



مجلة جامعة بني وليد للعلوم الإنسانية والتطبيقية

تصدر عن جامعة بني وليد - ليبيا

Website: <https://jhas-bwu.com/index.php/bwjhas/index>

المجلد التاسع، العدد الثاني 2024

استخدام الكاشف 2، 4- ثنائي نيتروأنيلين في التقدير الطيفي للفانكوميسين هيدروكلوريد عن طريق تفاعل الأزوتة والاقتران

عبد الرحمن جمال حسن¹، أ.م.د. عمر عبد الحي شيخ احمد^{2*}

¹ جامعة نينوى، الموصل، العراق

² قسم الكيمياء، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، العراق

abdurahman.23esp118@student.uomosul.edu.iq

Using 2,4- Dinitroaniline as a Reagent for the Spectrophotometric Determination of Vancomycin Hydrochloride by Diazotization Coupling Reaction

Abdurahman J. Hasan¹, Omar A. Sheej Ahmad²

¹Ninawa University, Mosul, Iraq

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

تاريخ النشر: 2024-06-18

تاريخ القبول: 2024-05-29

تاريخ الاستلام: 2024-05-14

المخلص:

يشتمل هذا البحث على تطوير طريقة طيفية ذات حساسية و دقة عالية من اجل تقدير كميات متناهية في الصغر من عقار الفانكوميسين هيدروكلوريد بالاعتماد على ازوتة الكاشف 2، 4- ثنائي نيتروأنيلين واقترانه مع الفانكوميسين هيدروكلوريد في وسط قاعدي من هيدروكسيد الامونيوم وفي درجة حرارة الغرفة من اجل تكوين صبغة الأزو ذات اللون البرتقالي التي تعطي اقصى شدة امتصاص لها عند 462 نانوميتر وكان المدى الخطي لقانون بير بحدود 0.25-55 مايكروغرام/مللتر. كانت الامتصاصية المولارية 3.71×10^4 لتر.مول⁻¹.سم⁻¹ و حساسية ساندل 0.04 نانوغرام/سم² ومعدل نسبة الاسترجاع 100.53% و الانحراف القياسي النسبي لايتعدى (2.1%) . طُبقت الطريقة بنجاح لتقدير الفانكوميسين هيدروكلوريد في هيئته النقية وفي مستحضره الصيدلاني (الحقن). كما ان النتائج كانت متوافقة بشكل جيد مع طريقة الإضافة القياسية.

الكلمات الدالة: لازوتة والاقتران، 2، 4- ثنائي نيتروأنيلين، التقدير الطيفي، الفانكوميسين هيدروكلوريد.

Abstract

This paper shows the development of a spectroscopic technique with high sensitivity and accuracy for the determination of very small quantities of vancomycin hydrochloride (VH) in the raw material and pharmaceutical preparation (injection). The method is based on the diazotization coupling reaction of the drug with a diazotized

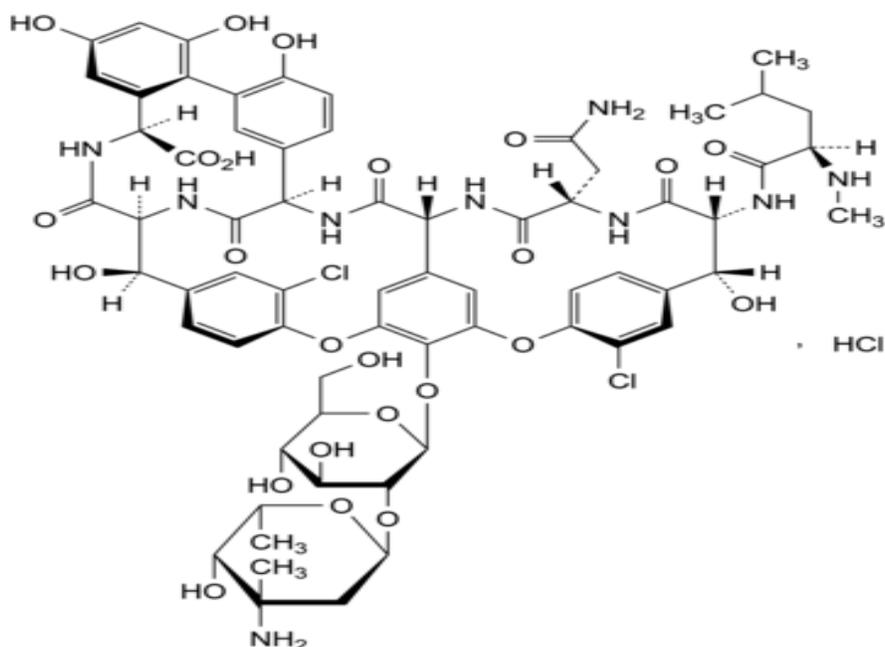
2,4-dinitroaniline reagent in an alkaline medium at room temperature, whereby 2,4-dinitroaniline is produced. This is then coupled with VH in ammonium hydroxide medium, forming an orange-colored azo dye that is water-soluble and has a maximum absorption at 462 nm. The calibration curve was linear and Beer's law was obeyed in the range of (0.25–55) µg/ml with molar absorbance $3.71 \times 10^4 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, and the Sandell sensitivity was 0.04 nanogram/cm². The average recovery rate was 100.53%, and the relative standard deviation did not exceed 2.1%. The method was successfully applied to determine vancomycin hydrochloride in pure form and its pharmaceutical formulation, where the results were in accordance with the standard addition method.

Keywords: Diazotization, Coupling, 2,4-dinitroaniline, Spectrophotometric determination, Vancomycin hydrochloride.

المقدمة:

الفانكوميسين هيدروكلوريد هو عبارة عم مركب بشكل مسحوق أبيض اللون او قد يكون ابيض مائل الى الصفرة، وهو مركب عديم الرائحة له وزن جزيئي مساوي ل 1485.71 غرام/مول كما ان له نقطة الانصهار مساوية ل 105 درجة مئوية. يمتاز الفانكوميسين بذوبانه التام تماماً في الماء كما انه له ذوبانية بسيطة جدا في الايثانول ويعتبر غير قابل للذوبان في الايثر والكلوروفورم (Pande and Parikh 2019).

يعتبر الفانكوميسين هيدروكلوريد (VH) من مركبات الجليكوبيبتيد واسع الطيف. اذ يستخدم في علاج الالتهابات الموضعية والجهازية. كما يوصف لعلاج تسمم الدم والتهابات الصدر والجلد والجهاز التنفسي السفلي والتهاب الشغاف والتهاب السحايا، والتهاب العظم والنخاع والالتهاب الرئوي وغيرها. علاوة على ذلك، فقد وجد الباحثون بان الفانكوميسين علاج فعال ضد عدوى المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) حيث يعتبر مضاد حيوي بكتيري يثبط عملية نقل الببتيد عن طريق الارتباط ببقايا D-alanyl-D-alanine في جدار الخلية البكتيرية (Gram-positive bacterial) (Datta, et al. 2021). يوجد الدواء بشكل شائع في مستحضرات مختلفة وريدية وفموية وهو مضاد حيوي مناسب لعلاج التهاب اللثة ويمكن إعطاؤه مباشرة في اللثة (Chantadee, et al. 2020). من جانب اخر فان إعطاء الفانكوميسين هيدروكلوريد عن طريق الفم محدود بسبب عدم استقراره في الجهاز الهضمي وقلة تغلغله في الغشاء المخاطي حيث ان المثير للاهتمام أنه يُظهر نشاطاً مضاداً للميكروبات ضد (P. gingivalis). يعد التهاب اللثة الآن عامل خطر لعدوى الجهاز التنفسي مع احتمالية الإصابة بالالتهاب الرئوي المكتسب من المستشفى (Lertsuphotvanit, et al. 2022). يرى الباحثون ان فعالية الفانكوميسين هيدروكلوريد تكمن في قدرته على إعاقه تخليق بوليمرات الببتيدوغليكان (peptidoglycan polymers) في الخلية البكتيرية مما يؤدي إلى موت البكتيريا. يعتبر علاج VH الملاذ الأول والأخير للدفاع عن الجسم من الالتهابات البكتيرية الخطيرة عندما تفشل الأدوية الأخرى وخصوصا ادوية البنسيلين بسبب المقاومة البكتيرية أو حساسية المريض، وخاصة الحساسية للمضادات الحيوية بيتا لاكتام. لتجنب السمية أو الآثار الجانبية للدواء وتحسين علاج باستخدامه. يجب مراقبة مستويات تركيز VH جيداً في السوائل البيولوجية وفي المنتجات والمستحضرات الصيدلانية التجارية (Mohamed 2022)..



