

## التقدير الطيفي للتراسايلكلين هيدروكلوريد بصورته النقية وفي مستحضرات صيدلانية بالاقتران مع حامض الانثرانك المؤزوت

مريم محسن عبد

سرمد بهجت ديكران

علي خليل محمود

قسم الكيمياء/ كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)/ جامعة بغداد

استلم في: 8/أيار/2016، قبل في: 5/حزيران/2016

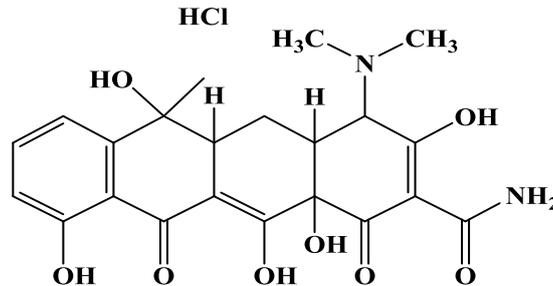
### الخلاصة

تم استعمال طريقه طيفيه سهله وسريعه وحساسة لتقدير دواء تتراسايلكلين هيدروكلوريد في عيناته النقية وفي بعض المستحضرات الصيدلانية. تعتمد الطريقه على تفاعل اقتران للمضاد الحيوي اعلاه مع حامض الانثرانك المؤزوت لتكوين صبغه أزو مستقرة صفراء اللون أعطت اعلى امتصاص عند الطول الموجي 419 نانوميتر، اذ استعملت طريقه المتغيرات الاحادية والمتعددة لضبط ظروف التجربة. أعطت طريقه المتغيرات المتعددة (تصميم التراكم المركزي) خطية تراوحت بين (0.5-60) ميكروغرام.ملليتر<sup>-1</sup> وامتصاصية مولية مقدارها 14619 لتر.مول<sup>-1</sup>.سننيمتر<sup>-1</sup> ووجد كشف يساوي 0.2813 ميكروغرام.ملليتر<sup>-1</sup>. تم تطبيق الطريقه بنجاح في تقدير تتراسايلكلين هيدروكلوريد في بعض المستحضرات الصيدلانية وبدون تأثير يذكر على قيم الامتصاص من المتداخلات المتواجدة في تلك المستحضرات.

**الكلمات المفتاحية:** طيفية، تتراسايلكلين هيدروكلوريد، أزو، المتغيرات الاحادية والمتعددة.

## المقدمة

تتراسايكلين هيدروكلوريد هو اسم لمركب هيدروكاربوني رباعي الحلقة يمتلك الصيغة الكيميائية  $C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl$  [1] وهو مضاد حيوي فعال يستعمل في معالجة الكثير من الالتهابات الناتجة من البكتريا الموجبة والسالبة تجاه صبغة الغرام [2,3]، مثل الالتهابات الناتجة عن الجروح والحروق وحب الشباب والتهابات العين واللثة [3,4]. كذلك يستعمل العقار اعلاه في معالجة مرض الكوليرا [3]. يقل امتصاص تتراسايكلين هيدروكلوريد بواسطة مضادات الحموضة والحليب لأنها من الممكن ان تكون معقدات غير قابله للذوبان مع الكالسيوم والمغنيسيوم والحديد [3,5]. مخطط (1) يوضح الصيغة التركيبية للعقار اعلاه. [1]



مخطط (1)

استعملت عدة طرائق لتقدير عقار تتراسايكلين مثل [7,6]HPLC، [8] RHPLC، [9] LC، [9]، الامصاص الفولتامتري [10] و الحقن الجرياني [11-13] وعلى اية حال تتطلب هذه الطرائق معدات غالية الثمن ومهارة علمية الطرائق الطيفية، هي الاكثر انتشاراً لتقدير تتراسايكلين مثل تكوين معقدات لهذا العقار مع الحديد [14]، الازدواج التأكسدي [15]، ازدواج ديازو [16]، معقدات انتقال الشحنة [17] والطرائق الطيفية الحركية [18]. يتضمن العمل اقتراح طريقة طيفية جديدة لتقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد بصورته النقية وفي المستحضرات الصيدلانية عن طريق اقتترانه مع حامض الانثرانك المؤزوت لتكوين صبغه ازو مستقرة محلولها اصفر اللون. استعملت طريقتان لضبط ظروف العمل وايجاد الظروف الفضلى لتقدير العقار اعلاه وهما طريقة المتغيرات الاحادية وطريقة المتغيرات المتعددة والمتمثلة بتصميم التراكم المركزي.

## الجزء العملي

### الأجهزة المستعملة

استعمل جهاز مطياف ذي الشعاع المزدوج نوع UV-VIS 1800- SHIMADZU واستعملت خلايا من الكوارتز ذات مسار ضوئي 1 سم، ميزان حساس ذو اربعة مراتب بعد الفارزة نوع Sartorius ومسخن حراري نوع Labtech.

