التقدير الطيفي للكلورامفينكول (بعد الاختزال) بطريقة الأزوتة والإقتران باستخدام كاشف الفلوروكلوسينول – التطبيق على قطرة العين

ا.د. وعد الله عبد العزيز بشير — **استاذ**

قسم الكيمياء/كلية العلوم/ جامعة الموصل

د. تماضر عباس حمودي — **مدرس**

كلية طب نينوى/جامعة الموصل

ABSTRACT

A spectrophotometric method for the assay of micro amounts of chloramphenicol was developed. This method is based on the reduction of the nitro-group of chloramphenicol to amino-group, followed by diazotization and coupling with phloroglucinol in alkaline medium to form a stable yellow azo dye which shows maximum absorption at 419 nm. Beer's law is obeyed over the concentration range (0.4 – 40) ppm. The molar absorptivity is (1.5437×10^4) $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ and Sandell sensitivity index of (0.021) µg / $cm^2$with a relative error of -1.8 to -0.52% and a relative standard deviation of ± 4.0 to ± 0.69%. The propose method has been applied to the determination of chloramphenicol in eye drop.

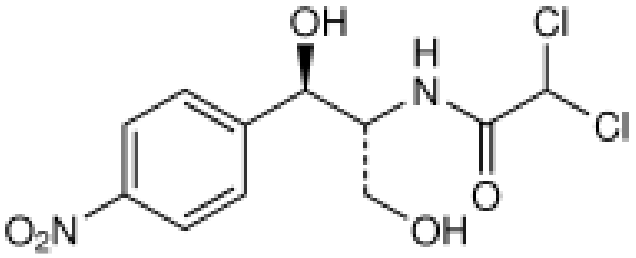
الخلاصة

طورت طريقة طيفية لتقدير كميات متناهية في الصغر من الكلورامفينكول، وتعتمد هذه الطريقة على اختزال مجموعة النايترو الموجود في الكلورامفينكول إلى مجموعة الامينو والذي تم تحويله إلى ملح الدايزونيوم المقابل واقترانه مع كاشف الفلوروكلوسينول في محيط قاعدي لتكوين صبغة آزوتية صفراء اللون ذائبة في الماء ومستقرة وتعطي أعلى امتصاص عند 419 نانوميتر، وأمكن تطبيق قانون بير في حدود التركيز (0.4 – 40) مايكروغرام/مللتر بإمتصاصية مولارية مقدارها 1.5437 × 10^4 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة ساندل 0.021 مايكروغرام /سم^2 وخطأ نسبي ما بين –1.8 إلى 0.52% وانحراف قياسي نسبي ما بين ± 4.0 إلى ± 0.69%. وقد تم تطبيق الطريقة بنجاح لتقدير الكلورامفينيكول في قطرة العين.

* *Presented at the second conference on Chemistry, University of Mosul, college of Education, 17-18 Novamber-2013.*

المقدمة

يعد الكلورامفينيكول (chloramphenicol, CAP) من المضادات الحيوية الفعالة ضد مدى واسع من البكتريا gram–positive (2,1) الشكل (1). أستخدم الـ CAP بشكل كبير في معالجة الأمراض المعدية الخطيرة، التي تشمل مرض حُمى التيفوئيد و الأشكال الأخرى من أمراض السالمونيلا (samonellosis)(3). كذلك يستخدم الكلورامفينيكول في مختلف التهابات العين البكتيرية مثل Bacillus cereus و panophthalimitis التي تحدث خاصة في مدمني المخدرات نتيجية لقدرته العالية على اختراق خلايا الجسم (4). ونظرا لاهمية الCAP فقد تم تقديره بطرق مختلفة حيث قدر بالطرق الطيفية (5–9) والتالق الكيميائي (10) وكروماتوكرافيا السائل–مطياف الكتلة (11– 14) وكروماتوكرافيا الغاز(16,15) وكروماتوكرافيا الورقة الرقيقة (17) والطريقة الضوئية (المطيافية) باستخدام الحقن الجرياني (4) والايلايزا (18–20), واخيرا المتحسسات الحيوية باستخدام قطب الذهب(21),على الرغم من تعدد الطرق لتقدير الCAP يلاحظ هناك رغبة لتطوير طرائق طيفية اخرى لتقدير الدواء المعني .



الشكل (1): الصيغة التركيبية للكلورامفينكول (CAP) الوزن الجزيئي=323.1 غم/مول (17).

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة

1. تمت القياسات الطيفية بوساطة جهازي

Cintra5-GBC Scientific Equipment, UV-Visible spectrophotometer.
CECIL-CE 1021 digital Single beam spectrophotometer.

واستخدمت خلايا من البلاستك أو السليكا ذات مسار ضوئي مقداره 1 سنتمتر.

2. تم قياس الدالة الحامضية باستخدام جهاز Philips PW 9420 pH meter.
3. ولعملية الوزن استخدم ميزان حساس نوع Sartorius-BL-201 S.

الكواشف والمواد الكيميائية المستخدمة

استخدمت مواد كيميائية وكواشف تحليلية على درجة عالية من النقاوة.

محاليل المواد المستخدمة

مسحوق الخارصين. مجهز من شركة(HOPKINS & WILLAMS LTD).

محلول حامض الهيدروكلوريك المركز (11.8 عياري). مجهز من شركة (BDH).

محلول كاربونات الصوديوم 30 % .

محلول الكلورامفينكول (10000 جزء/ مليون). يحضر بإذابة 0.5 غرام من الـ CAP (المجهز من الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية (SDI)، سامراء–العراق) في 20 مللتر من الايثانول ثم يكمل الحجم إلى 50 مللتر بالماء المقطر. ويكون هذا المحلول مستقراً لمدة أسبوعين في الأقل عند حفظه في قنينة داكنة .