الشكل 1. Vancomycin hydrochloride (C₆₆H₇₆Cl₃N₉O₂₄)

Molar mass= 1485.7 g/mol

عند استعراض البحوث المنشورة في الأدبيات العلمية لوحظ ان الفانكوميسين قد قدر في السوائل البيولوجية وفي المستحضرات الصيدلانية و كان من اهم هذه الطرق المذكورة هي كروماتوغرافيا السائل عالية الاداء (HPLC) (Aleixa do Nascimento,) (Liu, et al. 2020; Ghasemiyeh, et al. 2020) وقياس الطيف الكتلي والمقترن بتقنية الكروماتوغرافيا عالية الاداء (UPLC-MS) (HPLC-MS) (al. 2018; Zhou, et al. 2022) وكذلك كروماتوغرافيا السائل فائق الاداء المقترن بمطياف الكتلة (UHPLC-MS) (He, et al. 2024) وكذلك كروماتوغرافيا السائل فائق الاداء المقترن بكاشف الاشعة فوق البنفسجية (UV) وتقنية الحقن الجرياني (Al-Abachi, et al. 2015; Hassan and Hadi 2022)، والهجرة الكهربائية بالأنبوبة الشعرية (Kieu, et al. 2023; Zhang, et al. 2014)، وتقنية البريق الكيميائي (Iranifam and Dadashi 2022;)، و التقدير الفلورومتري (Iranifam, et al. 2021) ، و التقدير الفلورومتري (El-Din, et al. 2018; Marzouq, et al. 2019; Mohamed)، و الطرق الكهربية (Cetinkaya, et al. 2022; Gill, et al. 2020) (Rahimpour, et al. 2021) و الطرق الكهربية (Al-ward, et al. 2023;) (Hadi 2014; Pande and Parikh 2019). ولأجل ذلك فقد كان الهدف من البحث هو تطوير طريقة حساسة وبسيطة لتقدير الفانكوميسين تعتمد على مبدأ أزوتة 4،2 - ثنائي نيتروأنيلين ثم اقترانه مع المركب الدوائي الفانكوميسين من اجل تكوين صبغة الأزو ذات اللون البرتقالي في محيط قاعدي وقياسها طيفياً ومن ثم تطبيق الطريقة بنجاح لتقدير المركب الدوائي في مستحضراته الصيدلانية.

الجزء العملي

الاجهزة المستخدمة

تم قياس الامتصاصات ورسم الاطياف من خلال استعمال جهاز مطياف الحزمة المزدوجة نوع Shimadzu UV-Visible Double beam-spectrophotometer 1800 PC، والذي يعمل باستخدام برنامج UV-probe. كما تم

استخدام خلايا الكوارتز ذات السمك 1 سم وأجريت عمليات الوزن باستخدام ميزان حساس نوع KERN ABS-Germany. بالإضافة الى ذلك فقد تمت عملية التسخين بواسطة حمام مائي نوع BS-11 من شركة Lab Companion-Korea. وأجريت عملية إذابة المركبات باستخدام جهاز Ultrasonic Cleaner للرج بالموجات فوق الصوتية نوع Power Sonic 405 مجهز من شركة Lab Tech-Korea.

الكاشف والمركبات الكيميائية المستخدمة في البحث

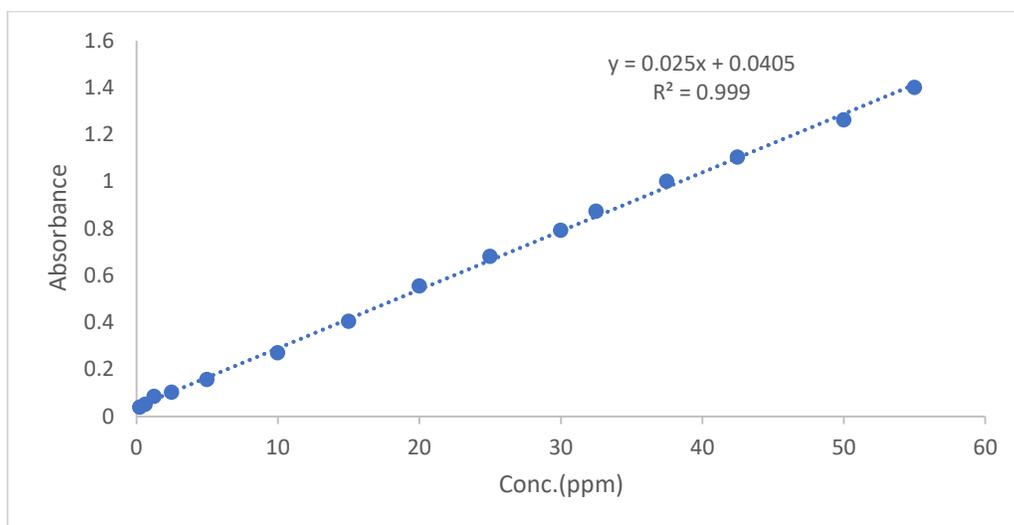
المواد الكيميائية استخدمت بدرجة عالية من النقاوة وتم تحضيرها بالشكل التالي:

- محلول الفانكومايسين هيدروكلوريد بتركيز (250 مايكروغرام/مللتر): تم تحضيره ذلك بوزن (0.0250 غرام) من المركب الدوائي واذابته بالماء المقطر في دورق حجمي سعته 100 مللتر. ثم نقل الى قنينة معتمدة ليتم حفظه في الثلاجة حيث يمكن ان يبقى مستقراً لمدة عشرة ايام.
 - 4،2-ثنائي نيتروأنيلين (100 مايكروغرام/مللتر): حضر المحلول عن طريق إذابة (0.01 غرام) من المركب النقي في (5 مللتر) من الأسيتونيتريل في بيكر مع التحريك المستمر الى أن تتم الإذابة ثم يوضع في قنينة حجمية سعة 100 مللتر ثم يكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر، بعد ذلك ولضمان الإذابة الكاملة للمحلول يتم وضع القنينة الحجمية في جهاز الموجات فوق الصوتية (Ultrasonic) لمدة 10 دقائق تقريباً ويحفظ في قنينة بعيداً عن الضوء ويبقى مستقراً وفعالاً لمدة اسبوع.
 - حامض الهيدروكلوريك (1مولاري): تم تحضيره بأخذ (8.3 مللتر) من الحامض الهيدروكلوريك المركز (12 مولاري) وتخفيفه بالماء المقطر الى 100 مللتر باستخدام دورق حجمي.
 - هيدروكسيد الامونيوم (2 مولاري): تم تحضيره بتخفيف (24.5 مللتر) من الامونيا المركزة بالماء المقطر باستخدام دورق حجمي 100 مللتر.
 - نترتيت الصوديوم (1%) : تم تحضيره بوزن (1.0 غرام) من المركب واذابته بالماء القطر في دورق حجمي 100 مللتر.
 - حامض السلفاميك (1%) : تم تحضيره بوزن (1.00 غرام) من المركب واذابته بالماء المقطر في دورق حجمي 100 مللتر.
- تحليل حقن الفانكومايسين هيدروكلوريد: تم تحضير (2000) مايكروغرام/مللتر من الحقنة وذلك بوزن (0.20 غرام) و اذابتها في الماء بدورق حجمي سعته 100 مللتر، بعد ذلك تم تخفيف المحلول المركز وتحضير محلول بتركيز 250 مايكروغرام/مللتر.

طريقة عمل المنحني القياسي

استخدمت قناني حجمية سعة 100 مللتر في هذه التجربة. حيث أُضيف 0.5 مللتر من محلول الحامض (حامض الهيدروكلوريك 1 مولاري) الى 1.2 مللتر من الكاشف (4،2-ثنائي نيتروأنيلين) الذي تركيزه (100 مايكروغرام/مللتر) يتبع ذلك اضافة 0.25 مللتر من نترتيت الصوديوم (1%) و تترك المحاليل لمدة عشرة دقائق بدرجة (0-5 م°) مع الرج لإتمام تفاعل الازوتة، تبعها بعد ذلك اضافة 1 مللتر من محلول (1%) حامض السلفاميك مع الرج كذلك للتخلص من حامض النتروز ، الان بعد تهيئة كاشف الاقتران (4،2-ثنائي نيتروأنيلين) بأزوتته تمت اضافة حجوم متزايدة (مللتر) من الفانكومايسين هيدروكلوريد الذي تركيزه (250 مايكروغرام/مللتر) الى خليط التفاعل بعدها أُضيف 1 مللتر من محلول هيدروكسيد الامونيوم (2مولاري) ، تم اكمال الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة و ترك المحاليل لمدة عشرة دقائق، قيس الامتصاص بعد ذلك مقابل المحلول الصوري عند 462 نانوميتر ، و الشكل(2) ادناه يمثل المنحني القياسي للفانكومايسين هيدروكلوريد و الذي يتبع

قانون بير بمدى تراكيز (0.25-55) مايكروغرام/مللتر ، حيث بلغ قيمة معامل الارتباط الخطي (R^2) للمنحنى القياسي 0.999 مما يدل واضحاً ان المنحنى يمتلك صفات خطية ممتازة، بالإضافة الى ذلك كانت الامتصاصية المولارية 3.7×10^4 لتر. مول⁻¹. سم⁻¹ مما يدل على الحساسية العالية التي تمتلكها الطريقة.