### المواد والمحاليل المستعملة

تم استعمال المواد الكيميائية ذات النقاوة العالية والماء المقطر في تحضير المحاليل

### محلول عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد 500 ميكروغرام.مليتر<sup>-1</sup>

حضر محلول تتراسايكلين هيدروكلوريد بتركيز 500 ميكروغرام.مليتر<sup>-1</sup> من اذابة 0.050 غرام من المادة النقية (مزوده من الشركة العامة لصناعة الأدوية - سامراء العراق) في 10 ملليتر من الماء المقطر واكمال الحجم الى العلامة باستعمال قنينة حجمية ذات سعة 100 ملليتر.

### محاليل الحوامض والقواعد المستعملة

حضرت محاليل لحامض الهيدروكلوريك بتركيز 5 مولاري ومحاليل هيدروكسيد الصوديوم وهيدروكسيد البوتاسيوم وهيدروكسيد الليثيوم وهيدروكسيد الامونيوم اضافة الى كاربونات الصوديوم وبتركيز 1 مولاري لكل منهم في وسط مائي واستعملت بدون معايرة.

### محلول ملح الديازونيوم 0.005 مولاري

تم تحضير هذا المحلول بأذابة 0.0686 غرام من مسحوق حامض الانثرانك في 30 ملليتر من الماء المقطر مع الرج والتسخين. وبعد الإذابة التامة اضيف 0.68 ملليتر من حامض الهيدروكلوريك المركز مع التحريك. وبعد ان برد المزيج في حمام ثلجي بحدود (0-5 °م) نقل المحلول الى قنينة حجميه معتمه سعه 100 ملليتر ثم اضيف 0.0345 غرام من نترت

الصوديوم ورج المزيج لحين ذوبان الملح وترك المزيج لمدة 5 دقائق واكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر وحفظ محلول ملح حامض الانثرانك المؤزوت في التلاجه.

### محاليل المستحضرات الصيدلانية

تم خلط محتوى 10 كبسولات مع بعض ( بعد وزن كل واحدة على حدة), ثم وزنت كمية معينة من المستحضر الصيدلاني تحوي على مايكافيء 250 ملغرام من المادة الدوائية النقية. واذيبت في 50 مليلتر من الماء المقطر ورشح المحلول باستخدام ورقة ترشيح نوع (41 Whatman No.) نقلت هذه الكمية بعد الاذابة الى قنينة حجمية سعة 100 مليلتر ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى العلامة.

### طريقة العمل الاولية

اجريت دراسة تمهيدية واولية لمعرفة امكانية اقتران عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد مع ملح الديازونيوم المحضر، حيث تم اضافة 0.6 مليلتر من ملح الديازونيوم بتركيز 0.005 مولاري الى قنينة حجمية سعة 10 مليلتر تحوي على 1 مليلتر من محلول التتراسايكلين هيدروكلوريد ذو تركيز 100 ميكروغرام. مليلتر<sup>-1</sup> مع الرج ثم يضاف اليه 0.3 مليلتر من هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري وبعدها يضاف اليه 0.2 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك 5 مولاري ويكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر، وبذلك يصبح تركيز عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد بعد التخفيف 10 ميكروغرام. مليلتر<sup>-1</sup>.

### طريقه العمل المعتمدة

#### I- بحسب الظروف الفضلى التي تم الوصول اليها بأسلوب المتغير الاحادي

تنتقل الى مجموعة من القناني الحجمية سعة 10 مليلتر حجوم متزايدة من محلول عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد تحوي على (5- 500) ميكروغرام ثم يضاف الى كل منها 1.2 مليلتر من 0.005 مولاري ملح الديازونيوم مع الرج و 0.4 مليلتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 مولاري). وبعد اضافة 0.6 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك (5 مولاري) يكمل حجم مزيج التفاعل الى العلامة بالماء المقطر وتقاس قيمة الامتصاص عند الطول الموجي 419 نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

#### II- بحسب الظروف الفضلى التي تم الوصول اليها بأسلوب المتغيرات المتعددة

تضاف الى سلسلة من قنن حجمية سعة 10 مليلتر حجوم متزايدة من محلول يحتوي (5- 600) ميكروغرام من تتراسايكلين هيدروكلوريد ثم يضاف الى كل منها 3 مليلتر من 0.005 مولاري ملح الديازونيوم مع الرج و 1 مليلتر من محلول 1 مولاري هيدروكسيد الصوديوم ويترك المزيج لمدة ثمانية دقائق جانباً. وبعد ذلك يضاف 0.6 مليلتر من محلول حامض الهيدروكلوريك 5 مولاري ويكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر وتقاس قيمة الامتصاصية عند الطول الموجي 419 نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

### النتائج والمناقشة

#### طيف الامتصاص الاولي

اظهرت النتائج الاولية امكانية اقتران عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد مع ملح حامض الانثرانك المؤزوت وتكوين صبغة أزو مستقرة اعطت اعظم امتصاص عند الطول الموجي 419 نانوميتر مقابل المحلول الصوري. يظهر الشكل (1) طيف امتصاص كل من ناتج التفاعل المتكون والمحلول الصوري اعتماداً على طريقة العمل الاولية.