محلول الكلورامفينكول المختزلRCAP (500 جزء/ مليون). يُحضر بأخذ 5 مللتر من محلول الـ CAP (10000 مايكروغرام/مللتر) ويضاف إليه 4 غرام من مسحوق الخارصين و10 مللتر من الماء المقطر و20 مللتر من حامض الهيدروكلوريك المركز (11.8 عياري) ويبرد المحلول مع الرج. ثم بعدها يرشح الخليط باستخدام قمع بوخنر، ويوضع الراشح في قنينة حجمية سعة 100 مللتر ويكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر، ثم يحفظ في قنينة داكنة(9).

المحلول العامل للكلورامفينكول المختزل والمعادل (100 مايكروغرام/مللتر). تم أخذ 20 مللتر من الـ RCAP (500 مايكروغرام/مللتر) وأضيف إليه محلول 30 % كاربونات الصوديوم (يُحضر بالتسخين) بالتدريج حيث لوحظ تكون راسب أبيض كثيف من كاربونات الخارصين مما يدل على تمام الترسيب، ثم رُشح المحلول وأخذ الراشح ووضع في قنينة حجمية سعة 100 مللتر وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر، ثم حفظ في قنينة محكمة ذات لون داكن.

محلول نتريت الصوديوم (1 %). يحضر هذا المحلول بوزن 1 غم من $NaNO_2$ المجهز من شركة (BDH) وإذابته في الماء المقطر. ويكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مللتر.

محلول حامض الهيدروكلوريك (1 مولاري). يُحضر هذا المحلول بتخفيف 21.2 مللتر من الحامض المركز (11.8) المجهز من شركة (BDH) وتخفيفه بالماء المقطر إلى العلامة في قنينة حجمية سعة 250 مللتر.

محلول كاشف الفلوروكلوسينول (0.5 %). يُحضر هذا المحلول بوزن 0.5 غرام من الفلوروكلوسينول (phloroglucinol) المجهز من شركة (BDH) بإذابته بالماء المقطر ثم يكمل الحجم إلى العلامة في قنينة حجميةئ سعة 100 مللتر، ويحفظ في قنينة ذات لون داكن،ويكون المحلول مستقراً لفترة عشرة أيام في الأقل(22).

محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 مولاري). يُحضر بتخفيف محتوى القنينة الحجمية البلاستيكية المجهزة من شركة (BDH) بالماء المقطر إلى 1000 مللتر باستخدام قنينة حجمية، ويحفظ المحلول في قناني بلاستيكية.

محلول حامض السلفاميك (3 %). يُحضر هذا المحلول بإذابة 3 غرام من حامض السلفاميك المجهز من شركة (BDH) بالماء المقطر، ويكمل الحجم إلى العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مللتر.

محاليل المضافات الدوائية (السوّاغ)، (1000 مايكروغرام/مللتر). يُحضر بإذابة 0.1 غرام في 100 مللتر ماء مقطر.

طريقة العمل المعتمدة

تم تهيئة المنحني القياسي لتقدير الـ CAP في المحلول المائي وكما يأتي:

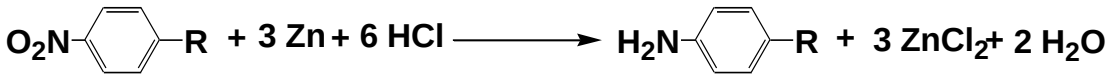
أضيف إلى سلسلة من قناني حجمية سعة 25 مل، 3 مل من محلول (1 عياري) حامض الهيدروكلوريك إلى حجوم من محلول الـ CAP المختزل والمعادل الحاوي على (10-1000) مايكروغرام CAP، ومن ثم أضيف 0.7 مل من محلول (1%) نتريت الصوديوم وترك المحلول لمدة دقيقتين مع الرج بين فترة وأخرى لكي يكتمل التفاعل، ثم أضيف 0.75 مل من محلول (3%) حامض السلفاميك وتُرِكَ المحلول لمدة ثلاث دقائق مع الرج لكي يكتمل تحطيم الزيادة من النتريت. بعدها أضيف 1 مل من محلول الكاشف (0.5%) فلوروكلوسينول ثم أضيف 7 مل من محلول (1عياري) هيدروكسيد الصوديوم، بعد ذلك أكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر و ترك لمدة 15 دقيقة ، ثم قيس الامتصاص بعد التخفيف ضد المحلول الصوري عند الطول الموجي 419 نانوميتر.

تحليل قطرة العين تم مزج محتوى خمس عبوات كلورامفينكول (سامافينكول 0.5 %، من إنتاج الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية (SDI)، سامراء–العراق) مزجاً جيداً بعدها تم أخذ 10 مللتر من هذا المزيج ووضع في قنينة حجمية سعة 50 مللتر وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر. من أجل الحصول على محلول الـ CAP المختزل والمعادل تمت معاملة 25 مللتر من هذا المحلول مع مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك المركز وكاربونات الصوديوم بإتباع الخطوات المذكورة في تحضير محلول الكلورامفينكول المختزل(500مايكروغرام/مللتر) والكلورامفينكول المختزل والمعادل (100 مايكروغرام/مللتر).

النتائج والمناقشة

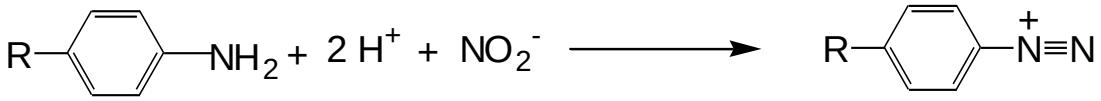
مبدأ الطريقة

تعتمد الطريقة على اختزال مجموعة النايترو في الـ CAP باستخدام مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك المركز وتحويلها إلى مجموعة الامينو على وفق المعادلة الآتية(23):



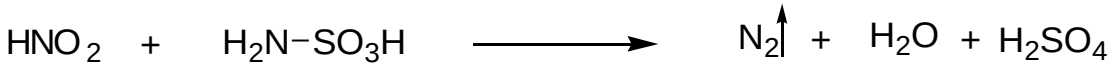
CAP RCAP

وبعد تكون مركب الكلورامفينكول المختزل (RCAP) تتم مفاعلتة مع الزيادة من النتريت في وسط حامضي ليكون ملح الدايزونيوم:

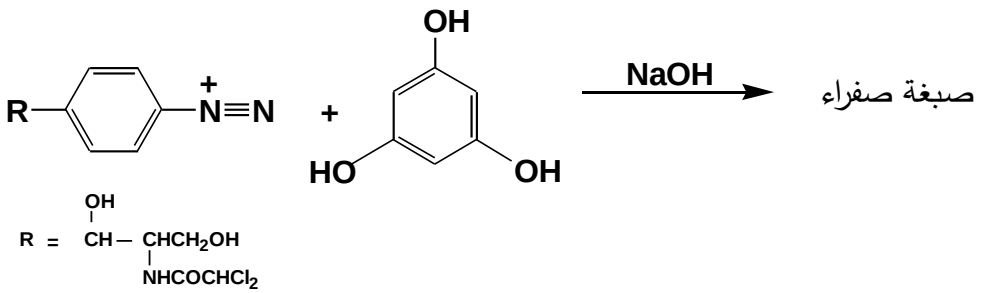


RCAP

وتتم إزالة الزيادة من النتريت باستخدام حامض السلفاميك:



ثم يقترن ملح الدايزونيوم مع كاشف الفلوروكلوسينول في وسط قاعدي لتكوين صبغة الآزو:



ولوحظ أن شدة لون صبغة الآزو المتكونة تتناسب و كمية الـ CAP الموجودة أصلاً في المحلول.

الدراسة التمهيدية

في الدراسة التمهيدية، تم استخدام 1 مل من محلول الـ CAP المختزل والمعادل(100 مايكروغرام/مللتر)، وأضيف إليه 1 مل من محلول 1 عياري حامض الهيدروكلوريك ثم 1مل من محلول 1% نتريت الصوديوم، ورج المزيج لمدة خمس دقائق، بعدها أضيف1 مل من محلول 3% حامض السلفاميك ورج المزيج لمدة خمس دقائق أيضاً بعدها أضيف2 مل من محلول 0.5% ميتا–أمينوفينول ثم حجوم مختلفة (2-10) مل من محلول1 مولاري هيدروكسيد الصوديوم

وخففت المحاليل إلى العلامة في قناني حجمية (25 مل) بالماء المقطر. فلوحظ أن النموذج في جميع الحالات كان ذا لون أصفر في حين أن المحلول الصوري كان عديم اللون تقريباً. و لزيادة الحساسية ، تم استبدال كاشف ميتا–أمينوفينول بكاشف فلوروكلوسينول حيث أعطى الأخير تحت الظروف الأولية امتصاصاً أعلى (0.142 مقابل 0.110)، وعليه تم اعتماد كاشف الفلوروكلوسينول في التجارب اللاحقة وكانت الصبغة المتكونة عنه صفراء اللون ذات طول موجي لأقصى امتصاص 419 نانوميتر والذي اعتمد في التجارب اللاحقة.

دراسة الظروف المثلى لتقدير الكلورامفينكول

تمت دراسة جميع العوامل والظروف التي تؤثر في تكوين صبغة الآزو، وتم اختيار الظروف المثلى لطريقة العمل المعتمدة.

تأثير الحامض

تمت دراسة تأثير كميات مختلفة من أنواع عديدة من الحوامض (المستخدمة لعملية أزوتة الـ RCAP) على شدة لون الصبغة المتكونة، والنتائج موضحة في جدول (1).

جدول (1): تأثير كمية الحوامض المختلفة على امتصاص صبغة الآزو المتكونة

Acid Used (1N)	Absorbance / ml of acid used for the diazotization reaction						
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	4
HCl	561.0	261.0	451.0	851.0	951.0	251.0	941.0
HNO_3	251.0	051.0	061.0	561.0	061.0	851.0	951.0
$HClO_4$	551.0	661.0	951.0	361.0	751.0	361.0	171.0
CH_3COOH	211.0	211.0	011.0	311.0	131.0	921.0	431.0
H_2SO_4	140.0	480.0	441.0	451.0	061.0	651.0	551.0
HCOOH	960.0	490.0	101.0	211.0	611.0	241.0	051.0
H_3PO_4	350.0	280.0	290.0	141.0	731.0	351.0	461.0

يتبين من الجدول المتقدم أن أزوتة الدواء يمكن إجراؤها باستخدام حوامض قوية وحوامض ضعيفة لاعضوية وعضوية. إلا أن الحوامض القوية غالباً ما تعطي امتصاصاً أعلى من الحوامض الضعيفة وذلك لأن قدرتها على برتنة الأمين أعلى. وتم استخدام 3 مل من محلول (1N) من حامض الهيدروكلوريك في التجارب اللاحقة.

تأثير كمية النتريت والزمن

تمت دراسة تأثير كمية النتريت بوصفه عاملاً مؤزوتاً ودراسة تأثيره على شدة صبغة الآزو المتكونة والنتائج موضحة في جدول (2).

جدول (2): تأثير كمية النتريت والزمن على امتصاص صبغة الآزو المتكونة

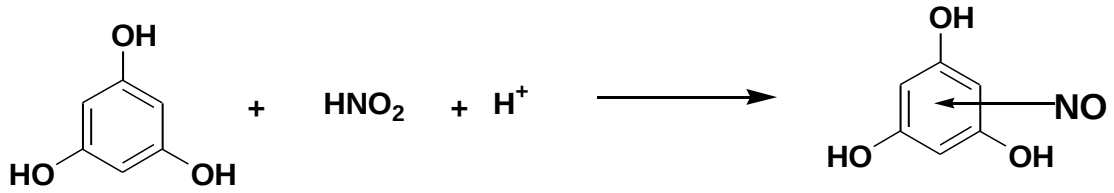
Ml of 1%$NaNO_2$	Absorbance / min. standing time						
	0	**1**	**2**	**3**	**5**	**7**	**10**
0.1	-	0.085	0.090	0.089	0.090	0.089	0.088
0.3	0.069	0.094	0.094	0.088	0.094	0.090	0.089
0.5	0.099	0.089	0.087	0.089	0.090	0.090	0.089
0.7	0.098	0.087	0.092	0.086	0.089	0.090	0.089
1.0	0.113	0.099	0.085	0.090	0.090	0.089	0.089
2.0	0.151	0.104	0.099	0.088	0.111	0.091	0.094

وجد من الجدول المذكور أن استخدام (0.7) مل من محلول 1% نتريت الصوديوم وبزمن تفاعل دقيقتان أعطى أفضل النتائج، وعليه تم استخدامها في التجارب اللاحقة.