الشكل (2) المنحنى القياسي للفانكوماميسين هيدروكلوريد بتفاعله مع كاشف الازوتة (4,2- ثنائي نيتروانيلين)

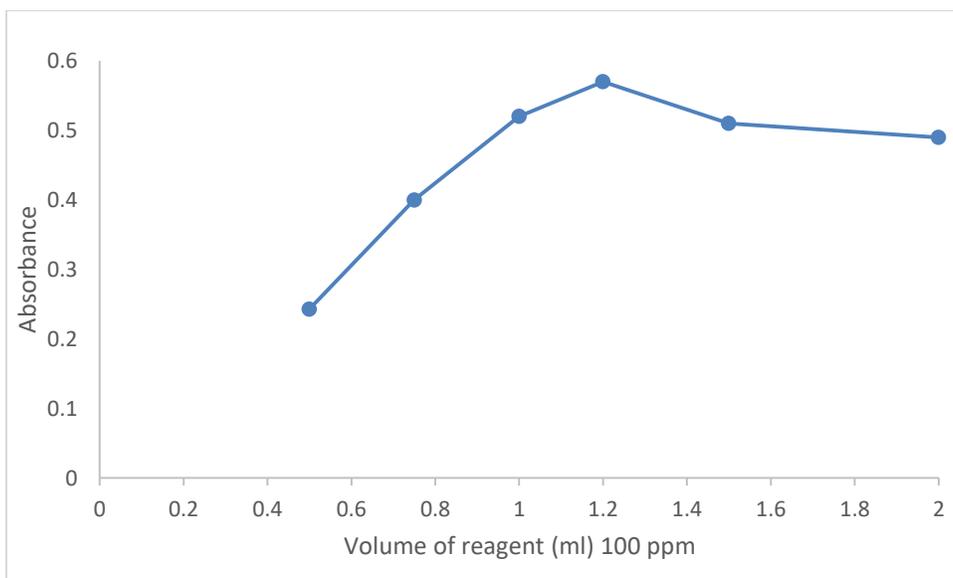
النتائج والمناقشة:

دراسة الظروف المثلى للتفاعل

من اجل الحصول على معقد يمتلك استقرارية جيدة وشدة عالية من اجل اجراء القياسات تمت دراسة تأثير الظروف المصاحبة للتفاعل والتي قد تؤثر على استقرارية المعقد وامتصاصه.

دراسة تأثير كمية الكاشف المؤزوت

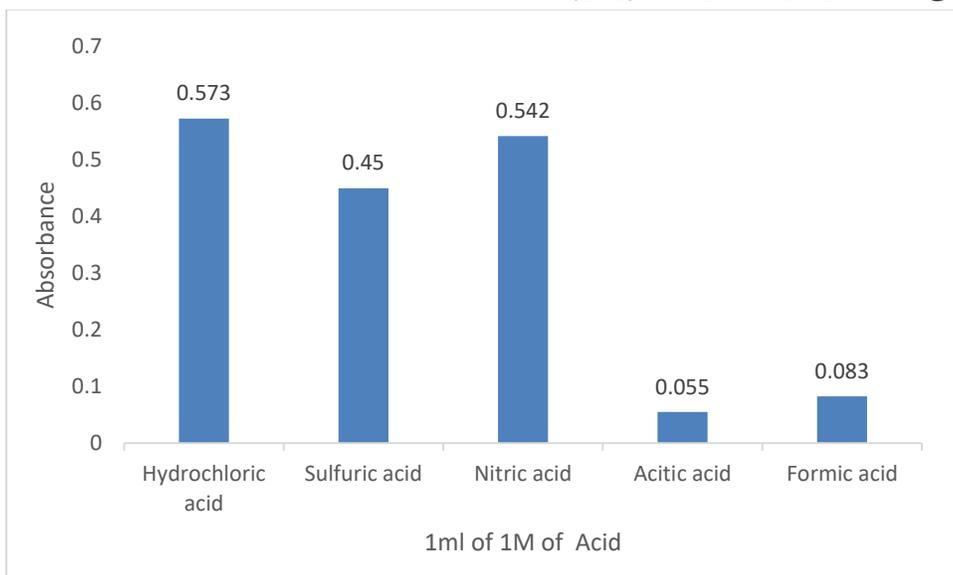
اخذت حجوم مختلفة من الكاشف 2، 4- ثنائي نيتروأنيلين (0.5-2.0) مللتر والمحضر بتركيز (100 مايكروغرام/مللتر) وتمت ازوتته بإضافة 1 مللتر من نتريت الصوديوم (1%) ثم تم مفاعله واقتترانه مع المركب الدوائي الفانكوماميسين هيدروكلورايد (250 مايكروغرام/مللتر) في الوسط القاعدي متمثلا بهيدروكسيد الامونيوم بتركيز (2 مولاري). ثم رسم طيف الامتصاص وقيس مقابل المحاليل الصورية عند(462 نانوميتر). حيث اكدت النتائج الموضحة بالشكل (3) ان الحجم الامثل من الكاشف 2، 4- ثنائي نيتروأنيلين هو (1.2 مللتر) والذي اعطى اعلى امتصاصية مقارنة بالحجوم الاخرى.



الشكل (3) تحديد حجم الكاشف المثالي

دراسة نوع الحامض

يعد الحامض واحداً من المكونات الأساسية للتفاعل الذي يؤدي لتكوين ملح الديازونيوم ولهذا السبب فقد أُجريت هذه الدراسة لتحديد نوع الحامض الأمثل لأزوتة الكاشف 2، 4-ثنائي نيتروأنيلين، إذ تم استخدام مجموعة من الحوامض المختلفة القوية والضعيفة مثل (HCl, H₂SO₄, HNO₃, CH₃COOH, HCOOH) بتركيز (1 مولاري) وتم قياس الامتصاص عند الطول الموجي الأمثل (462 نانوميتر) و يبين الشكل (4) ان الحامض الانسب لأزوتة الكاشف (2، 4-ثنائي نيتروأنيلين) والذي يعطي اعلى امتصاص هو حامض الهيدروكلوريك.

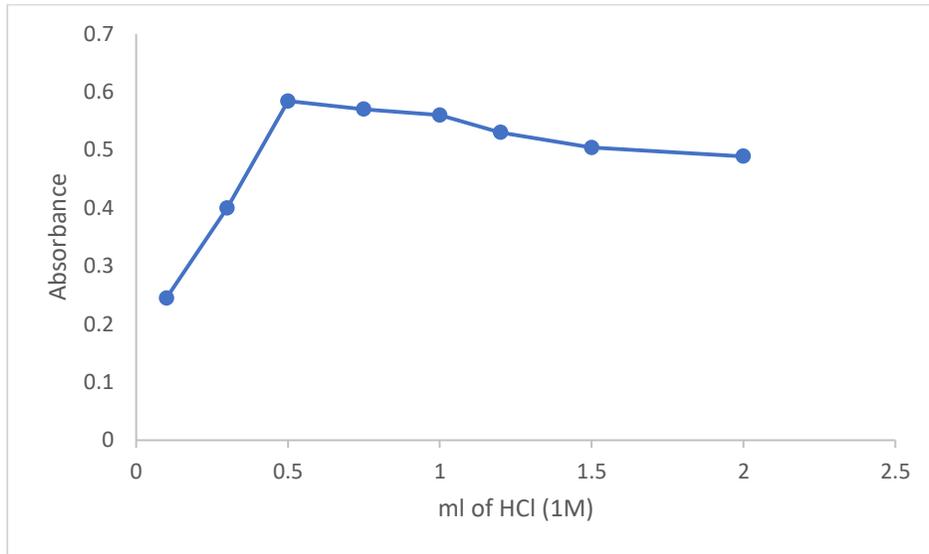


الشكل (4) تحديد نوع الحامض المثالي

دراسة حجم الحامض

بعد اختيار الحامض الأمثل لعملية الأزوتة فقد تم اضافة حجوم متزايدة من الحامض الهيدروكلوريك (0.1-2.0) مللتر بتركيز 1 مولاري لاختيار الكمية المثلى والتي تعطي اعلى امتصاصية وحساسية. بعد ذلك تم قياس امتصاص المحاليل مقابل

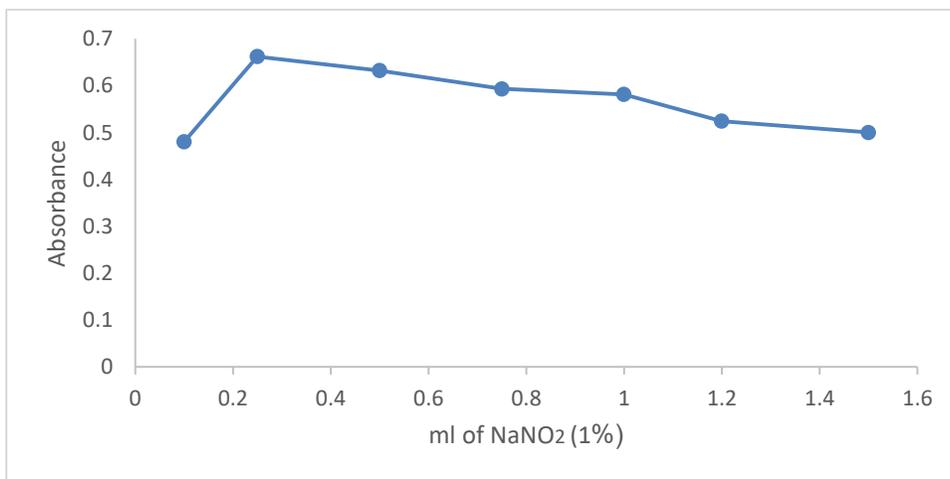
المحاليل الصورية بعد تركها عشرة دقائق بدرجة حرارة الغرفة (20 م °) ويتبين من الشكل (5) ان الحجم الامثل من الحامض هو 0.5 مللتر لذا تم اعتماده في التجارب اللاحقة.



