, N.; Binigoric; Sankovic, K. (2004). Reaction of hydroxyurea with iron (III): products and the stoichiometry of the redox reaction. *J. Inorg. and Gen. Chem.,***15**, 2749-2753.

Magid, Z.W. (2012). Spectrophotometric assay of hydroxyurea in capsule. M.Sc. Thesis University of Mosul, College of Science, pp.26-28.

Pemin, D.; Dempsey, B. (1974). "Buffers for pH and Metal Ion Control ". John Wiley and Sons, Inc., New York, 135 p.

Platt, O.S. (2008). Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.*, **358**(13),1362-1369.

Pujari, M.P.; Barrientos, A.; Muggia, F.M.; Koda, R.T. (1997). Determination of hydroxyurea in plasma and peritoneal fluid by high – performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl*., **694**(1), 185-191.

Richardson, L.; Nt. D. (2002). The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cell. *Biochem. Biophys. Acta*, 1603-1610.

Rodriguez, G.I.; Kuhn, J.G.; Weiss, G.R.; Hilsenbeck, S.G.; Eckardt, J.R.; Thurman, A.; Rinaldi, D.A.; Hodges, S.; Von Hoff, D.D.; Rowinsky, E.K. (1998). A bioavibility and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *J. Blood*, **91**, 1533-1554.

Scott, D.; Neville, K.; Garg, Y. (2010). Determination of hydroxyurea in serum or plasma using gas chromatography – mass spectrometry determination of hydroxyurea by different method, published in pubmed will retrieve 94 records methods. *Mol. Biol.*, **603**, 279-287.

Sharma, V.K.; Dutta, B.; Ramam, M. (2004). Hydroxyurea as an alternative therapy for proriasis . *Indian J. Derm. Vonereol Leprol*., **70**(1),13-17.

US Pharmacopeial Convention USP Dispensing information, (1998). "Drug Information for the Health Care Professional". Vol. I, 18th ed., Rockville, MD, pp. 1607-1609.

Wang, W.C.; Helms, R.W.; Lynn, H.S. (2002). Effect of hydroxyurea on growth in children with sickle cell anemia . Results of the HUG – KIDS study. *J. Pediatr*., **140**(2), 255-259.

WHO, (2009). "Proposal for the Inclusion of Hydroxyurea in the WHO Model List of Essential Medicines". 17th, expert committee on the selection and use of essential medicines, Geneva.

Whitey, C.; Sause, W.; Bundy, B.N.; Malfetano, J.H.; Hannigan, E.V.; Fowler, W.C.; Clarke, D.L.; Liao, S.W.; Oncol, J.C. (1997). Arandomized comparison of fluorourea cil plus ciplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stages II B- IV A carcinoma of the cervix with negative para – aortic lymph nodes. *J. Clin. Oncol.*, **17,** 1339-1348.

Zhox, B.; Mi, S.; Mo, X.; Shih, J.; Tsai, J.; Hsu, M.; Yen, Y.(2002). Time and sequence dependence of hydroxyurea in combination with gemcitabin in human KB Cells. *Anticancer Res*., **22**, 1369-1377.