أن الكمية من النتريت الأقل من المثلى تؤدي إلى تكوين ملح الدايزونيوم بكمية أقل ومن ثم تؤدي إلى امتصاص اقل، إما كمية النتريت الأكثر من المثلى فتؤدي إلى تفاعلات جانبية غير محبذة.

إزالة المتبقي من النتريت

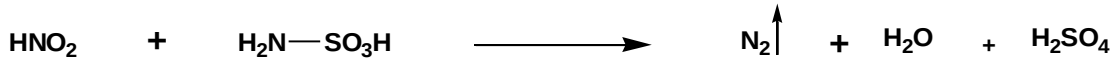
من المفضل إزالة الزيادة المتبقية من النتريت لأن بقاءه في المحلول يؤدي إلى تفاعلات جانبية غير مرغوب فيها، كالنترزة(24) التي تحدث لعامل الاقتران، الفلوروكلوسينول في الطريقة الحالية :



Phloroglucinol

وهذه النترزة تعمل على زيادة امتصاص المحلول الصوري، ذلك لان معظم مركبات النتروزو صفراء اللون في الغالب(25)، كما إنها تؤدي إلى تقليل فعالية الكاشف تجاه عملية الاقتران.

ولغرض إزالة النتريت، تم استخدام حامض السلفاميك لهذا الغرض إذ يعمل على إزالة النتريت من خلال اختزاله إلى غاز النتروجين الخامل وكما ممثل بالمعادلة الآتية:



ولأجل ذلك تمت دراسة تأثير كمية حامض السلفاميك وزمن تحطيم النتريت غير المتفاعل وكما موضح في الجدول (3).

جدول (3): تأثير كمية حامض السلفاميك و الزمن على امتصاص صبغة الآزو المتكونة

Ml of 3% Sulphamic acid solution	Absorbance/ minute standing time					
	1	2	3	5	7	10
0.25	-0.248	----	-0.128	-0.255	----	----
0.50	0.214	0.203	0.206	0.189	0.190	0.191
0.75	0.123	0.202	0.204	0.199	0.191	0.195
1.00	0.207	0.194	0.197	0.196	0.198	0.195
2.00	0.201	0.201	0.195	0.194	0.191	0.192

نلاحظ من خلال الجدول المذكور آنفاً أن الكميات القليلة من حامض السلفاميك لا تُزيل تماماً النتريت المتبقي مما يتيح للأخير التفاعل مع الكاشف وأعطاء لون غامق وهذا يؤدي إلى امتصاص سالب لمحلول النموذج.

ومن الجدول نلاحظ أن حجم 0.75 مل من محلول 3% حامض السلفاميك وبزمن تفاعل ثلاث دقائق كافية لتحطيم الزيادة من النتريت. عليه تم اعتمادها في التجارب اللاحقة.

تأثير كمية الفلوروكلوسينول

تم اعتماد كاشف الفلوروكلوسينول كعامل اقتران في الدراسة الحالية وذلك لكونه:

1. سهل الذوبان في الماء ويمكن الحصول على تراكيز عالية بمحاليل منه.
2. تكون محاليله المائية مستقرة لفترة طويلة نسبياً.
3. سهولة توفره وزُهد ثمنه نسبياً.
4. تكون أصباغ الآزو الناتجة عنه ذات لون غامق مما يسهل استخدامه للتراكيز الواطئة.

تمت دراسة تأثير كمية الكاشف على شدة الصبغة الناتجة من تراكيز مختلفة من الـCAP وكما موضح في جدول (4).

جدول (4): تأثير كمية الفلوروكلوسينول على امتصاص صبغة الآزو المتكونة

Ml of 0.5% *phlorogluincol*	*Absorbance / µg CAP present*							r
	10	30	50	100	200	300	500	
0.5	0.034	0.069	0.112	0.203	0.403	0.594	turbid	0.99993
1.0	0.033	0.070	0.111	0.203	0.400	0.596	turbid	0.99996
2.0	0.027	0.056	0.089	0.179	0.359	0.534	turbid	0.99989
3.0	0.038	0.066	0.100	0.186	0.349	0.556	turbid	0.99868
5.0	0.037	0.075	0.094	0.184	0.348	0.556	turbid	0.99823

ومن الجدول (4) يتبين أنه يفضل استخدام 1 مل من الفلوروكلوسينول لأنه أعطى أعلى قيمة لـ r، فضلاً عن أن شدة اللون كانت مناسبة أيضاً.

تأثير القاعدة

تمت دراسة تأثير أنواع مختلفة من القواعد (القوية والضعيفة) وبكميات مختلفة على شدة لون الصبغة الناتجة (كون أن الصبغة الناتجة من اقتران الأمين الاروماتي الأولي مع الفينول لا تتكون إلا في المحيط القاعدي) إذ أن القواعد الضعيفة تعمل على تقليل شدة الامتصاص أما القواعد القوية فتعمل على زيادة شدة الامتصاص أي أن التفاعل يحتاج إلى محيط قاعدي قوي. وتم اختيار هيدروكسيد الصوديوم (1 عياري) بحجم 5 مل كأنسب قاعدة يمكن استخدامها في التجارب اللاحقة. والنتائج مبينة في الجدول (5).