الشكل (5) دراسة حجم الحامض

دراسة حجم نترتيت الصوديوم

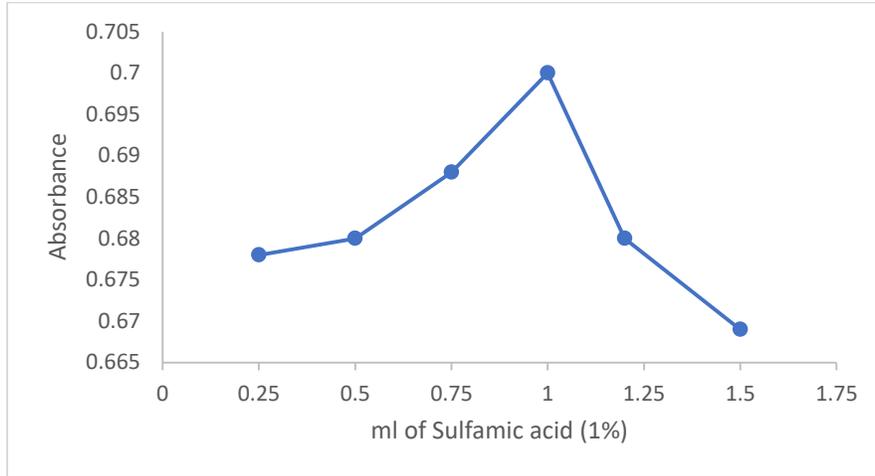
عمليا يعتبر ملح نترتيت الصوديوم من العوامل الأساسية في إتمام واكمال عملية الازوتة لذا كان من الضروري دراسة الكمية المثلى منه والتي تعطي اعلى امتصاص. فقد تم استخدام حجوم مختلفة تبدأ من (0.1-1.5) مللتر من نترتيت الصوديوم (1%)، بعد ذلك تم قياس الامتصاص عند 462 نانوميتر والشكل (6) يبين ان الحجم الامثل من نترتيت الصوديوم هي (0.25) مليلتر والتي تكفي لأزوتة (2،4- ثنائي نيتروانلين) حيث اعطى هذا الحجم اعلى قيمة امتصاص مقارنة بالحجوم الأخرى لذا تم اعتماده.



الشكل (6) تأثير كمية نترتيت الصوديوم

دراسة حجم حامض السلفاميك

الزيادة من نترت الصوديوم يتم التخلص منها عن طريق إضافة حامض السلفاميك. حيث ان الزيادة في تركيز الملح في المحلول تؤثر سلبا على استقرارية الصبغة لمتكونة لذا تم اضافة حامض السلفاميك بتركيز 1% للتخلص من النتروز الزائد الذي يضر بعملية الازوتة ويعرقل الوصول الى اعلى قيمة امتصاص ويعطي مركبات جانبية.

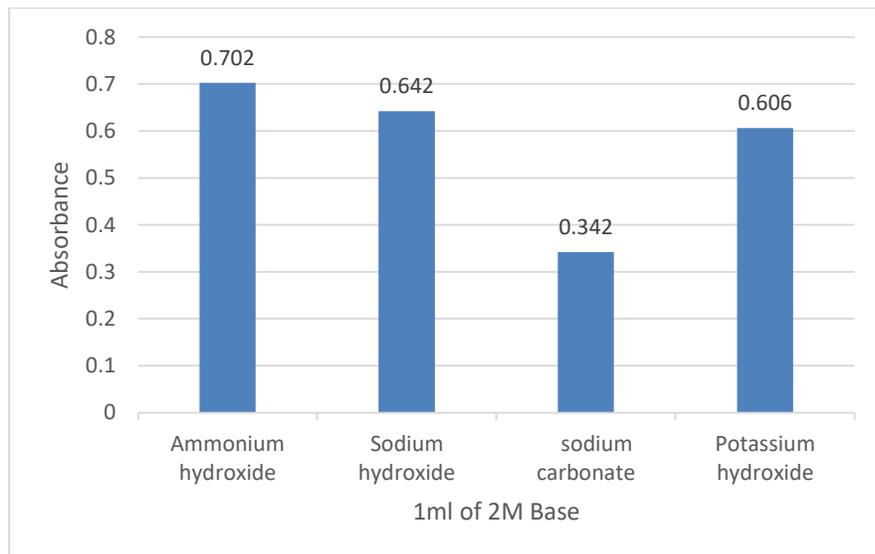


الشكل (7) تأثير حجم حامض السلفاميك

ومن خلال ملاحظة الشكل أعلاه فان الحجم المثالي من حامض السلفاميك بتركيز (1%) هو 1 ملتر حيث اعطى اعلى قيمة امتصاص لذا تم تثبيته في التجارب اللاحقة.

دراسة نوع القاعدة

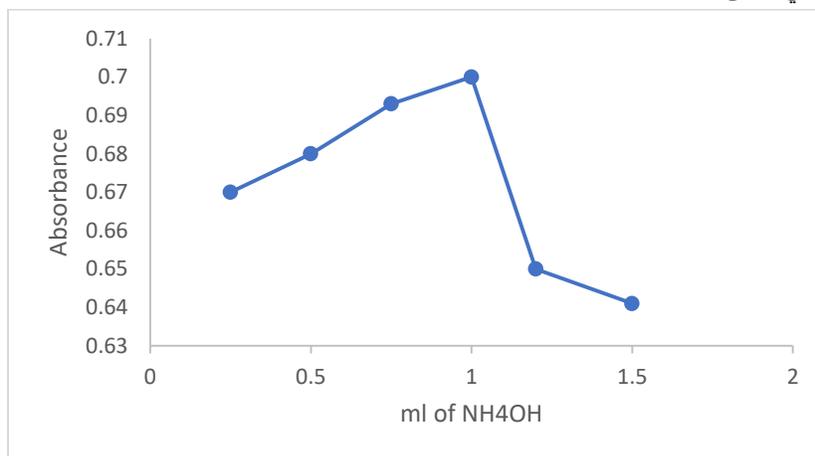
تمت دراسة عدة انواع من القواعد المختلفة القوية والضعيفة لغرض توفير الوسط المناسب للاقتزان بين الكاشف والمركب الدوائي وللحصول على اعلى قيمة امتصاص للمركب الناتج مثل (NH₄OH, NaOH, Na₂CO₃, KOH). اكدت النتائج الموضحة في الشكل (8) ان هيدروكسيد الامونيوم (2 مولاري) يعطي أفضل امتصاص لذا تم اعتماده.



الشكل (8) دراسة نوع القاعدة

دراسة حجم هيدروكسيد الامونيوم

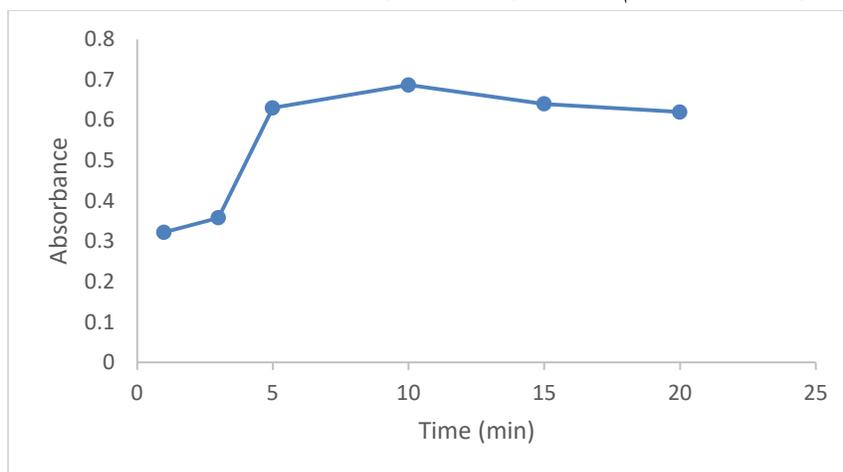
بعد تحديد الوسط القاعدي الامثل تم دراسة تأثير حجم مختلفة من هيدروكسيد الامونيوم (0.25-1.5) مللتر بتركيز (2 مولاري) على شدة امتصاص الصبغة المتكونة، و النتائج الموضحة في الشكل (9) تبين ان الحجم المثالي للهيدروكسيد هو (1 مللتر) حيث يعطي اعلى امتصاص .