جدول(5): تأثير كمية القواعد المختلفة على امتصاص صبغة الآزو المتكونة

Base used (1N)	Absorbance / ml of base used				
	1	3	5	7	10
CH_3COONa	0.022	0.032	0.081	0.121	0.108
Final pH	0.99	1.31	3.61	4.27	4.65
$NaHCO_3$	0.026	0.042	0.143	0.160	0.160
Final pH	2.27	2.78	6.72	6.97	7.12
Na_2CO3	0.035	0.069	0.128	0.149	Turbid
Final pH	1.43	1.76	6.38	7.23	----
NH_4OH	0.037	0.088	0.156	0.164	0.154
Final pH	1.62	2.13	9.14	9.47	9.69
NaOH	0.042	0.088	0.181	0.177	0.170
Final pH	2.33	2.80	11.37	11.63	11.77
KOH	0.042	0.089	0.194	0.175	0.187
Final pH	1.32	1.78	12.07	12.42	12.71

تأثير المواد الفعالة سطحياً

العوامل الفعالة سطحياً عبارة عن جزيئات كبيرة تتكون من قسمين، أحداهما قطبي (يألف الماء) والأخر غير قطبي (يألف العضويات). وتستخدم هذه المواد في الكيمياء التحليلية لزيادة ذوبانية المواد (بوساطة الجزء القطبي)(26) وزيادة حساسية التفاعلات اللونية والأنزيمية (27).

وعليه تم دراسة تأثير أنواع مختلفة من المواد الفعالة سطحياً الموجبة و السالبة والمتعادلة بتراكيز مختلفة (وبحجم 2 مل لكل منها) فقد تم استخدام:

1. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB).
2. Sodiumdodecyl sulphate (SDS).
3. Iso-octylphenoxypolyethoxyethanol, containing approximately 10 mole of ethylene oxide (Triton X-100).

والجدول (6) يشير إلى عدم كفاءة المواد الفعالة سطحياً وكونها غير طموحة في تحسين حساسية الطريقة، وعليه لم تستخدم في التجارب اللاحقة.

جدول (6): تأثير المواد الفعالة سطحياً على امتصاص صبغة الآزو المتكونة

Surfactant solution	Absorbance		Without Surfactant
	I	II	
SDS , 1×10^{-3} M	0.188	0.163	0.163
CTAB , 1×10^{-3} M	0.177	0.178	
Triton X – 100 , 1%	0.166	0.165	

I = CAP + HCl (H) + $NaNO_2$ (N) + sulphamic acid (F) + phloroglucinol (R) + NaOH (B) + surfactant (S).
II = CAP + H + N + F + R + S + B

استقرارية الصبغة

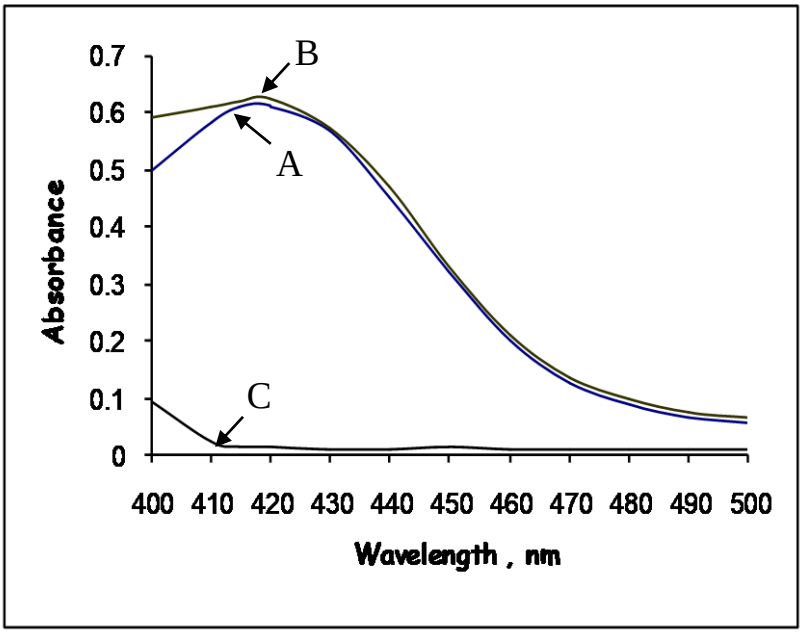
تمت دراسة تأثير الزمن على شدة امتصاص صبغة الآزو المتكونة عند فترات زمنية مختلفة لمعرفة تكوين أعلى امتصاص ممكن للصبغة وفترة استقراريتها ولثلاث كميات من الـ CAP :50، 100 و500 مايكروغرام. وأظهرت النتائج عدم استقرارية المعقد. ولحل المشكلة فقد تمت إضافة كميات مختلفة من محلول كبريتيت الصوديوم sodium sulphite ولكن النتائج كانت غير مشجعة من الناحية التحليلية، ولكن تبين أنه عند استخدام 7 مل بدلاً من5 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 عياري)، تم الحصول على استقرارية جيدة للصبغة ولكميات المختلفة من الـ CAP، والنتائج مبينة في جدول (7). حيث يتضح أن الصبغة تتكون بأعلى كمية ممكنة عند الدقيقة الخامسة عشر من التخفيف إلى العلامة بالماء المقطر وتبقى مستقرة كذلك لزمن لا يقل عن45 دقيقة أخرى ولمدى كبير من التراكيز. وعليه تم اعتماد فترة 15 دقيقة كفترة تكوين (formation period) للتجارب اللاحقة.

جدول (7): تأثير الزمن على امتصاص صبغة الآزو باستخدام 7 مل من محلول 1 عياري هيدروكسيد الصوديوم

µg CAP / 25 ml	Absorbance / minute standing time												
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
50	0.0716	0.0910	0.0912	0.0976	0.0911	0.0911	0.0946	0.0999	0.0978	0.0979	0.0981	0.0983	0.0982
100	0.184	0.182	0.181	0.181	0.182	0.180	0.182	0.182	0.183	0.182	0.179	0.177	0.177
500	0.621	0.622	0.638	0.604	0.764	0.764	0.766	0.770	0.763	0.762	0.767	0.762	0.768

طيف الامتصاص النهائي

عند إضافة كاشف الفلوروكلوسينول إلى المحلول الحاوي على الـ CAP المؤزوت ومن ثم إضافة محلول قاعدة NaOH (1N) تحت الظروف المثلى تجريباً تتكون صبغة آزوتية صفراء اللون وتعطي أعلى امتصاص عند نفس الطول الموجي 419 نانوميتر مقارنة بالمحلول الصوري الذي له امتصاصاً طفيفاً عند الطول الموجي المذكور آنفاً. والشكل(2) يبين طيف الامتصاص للصبغة الناتجة مقابل المحلول الصوري وطيف الامتصاص للمحلول الصوري مقابل الماء المقطر.

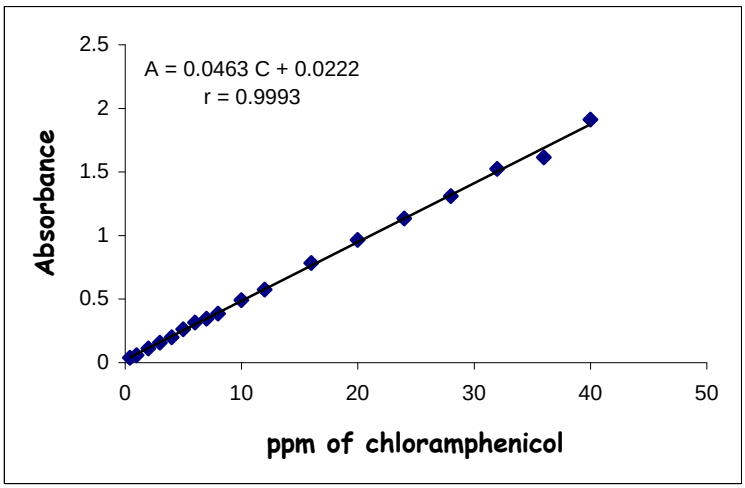


الشكل (2): طيف الامتصاص النهائي

طيف الامتصاص لـ (300 مايكروغرام/25 مل) من الـ CAP (معامل وفق الطريقة المعتمدة) مقاس مقابل المحلول الصوري (A) ومقابل الماء المقطر (B)، والمحلول الصوري مقابل الماء المقطر (C)

مواصفات المنحني القياسي

الشكل (3) يمثل المنحنى القياسي المستقيم الذي يكون موافقاً لقانون بير في مدى التركيز 10–1000 مايكروغرام /25 مل أي 0.4 – 40 مايكروغرام/مللتر وقد لوحظ أن كمية 1100 مايكروغرام أو أكثر من الـCAP تعطي امتصاصية خارج مدى الجهاز. ووجد أن ميل المنحنى القياسي للصبغة الناتجة يساوي 1.5437×10^{4} لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة ساندل 0.021 مايكروغرام/سم^{2} ، مما يدل على أن الطريقة ذات حساسية عالية. بلغت قيمة معامل الارتباط (correlation coefficient) لهذا المنحنى القياسي اكبر من 0.9993 مما يدل على أن المنحنى القياسي يمتلك مواصفات خطية ممتازة.



الشكل (3): المنحنى القياسي لتقدير الـCAP باستخدام كاشف الفلوروكلوسينول

دقة و توافق الطريقة

لفحص دقة الطريقة وتوافقها تم حساب الخطأ النسبي والانحراف القياسي النسبي (RSD) باستخدام تراكيز مختلفة من الـ CAP. يضم الجدول (8) النتائج التي تم الحصول عليها والتي تشير إلى أن الطريقة ذات دقة جيدة و توافق جيد.

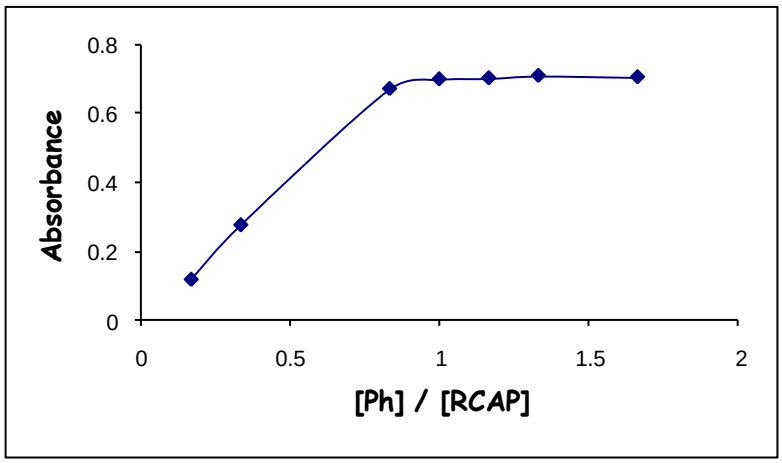
جدول (8): الدقة و التوافقية للطريقة

Amount of CAP taken, µg	Relative error, % *	Relative standard deviation, % *
10	-1.80	±4.00
25	-1.72	±3.50
50	-2.42	±0.23
100	-0.34	±0.18
200	-0.52	±0.69

* من خمس قراءات

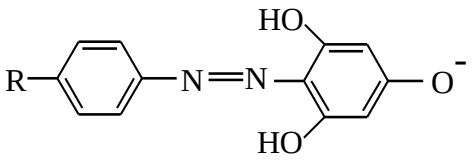
طبيعة الصبغة المتكونة

تم اعتماد النسبة المولية mole ratio (28) لإيجاد نسبة الاقتران بين كاشف الفلوروكلوسينول و الـ CAP المختزل والمعادل المؤزوت، حيث ثبتت كمية الـ CAP المختزل والمعادل عند 3 مل من محلول 0.31×10^{-3} مولاري وأضيفت كميات متزايدة من الكاشف(0.5–5 مل) من نفس التركيز للكلورامفينكول المختزل والمعادل، ثم أضيفت بقية المواد المستخدمة في طريقة العمل، وقيست الإمتصاصات مقابل المحاليل الصورية عند الطول الموجي419 نانوميتر باستخدام خلايا بلاستيكية ذات ممر ضوئي 1 سم.