الشكل (9) تحديد كمية هيدروكسيد الامونيوم

دراسة زمن تفاعل الازوتة

تم اجراء الدراسة لمعرفة الزمن الأنسب لأزوتة الكاشف (2،4-ثنائي نيتروانلين)، ومن خلال الامتصاصات الموضحة في الشكل (10) يتضح ان الزمن الأنسب لأتمام تفاعل الازوتة هو عشرة دقائق.



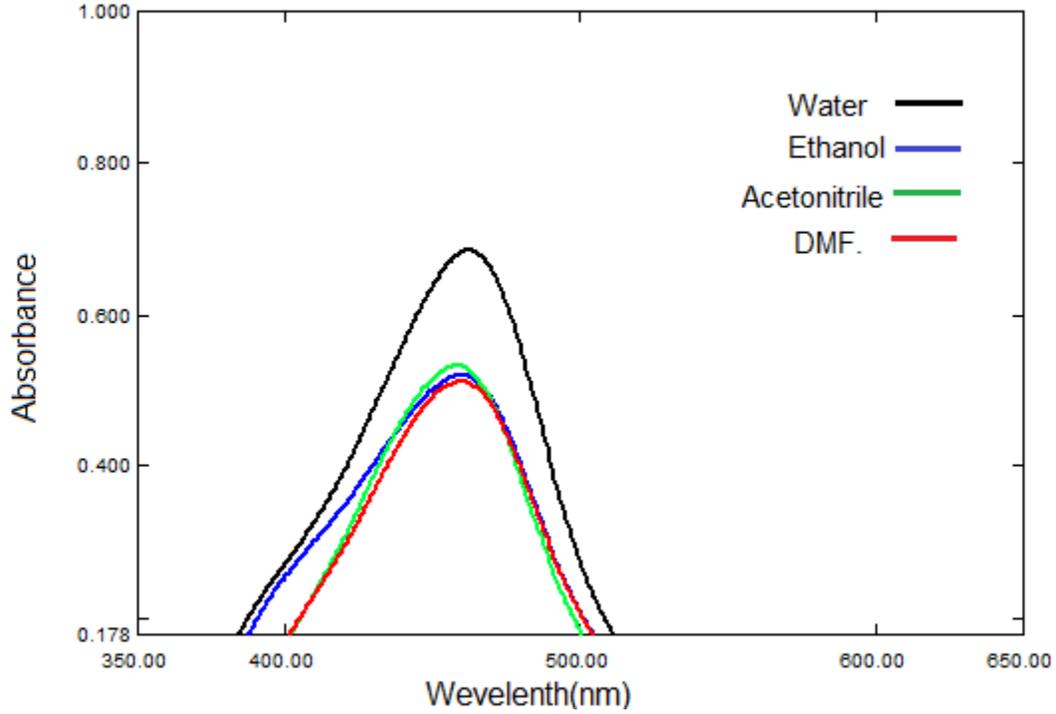
الشكل (10) دراسة زمن تفاعل الازوتة

دراسة تأثير المذيبات

تم دراسة عدة انواع من المذيبات العضوية ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, CH_3CN , $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, CH_3OH) بدلاً من الماء و ذلك بتخفيف المحاليل بعد اكمال الاضافات المثلى، وقيس امتصاص عند 462 نانوميتر ومن خلال ملاحظة الجدول (1) والشكل (11) يتبين ان التخفيف بالماء المقطر هو الافضل من بين المذيبات. حيث اعطى الماء اعلى طول موجي بالإضافة الى اعلى قيمة امتصاص ومما يفضل الماء أيضا اقتصاديته وتوفره.

الجدول (1) تأثير الانواع المختلفة من المذيبات

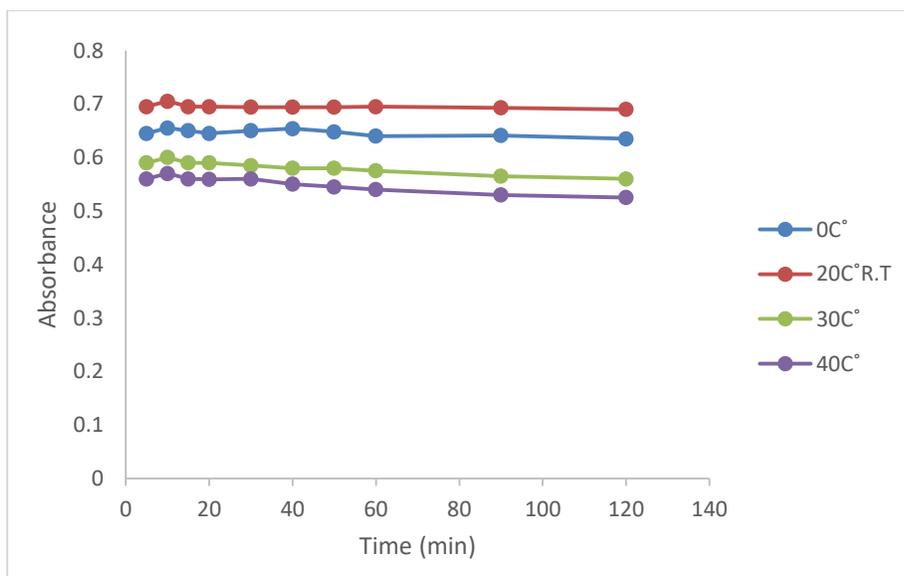
Solvent	Water	Ethanol	Methanol	Acetone	Acetonitrile	DMF.
Absorbance	0.686	0.522	Turbid	Turbid	0.534	0.513
(nm) _{maxλ}	462	460	-----	-----	457	459



الشكل (11) اطيف امتصاص المذيبات

دراسة استقرارية المعقد ودرجة الحرارة

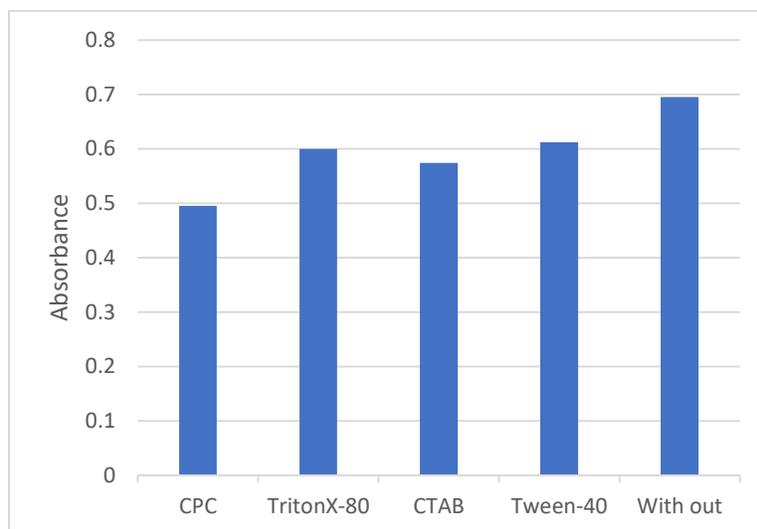
تمت الدراسة لبيان تأثير درجة الحرارة على امتصاص المعقد المتكون حيث تراوحت الدرجات الحرارية المدروسة بين (0-40 م°) اذ يمكن من خلال ملاحظة الشكل (12) ان درجة الحرارة الامثل هي (20 م°) وهي درجة حرارة المختبر حيث يعطي الناتج اعلى امتصاص بعد مرور عشرة دقائق من التخفيف وباستقراره لا تقل عن ساعتين.



الشكل (12) تأثير درجة الحرارة على استقرارية المعقد

دراسة تأثير عوامل الشد السطحي

تم اختبار عدة مركبات من عوامل الشد السطحي CTAB, CPC, TritonX-80, Tween-40 لبيان مدى تأثيرهما الإيجابي والسلبى على امتصاص المركب الناتج وعلى الطول الموجي. حيث حضر كل منها بتركيز 1% وتبين النتائج في الشكل (13) ان عوامل الشد السطحي كان لها تأثير سلبي على امتصاص المعقد المتكون لذا استبعادها ولم تدرج في الظروف المثلى.



الشكل (13) تأثير عوامل الشد السطحي

دراسة تسلسل الإضافة

لتسلسل الإضافة دور كبير في طريق الوصول الى اعلى حساسية واعل امتصاص، لذا تمت الدراسة من خلال اضافة المركب الدوائي قبل القاعدة وبعدها اذ تم ملاحظة ان اضافة المركب الدوائي قبل القاعدة يؤدي لإعطاء امتصاص اعلى للصبغة المتكونة، لهذا تم اعتماد ذلك، الجدول (2).

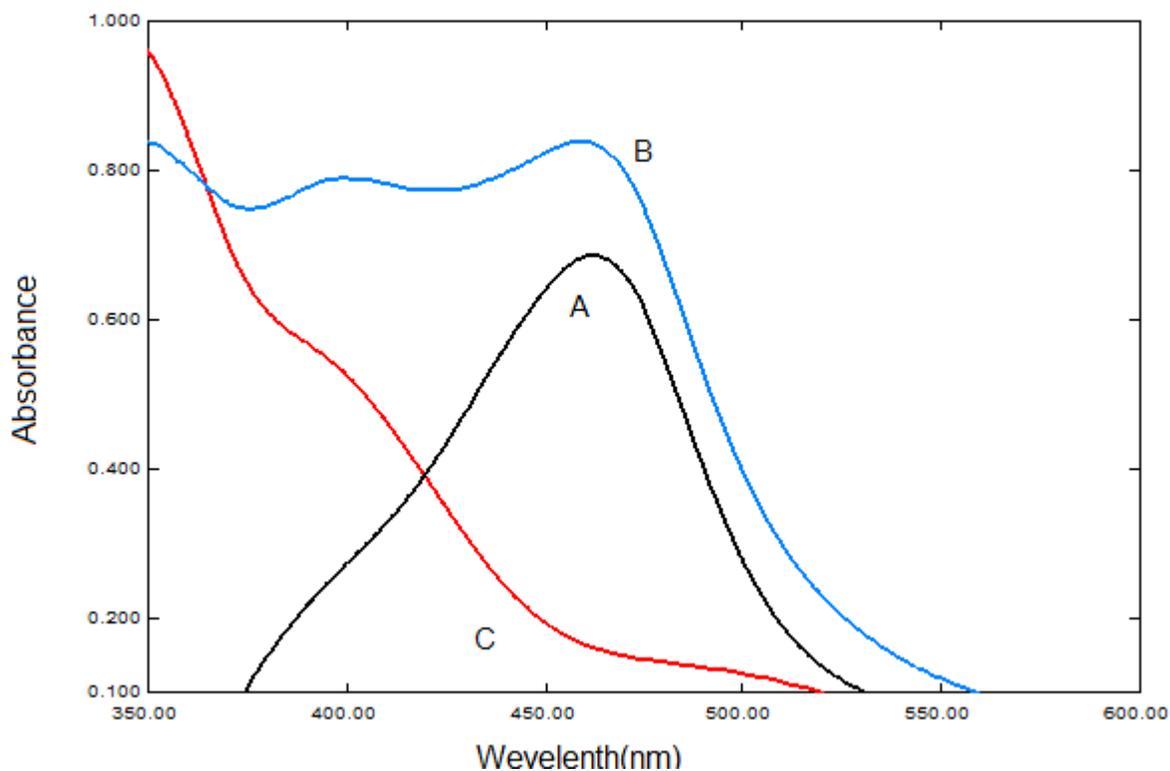
الجدول (2) تأثير ترتيب اضافة مواد التفاعل

Number of Order	Sequence of adding compounds	Absorbance
I	A+B+C+D+E+F	0.69
II	A+B+C+D+F+E	0.12

A=2,4-dinitroaniline, B=Hydrochloric acid, C=Sodium nitrite, D=Sulfamic acid, E=Vancomycin. HCl, F=Ammonium hydroxide

طيف الامتصاص النهائي

بعد تثبيت الظروف المثلى الخاصة بتقدير الفانكوميسين هيدروكلوريد، تم رسم طيف الامتصاص النهائي للصبغة المتكونة من اقتران (2،4-ثنائي نيتروانلين) المؤزوت مع الفانكوميسين هيدروكلوريد في الوسط القاعدي (NH₄OH) مقابل المحلول الصوري والذي اعطى اعلى شدة لامتصاص (λ_{max}) عند (462 نانوميتر) الشكل (14).



الشكل (14) طيف الامتصاص النهائي لمعدد الفانكوميسين هيدروكلوريد

A= الفانكوميسين هيدروكلوريد (25 مايكروغرام/مللتر) مقابل المحلول الصوري

B= الفانكوميسين هيدروكلوريد مقابل D.W

C= المحلول الصوري مقابل D.W

الدقة والتوافق للطريقة المقترحة

تم ايجاد الدقة والتوافق للطريقة عن طريق حساب الاسترجاعية والانحراف القياسي النسبي وذلك باستخدام سبع قراءات لأربع تراكيز مختلفة من الفانكوميسين هيدروكلوريد وتبين النتائج المدرجة ادناه (3) ان معدل نسبة الاسترجاع بلغت (100.53%) وهذا يدل على دقة الطريقة المقترحة، بالإضافة الى ان قيمة الانحراف القياسي النسبي بلغت اقل من (2.1%) وهذا يدل على التوافقية الجيدة للطريقة المقترحة.

الجدول (3) دقة وتوافق الطريقة المقترحة

Drug	Conc. of drug ($\mu\text{g/ml}$)		Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
	Added	Found			
Vancomycin. HCl	10	9.86	98.6	100.53	1.4
	15	14.66	97.74		2.08
	25	25.86	103.44		0.95
	37.5	38.38	102.34		0.94

* Average of seven determination

تطبيق الطريقة المقترحة على المستحضر الصيدلاني

تشير النتائج المدرجة في الجدول (4) إلى ان الطريقة المقترحة تعتبر ناجحة في تقدير المركب الدوائي في مستحضره الصيدلاني كونها متفقتة بنحو جيد مع المحتوى الأصلي للمستحضر إذ ان معدل نسبة الاسترجاع بلغت بين 100.2%-103.41%.

الجدول (4) تطبيق الفانكوميسين هيدروكلوريد في مستحضره الصيدلاني

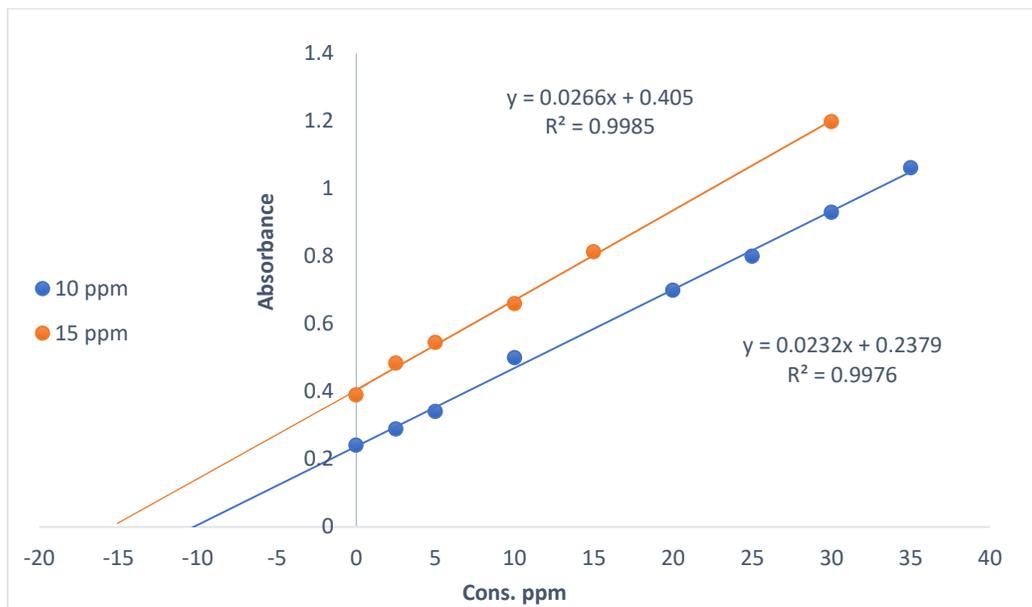
Pharmaceutical formulation	Certified cons.	Amount present ($\mu\text{g/ml}$)	Drug content found* (mg)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	Average recovery (mg)
Vancomycin Vancor vial-Georgia	1000mg	10	1002.0	100.2	102.14	1021.425
		15	1012	101.2		
		25	1037.6	103.76		
		37.5	1034.1	103.41		

* Average of seven determination

تطبيق الاضافة القياسية

لإجل اثبات كفاءة الطريقة المتبعة ومدى نجاحها لتقدير الفانكوميسين هيدروكلوريد وعدم وجود تداخل من مواد السواغ. من اجل ذلك طُبقت طريقة الاضافة القياسية لتركيزين مختلفين (10,15مايكروغرام/مللتر) من المستحضر الدوائي وضمن

الظروف القياسية المثبتة ومن خلال ملاحظة الجدول (5) تبين الى ان الطريقة المتبعة خالية من التداخلات لمواد السواغ المضافة في المستحضر الصيدلاني ومتفقة بنحو مرضٍ مع المحتوى الاصلي للمستحضر الصيدلاني وبانتقائية مقبولة احصائياً.