الشكل (4): طريقة النسبة المولية لمحلول الـ RCAP و المعادل مع كاشف الفلوروكلوسينول (Ph)

ومن الشكل (4) يتبين أن نسبة الارتباط بين الكاشف والـ RCAP هي 1 :1 . وعليه يمكن كتابة الصيغة المقترحة للصبغة المتكونة كما يلي:



R = CH(OH)–CHCH$_2$OH
NHCOCHCl$_2$

ثابت استقرار الصبغة

تم حساب ثابت استقرار الصبغة المتكونة (1:1) آنفة الذكر وذلك بتحضير محاليل تحتوي على نسب مولية (1:1) من الـ RCAP والمعادل وكاشف الفلوروكلوسينول وقيس امتصاص الناتج (A_S) ثم قيس امتصاص محاليل تحتوي على نفس الكمية من الـRCAP

والمعادل وزيادة من كاشف الفلوروكلوسينول والتي يُعبر عنها بالقيمة (A_m). كما موضح في المعادلة:

$$M + L \longrightarrow ML$$
$$\alpha C \quad \alpha C \quad C - \alpha C$$

يمكن كتابة معادلة ثابت الاستقرار كما يأتي (29):

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

حيث أن : α = درجة التفكك

C = تركيز الصبغة الناتجة (مول/لتر)

و عند التعويض، تصبح المعادلة:

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

$$\alpha = \frac{A_m - A_S}{A_m}$$

حيث أن : A_m = امتصاص المحلول الحاوي على زيادة من الكاشف.

A_S = امتصاص المحلول الحاوي نسبة مولية (1:1) من الكاشف و الـ CAP.

و النتائج موضحة في الجدول (9).

جدول (9) : قيم ثابت استقرار الصبغة المتكونة

Ml of 0.31×10^{-3} M CAP/25 ml	Absorbance		A	K, Molar $^{-1}$
	A_m	A_S		
3.0	0.450	0.419	0.0689	0.52×10^7
5.0	0.790	0.736	0.0683	0.32×10^7

ومن الجدول أعلاه يكون معدل قيمة ثابت استقرار الصبغة هو 0.42×10^7 لتر.مول$^{-1}$.

تأثير بعض المضافات الدوائية (السوّاغ) على تقدير الـCAP

تمت دراسة تأثير بعض المضافات الدوائية (السوّاغ) على تقدير الـ CAP بالطريقة الحالية، والنتائج مبينة في جدول (10).

جدول (10): تأثير بعض المضافات الدوائية (السوّاغ) على تقدير الـ CAP

Excipient	Recovery % , of 25 µg of CAP per µg of excipient Added			
	100 µg	300 µg	500 µg	1000 µg
Vanillin	101.5	99.6	102.8	107.3
Glucose	98.5	98.0	98.0	96.1
Dextrose	100.9	99.6	99.6	99.6
Gum acacia	102.5	101.4	99.2	99.5
Starch	97.6	99.7	99.5	99.8
Lactose	96.9	96.2	99.5	100.7
CTAB	98.3	99.6	99.6	99.4
Sucrose	102.7	102.9	104.7	104.2
Tween – 80	97.4	101.5	102.5	100.3
Glycerol	100.2	102.0	100.0	101.3

من نتائج الجدول في أعلاه، يتبين أن وجود المضافات لا يؤثر على تقدير الدواء المعني بالطريقة الحالية.

تطبيقات الطريقة

من الضروري أن نذكر أن الـ CAP يجب أن لا يعطى للمرضى الذين عانوا من أعراض سمية من قبل، لأن بعض الأعراض المميتة يمكن أن تحدث(30). ولغرض معرفة إمكانية تقدير المستحضرات الصيدلانية بالطريقة المطورة، طبقت الطريقة على قطرة العين (سامافينكول 0.5 %) من إنتاج (الشركة العامة للأدوية والمستلزمات الطبية (SDI)، سامراء–العراق). كما تمت مقارنة الطريقة مع طريقة(N-(1-naphthyl)ethylenediamine(N-NED المذكورة في الأدبيات(31). فكانت نسبة الاستعادة 100 % للطريقة الحالية بينما كانت لطريقة N-(NED) 98.4%، مما يؤكد نجاح الطريقة الحالية في تقدير الـ CAP في قطرة العين.

مقارنة الطريقة

تمت مقارنة المتغيرات التحليلية للطريقة الحالية مع طرائق طيفية أخرى. والجدول (11) يبين نتائج تلك المقارنة.

جدول (11): مقارنة الطريقة الحالية مع طرائق أخرى

Analytical parameters	Micellar N-NED method [32]	N-NED [31]	Present Method
pH	SDS micellar medium	Acid Medium	Alkaline Medium
λ_{max}, (nm)	561	550	419
Temperature (C)	At room temperature	At room temperature	At room temperature
Development time (min.)	20	10	15
Stability period (hour)	24	8	45 min. at least
ε , l . mol^{-1} . cm^{-1}	46000	----	15437
Beer 's law range(ppm)	$2 \times 10^{-6} - 7 \times 10^{-5}$ M	0.8 – 8	0.4 – 40
Average recovery (%)	99.4	99.6	98.54
RSD (%)	± 0.5	± 1.0	± 0.69 to ± 4.0
Stability constant (K)	-----	----	0.42×10^{7}
Correlation coefficient	> 0.999	----	0.9993
Toxicity of reagent *	Irritant & hydroscopic [a]	Irritant & hydroscopic [a]	Irritant [b]
Analytical application	Pharmaceutical preparations	Pharmaceutical Preparations	Pharmaceutical Preparation

* Aldrich , "Catalog Handbook of Fine Chemicals," Aldrich Chemical Company, Inc., Wisconsin, (1990 – 1991), pp.(a) : 941 , (b) : 1054 .