الشكل (15) الاضافة القياسية لتقدير (10,15 مايكروغرام/مللتر) من الفانكوميسين هيدروكلوريد

الجدول (5) الاضافة القياسية لتقدير الفانكوميسين هيدروكلوريد في مستحضره الصيدلاني

Pharmaceutical preparation	Certified value	Amount present (µg/ml)	Recovery (%)	Drug content found (mg)	
				Present method*	Standard addition method
Vancomycin Vancor vial- Georgia	1000 mg	10	102.5	1002.0	1025
		15	101.46	1012	1014.6

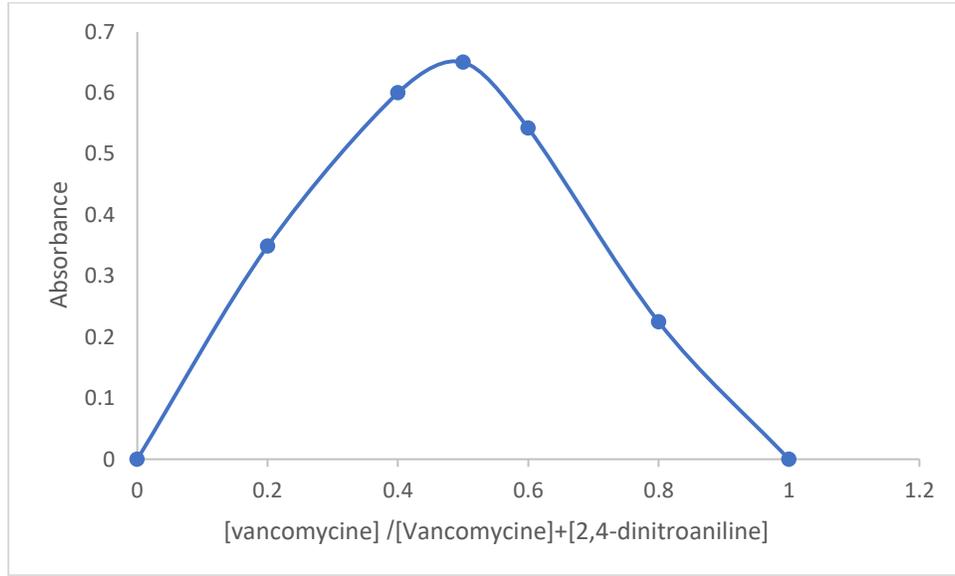
دراسة طبيعة المعقد المتكون ونسبة مكوناته

لدراسة طبيعة المعقد الناتج من تفاعل الكاشف (4،2-ثنائي نيتروانيلين) المؤزوت مع المركب الدوائي (الفانكوميسين هيدروكلوريد) تم تطبيق طريقتي التغيرات المستمرة (طريقة جوب) وطريقة النسبة المولية.

طريقة التغيرات المستمرة (Job's method)

تم تطبيق الطريقة وذلك لمعرفة وتثبيت نسبة الارتباط التركيبية بين كلاً من الكاشف (4،2-ثنائي نيتروانيلين) والمركب الدوائي (الفانكوميسين هيدروكلوريد) وذلك اعتماداً على التغير في امتصاص المحاليل التي تحتوي على حجوم مختلفة لمحاليل تراكيذها المولارية متكافئة (5×10^{-4} مولاري) من المركب الدوائي (الفانكوميسين هيدروكلوريد) والكاشف (4،2-ثنائي

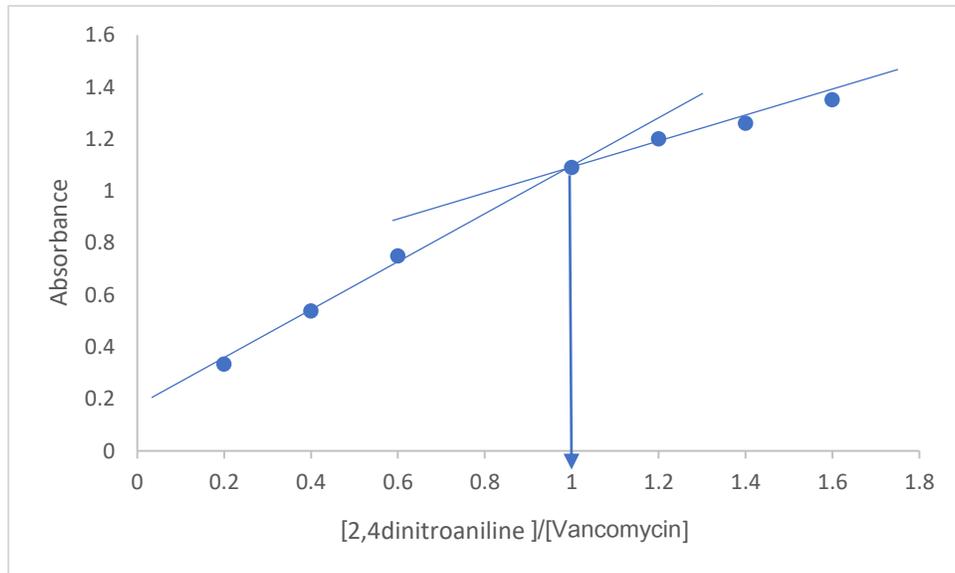
نيتروانلين). إذ يكون الحجم الكلي لكلاً من المركب الدوائي و الكاشف هو (1.0 مللتر) ثابتاً لا يتغير في حجم نهائي (10 مللتر)، تم قياس امتصاص المحاليل مقابل محاليلها الصورية عند 462 نانوميتر و من خلال النتائج الموضحة في الشكل (16) يتبين ان النسبة التركيبية هي 1:1 بين الفانكوميسين هيدروكلوريد و 4،2-ثنائي نيتروانلين.



الشكل (16) طريقة جوب لبيان طبيعة المعقد المتكون

طريقة النسبة المولية (mole ratio)

طبقت طريقة النسبة المولية من اجل التأكد من صحة النتائج المستحصلة من طريقة التغيرات المستمرة. حيث تم تثبيت كمية الفانكوميسين هيدروكلوريد عند 1.0 مللتر من محلول (5×10^{-4} كمولاري) وتمت اضافة الكاشف (4،2-ثنائي نيتروانلين) بكميات متزايدة (0.2-1.6) مللتر بنفس تركيز الفانكوميسين هيدروكلوريد ، وقيس امتصاص عند 462 نانوميتر والشكل (17) يوضح النتائج التي تم التوصل اليها. حيث تم تأكيد النتائج المستحصلة بالطريقة الأولى وهي أيضا متفقة بشكل ممتاز مع الادبيات (Al-Abachi, et al. 2015).



الشكل (17) طريقة النسبة المولية لمعقد الفانكوميسين هيدروكلوريد 4،2-ثنائي نيتروانلين

ثابت الاستقرار للمعقد المتكون

تم حساب ثابت الاستقرار للمعقد المتكون بنسبة (1:1) بين الفانكوميسين هيدروكلوريد - (2،4- ثنائي نيتروانلين)

الجدول (6) ثابت الاستقرار للمعقد المتكون

Compound	Conc.(mol.l ⁻¹)	Absorbance		α	Average of $K_{st}(1.mole^{-1})$
		As	Am		
Vancomycin.HCl	1.5×10^{-5}	0.326	0.582	0.439	2.23×10^5
	2.5×10^{-5}	0.538	0.837	0.357	
	3.5×10^{-5}	0.726	1.002	0.275	

من الجدول اعلاه (6) نستنتج ان معدل قيمة ثابت الاستقرار لمعقد الفانكوميسين هيدروكلوريد و (2،4- ثنائي نيتروانلين) المؤزوت (2.23×10^5) لتر/مول مما يدل واضحاً على ان المعقد يمتلك استقرارية عالية.

مقارنة الطريقة المطورة مع طريقة اخرى

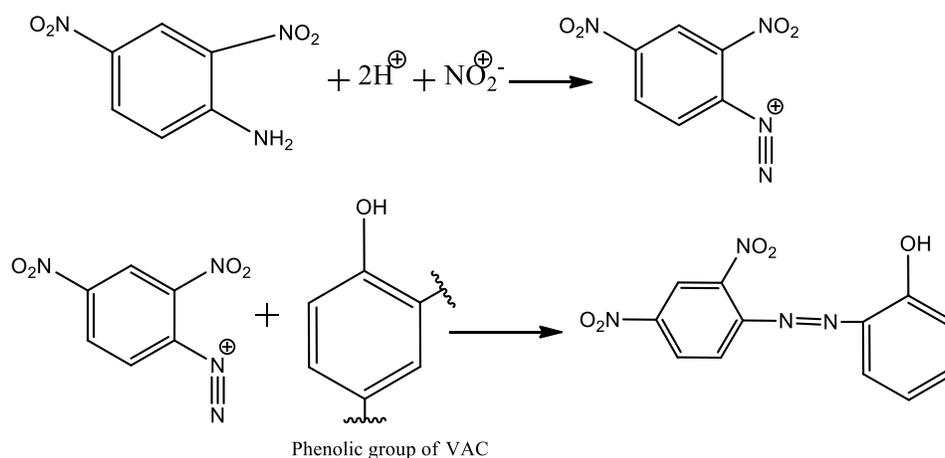
تم اجراء مقارنة الطريقة المقترحة لتقدير الفانكوميسين هيدروكلوريد مع طريقة اخرى طيفية باستخدام تفاعلات الازوتة والاقتران، وأدرجت نتائج المقارنة في الجدول (7) ولقد بينت النتائج ان الطريقة المقترحة تمتلك حساسية اعلى من الطريقة الاخرى.

الجدول (7) مقارنة الطريقة المقترحة مع بعض الطرق المنشورة في الادبيات

Analytical parameter	Present method	Literature method (Abed and Hussein 2015)
$\lambda_{max}(nm)$	462	465
Method	Diazotization and coupling	Diazotization and coupling
Linearity($\mu g/ml$)	0.25-55	5 – 400
Molar absorptivity ($l.mol^{-1}.cm^{-1}$)	3.71×10^4	5.051×10^3
Recovery (%)	100.53	100.04
RSD (%)	1.3425	1.332
Sandell Sensitivity (ng/cm^2)	0.04	0.2941

التفاعل الكيميائي المقترح

يتفاعل الكاشف 4،2-ثنائي نيتروانيلين في الوسط الحامضي مع نترات الصوديوم لتكوين ملح الديازونيوم وحسب المعادلة ادناه (Panti,2016). ثم يقترن الكاشف المؤزوت 4،2-ثنائي نيتروانيلين مع المركب الدوائي (الفانكوميسين هيدروكلوريد) في الوسط القاعدي (هيدروكسيد الامونيوم) ليعطي صبغة ازوية لها اقصى امتصاص عند الطول الموجي 462 نانوميتر.



تم اجراء تطوير طريقة طيفية ذات حساسية و بسيطة في نفس الوقت لتقدير الفانكوميسين هيدروكلوريد في المحلول المائي، تعتمد الطريقة على تفاعلات الازوتة والاقتران حيث تم مفاعلة الكاشف (2،4-ثنائي نايتروانلين) المؤزوت مع الفانكوميسين هيدروكلوريد في الوسط القاعدي تكوّن من خلال ذلك صبغة الأزو اللون والتي كانت استقراريتها لمدة ساعتين على الاقل، اعطت الصبغة اعلى امتصاص لها عند الطول الموجي(462) نانوميتر حيث يتبع قانون بير بمحدود (0.25-55) مايكروغرام/مللتر والامتصاصية المولارية (3.71×10^4) لتر.مول⁻¹.سم⁻¹ وحساسية ساندل (0.04) نانوغرام/سم² و معدل نسبة الاسترجاع (100.53%) و الانحراف القياسي النسبي لا يتعدى (2.1%). طبقت الطريقة المقترحة بنجاح في تقدير الفانكوميسين في مستحضره الصيدلاني من دون تواجد أي تداخل من مواد السواغ.

References

- Abed, S. S., & Hussein, O. T. (2015). Spectrophotometric determination of vancomycin hydrochloride (batch and flow-injection) using O-nitroaniline as diazotized chromogenic reagent. *Iraqi Journal of Science*, 56(4B), 3025-3035 .
- Al-Abachi, M. Q., Hadi, H & .Yousef, F. J. (2015). Flow Injection-Spectrophotometric Determination of Vancomycin Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations Using Diazotized Metoclopramide. *Al-Nahrain Journal of Science*, 18(1), 9-19 .
- Al-ward, H. S. A.-w., Al-Abachi, M. Q., & Ahmed, M. R. (2023). Spectrophotometric Analysis of Vancomycin Hydrochloride in Pure and Pharmaceutical Injections via Batch and Cloud Point Extraction Techniques. *Baghdad Science Journal*, 20(2), 0245-0245 .
- Aleixa do Nascimento, P., Kogawa, A. C., & Salgado, H. (2020). A new ecological HPLC method for determination of vancomycin dosage form. *Current Chromatography*, 7(2), 82-90 .
- Cetinkaya, A., Yıldız, E., Kaya, S. I., Çorman, M. E., Uzun, L., & Ozkan, S. A. (2022). A green synthesis route to develop molecularly imprinted electrochemical sensor for selective detection of vancomycin from aqueous and serum samples. *Green Analytical Chemistry*, 2, 100017 .
- Chantadee, T., Santimaleeworagun, W., Phorom, Y., Chuenbarn, T., & Phaechamud, T. (2020). Vancomycin HCl-loaded lauric acid in situ-forming gel with phase inversion for periodontitis treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101615 .
- Datta, D., Panchal, D. S., & Venuganti, V. V. K. (2021). Transdermal delivery of vancomycin hydrochloride :Influence of chemical and physical permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 602, 120663 .

- El-Din, M. K. S., Ibrahim, F., El-Deen, A. K., & Shimizu, K. (2018). Stability-indicating spectrofluorimetric method with enhanced sensitivity for determination of vancomycin hydrochloride in pharmaceuticals and spiked human plasma: Application to degradation kinetics. *Journal of food and drug analysis*, *26*(2), 834–841 .
- Fang, F., Li, N., Xu, C., Tan, R., Yang, J., & Zheng, Z. (2021). An UHPLC–UV Method for the Determination of Vancomycin in Human Serum. *Current Pharmaceutical Analysis*, *17*(7), 847–852 .
- Ghasemiyeh, P., Vazin, A., Zand, F., Azadi, A., Karimzadeh, I., & Mohammadi-Samani, S. (2020). A simple and validated HPLC method for vancomycin assay in plasma samples: the necessity of TDM center development in Southern Iran. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *15*(6), 529–540 .
- Gill, A. A., Singh, S., Agrawal, N., Nate, Z., Chiwunze, T. E., Thapliyal, N. B., . . . Karpoomath, R. (2020). A poly(acrylic acid)-modified copper-organic framework for electrochemical determination of vancomycin. *Microchimica acta*, *187*, 1–9 .
- Hadi, H. (2014). Spectrophotometric determination of vancomycin hydrochloride in pharmaceutical preparations through diazotization and coupling reactions. *Iraqi Journal of Science*, 1684–1693 .
- Hassan, B., & Hadi, H. (2022). Development of continuous flow injection analysis method for determination of oxymetazoline and vancomycin hydrochloride in pharmaceutical preparations. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, *36*(2), 303–313 .
- He, J., Wang, J., Cao, L., Zhang, X., Li, G., Xu, B., . . . Yang, J. (2024). Determination of vancomycin and meropenem in serum and synovial fluid of patients with prosthetic joint infections using UPLC–MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, *59*(6), e5041 .
- Iranifam, M., & Dadashi, Z. (2022). Chemiluminescence determination of vancomycin by using NiS nanoparticles–luminol–O₂ system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.120489,267
- Iranifam, M., Rasht, M. T. G., & Al Lawati, H. A. (2021). CuS nanoparticles-enhanced luminol–O₂ chemiluminescence reaction used for determination of paracetamol and vancomycin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *261*, 120038 .
- Kieu, V. A., Dao, Y. N., Vu, T. L., Le Duc, Q., Tran, T. M. H., Hoang, Q. A., . . . Nguyen, T. A. H. (2023). Simultaneous Determination of Vancomycin, Cefoperazone, Sulbactam, and Ceftriaxone Antibiotics by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless

Conductivity Detection (CE–C4D). *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, *39*(3).

Lertsuphotvanit, N., Santimaleeworagun, W., Narakornwit, W., Chuenbarn, T., Mahadlek, J., Chantadee, T., & Phaechamud, T. (2022). Borneol-based antisolvent-induced in situ forming matrix for crevicular pocket delivery of vancomycin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, *617*, 121603.

Liu, M., Yang, Z.–H., & Li, G.–H. (2018). A novel method for the determination of vancomycin in serum by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in patients with diabetic foot infections. *Molecules*, *23*(11), 2939.

Marzouq, M. A., Salman, B. I., Hussein, S. A., & Ali, M. F. (2019). Utility of fluorecamine-based approach for highly sensitive spectrofluorimetric determination of Ceftazidime and Vancomycin in pharmaceuticals and real human plasma. *Microchemical Journal*, *145*, 218–225.

Mohamed, A. R. (2022). Utility of silver-nanoparticles for nano-fluorimetric determination of vancomycin hydrochloride in pharmaceutical formulation and biological fluids: greenness assessment. *Journal of Fluorescence*, *32*(5), 1899–1912.

Pande, S., & Parikh, J. R. (2019). Development and Validation of UV–Spectrophotometric Method for estimation of Vancomycin Hydrochloride. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *9*(3-s), 116–118.

Panti, M. Neha, (2016),". *Diazotization and Coupling Reaction of Differently Substituted Aromatic Amines and Investigation of Their Solvent–Chromic Behavior*", *Der Chemica Sinica*, *7*(2), 93–100.

Rahimpour, E., Khoubnasabjafari, M., Hosseini, M. B., & Jouyban, A. (2021). Copper nanocluster-based sensor for determination of vancomycin in exhaled breath condensate: A synchronous fluorescence spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *196*, 113906.

Zhang, J., Du, Y., Zhang, Q., & Lei, Y. (2014). Evaluation of vancomycin-based synergistic system with amino acid ester chiral ionic liquids as additives for enantioseparation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis. *Talanta*, *119*, 193–201.

Zhou, H., Chen, Q., Song, X., He, L., & Liu, R. (2022). Surface molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of vancomycin in plasma samples using HPLC–MS/MS. *Analytical Sciences*, *38*(9), 1171–1179.