من المقارنة في الجدول (11)، يتضح أن الطريقة الحالية يمكن وضعها في مصاف الطرق المنشورة حيث تمتاز بحساسيتها العالية و استخدامها لمواد زهيدة الثمن، و متوفرة، كما أنها تمتاز بالبساطة.

الاستنتاجات

تم تطوير طريقة طيفية غير مباشرة لتقدير الـCAP وذلك عن طريق اختزال مجموعة النايترو في المركب باستخدام مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك المركز وتحويلها إلى مجموعة الامينو التي تعطي صبغة صفراء اللون ذائبة في الماء بعد عملية الأزوتة والاقتران مع كاشف الفلوروكلوسينول في محيط قاعدي، لتعطي أعلى امتصاص عند الطول الموجي 419 نانوميتر وتم الحصول على استقرارية جيدة بعد التخفيف إلى الحجم النهائي. ويبين المنحني القياسي المستقيم الناتج إتباع قانون بير لحدود التركيز (10–1000) مايكروغرام/مللتر في حجم نهائي 25 مللتر. وكانت الطريقة ذات دقة (–1.8 إلى

−0.52) وتوافقية (±4.0 إلى ±0.69) جيدتين ومن قيمة معامل الامتصاص المولاري 1.5437×10^4 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة ساندل 0.021 مايكروغرام/سم^2 تبين أن الطريقة ذات حساسية عالية كما أنها بسيطة وسريعة وغير مكلفة ولا تحتاج إلى السيطرة على درجات الحرارة أو استخدام مذيبات عضوية أو إلى الاستخلاص بالمذيب، وتم تطبيق الطريقة في تقدير الـ CAP في قطرة العين.

المصادر

1) Yasin M. N., Hussain S., Malik F. , Hameed A., Sultan T., Qureshi F., Riaz1 H., Perveen G. and Wajid A., Pak. J. Pharm. Sci., 25: 117-121, (2012).
2) van Boxtel C. J., Santoso B. and Edwards I. R., "Drug Benefits and Ricks International Textbook of Clinical Pharmacology" , John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, (2001).
3) Turton J. A., Yallop D., Andrews C. M., Fagg R., York M. and Williams T.C., Human & Experimental Toxicology, 18:566-576 (1999).
4) Mahmoud K.M., NJC, 28:634-641,(2007).
5) Ebok C. J., Smart J. and Adelusi S. A., Trop. J. Pharm. Res., 2: 215-221,(2003).
6) 6) Naik S. D., Nagaraja P., Yathirajan H. S., Hemanthakumar M. S. and Mohan B. M., Pharm. Chem. J., 40 : 576-581,(2006).
7) Al-Sabha Th. N. and Rasheed B. A., JJC, 5: 201-210, (2010).
8) Al-Hameada M. Y. T. A., M. Sc. Thesis, College of Education, University of Mosul, (2000).
9) Jarallah S. M., Ph. D. Thesis, College of Education , University of Mosul, (2004).
10) Lindino C. A. , Bulhões L. O. S., J. Braz. Chem. Soc., 15 : ISSN 0103-5053, (2004).
11) Pan C., Zhang H., Chen S., Xu Y. and Jiang S., ACTA Chroma, 17(2006).
12) Penney L. , Smith A. , Coates B. and Wijewickreme A., J AOAC Int., 88(22):645-653 (2005).
13) Wang L., Zhang Y., Gao X., Duan Z. and Wang Sh., J. Agric. Food Chem., 58 : 3265–3270 ,(2010).
14) Bogusz M. J, Hassan H., Al-Enazi E., Ibrahim Z. and Al-Tufail M. , J Chrom. ,807: 343-356 (2004).
15) Ding S., Shen J., Zhang S., Jiang H., Sun Z., J. AOAC Int., 88: 57-60, (2005).

16) Pfenning A. P., Roybal J. E., Rupp H. S., Turnipseed S. B., Gonazales S.A. and Hurlbut J. A., J. AOAC. Int., 83: 26-30, (2000).
17) Kristiningrum N., Rakhmawati M.,Int. Curr. Pharm. J, 2(1): 7-10 (2012).
18) Wang L., Zhang Y., Gao X., Duan Z. and Wang Sh., J. Agric. Food Chem., 58 : 3265–3270 ,(2010).
19) Kucharska U. and Leszczynska J., Chem. Listy., 94: 190-194, (2000).
20) Reybroeck W., Apiacta, 38: 23-30, (2003).
21) Codognoto L. , Winter E. , Doretto K. M. , Monteiro G. B. and Rath S., Microchim. Acta , 169(3-4):345-351(2010).
22) Mahmode Z. T. S., M. Sc. Thesis, College of Education , University of Mosul, (2001).
23) Rafat M., J. Edu. Sci., 32:9-18(1998).
24) Clayden J., Greeves N., Warren S. and Wothers P., "Organic Chemistry" ,Oxford University Press, (2001).
25) Baum S. J. and Scaife C. W. J., "Chemistry A Live Science Approach" , 2nd Edn., Macmillam Publishing Co., Inc., New York, (1980).
26) Loudon G. M.," Organic Chemistry" ,4th Edn., Oxford University Press, New York, (2002).
27) Ascrig-Tena I., Rodriguez L. A., Esteve-Romero J. and Garcia-Alvarez-Coque M. C., Talanta, **47**:43-52(1998).
28) "الكيمياء التحليلية لطلبة كلية الزراعة والغابات،" تاليف: د. نبيل فاضل خليل، دار الكتب للطباعة والنشر، الموصل، (1993)،.
29) Al-Hemiry N. A. F., Ph. D. Thesis, College of Sciences, University of Mosul, (2004).(reference therein).
30) Aschenbrenner D. S., Cleveland L. W. and Venable S. J., "Drug Therapy in Nursing" ,Lippincott Willams and Wilkings, Philadelphia, (2002).
31) Hassan S. S. M. and Eldesouki M. H., Talanta, 26:531–536(1979).
32) Ascrig-Tena I., Rodriguez L. A., Esteve-Romero J. and M. C., Garcia-Alvarez-Coque, Talanta, **47**: 43-52(1998).