#### دراسة العوامل المؤثرة لإيجاد الظروف الفضلى

تم اتباع اسلوبين للوصول الى الظروف الفضلى لتقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد بعد اقترانه مع حامض الانثرانك المؤزوت وذلك بإجراء الدراسة بأسلوب دراسة المتغير الاحادي واسلوب المتغيرات المتعددة. ان من العوامل الأساسية التي تسهم في السيطرة على التفاعلات المتضمنة تفاعل الاقتران لتكوين صبغة الأزو هي الدالة الحامضية لوسط التفاعل ودرجة الحرارة التي يحضر فيها ملح الديازونيوم إضافة الى عوامل أخرى [19]. تمت دراسة تأثير الكاشف المؤزوت والزمن اللازم لتفاعله مع العقار اعلاه وكمية هيدروكسيد الصوديوم اللازمة للوصول الى اعلى قيمة للامتصاص. كما وتمت دراسة تأثير كمية حامض الهيدروكلوريك المضاف وترتيب الإضافة للحصول على اعلى منتج للتفاعل المعتمد.

أظهرت النتائج ان استعمال 1.2 مليلتر من محلول 0.005 مولاري من الكاشف المؤزوت و 0.4 مليلتر من محلول 1مولاري NaOH و 0.6 مليلتر من محلول 5 مولاري HCL قد اعطى افضل النتائج (الشكل 2). كما أظهرت نتائج الدراسة ان العقار يتفاعل مباشرة مع ملح حامض الانثرانك المؤزوت معطياً محلول اصفر اللون يظهر مباشرة بعد اضافة القاعدة، حيث وجد ان هيدروكسيد الصوديوم هي الأفضل عند مقارنتها ببقية القواعد المستعملة لغرض توفير الوسط الملائم لتفاعل الاقتران (الشكل 3). وقد وجد ان أفضل ترتيب لمزج محاليل الكواشف المستعملة كان بمزج محلول العقار ثم محلول ملح الكاشف المؤزوت وبعد ذلك يضاف محلول القاعدة (الجدول 1).

درست ثلاثة متغيرات ذات تأثير رئيس في التفاعل لإيجاد القيم الفضلى لها عمليا بالاعتماد على أسلوب المتغيرات المتعددة نمط تصميم التراكيم المركزي [20-21] لتقدير عيار تتراسايكلين هيدروكلوريد عند تفاعله مع ملح الديازونيوم المحضر. وقد تم اختيار العوامل التي ظهر لها أعلى تأثير في التفاعل وهي حجم محلول (0.005 مولاري) ملح الديازونيوم المحضر ( $x_1$ ) وحجم محلول (1 مولاري) هيدروكسيد الصوديوم ( $x_2$ ) و تأثير زمن تفاعل الاقتران بعد اضافة القاعدة ( $x_3$ ) والتي يمكن من خلالها ايجاد الشفرة الخاصة بكل قيمة والمتمثل (1, 0, -1) والمبينة في جدول (2).

$$x_1 = (X_1 - 1.4) / 0.6$$

$$x_2 = (X_2 - 0.6) / 0.5$$

$$x_3 = (X_3 - 10) / 10$$

يبين الجدول (3) القيم الحقيقية للعوامل قيد الدراسة والمراد ايجاد قيمتها الفضلى والمقترحة بالاعتماد على موديل تصميم التراكيم المركزي مع قيم الاستجابة (قيمة الامتصاصية) المقاسة عمليا. وقد استعملت معادلة مفكوك الدرجة الثانية نوع خطي - تربيعي ذات التأثيرات الرئيسية (Linear-quadratic second-order polynomial main effects) للتعبير عن قيمة الامتصاص كدالة للمتغيرات الثلاثة. يبين التحليل الإحصائي للنتائج أن هذا الطراز (الموديل) من تصميم التجربة المستعمل كان ملائما فقد أظهرت العلاقة بين قيم المتغيرات قيد الدراسة مع قيم الامتصاصية المقاسة انطباقا جيدا، لذلك أمكن حساب قيمة المتغيرات الثلاثة التي تعطي أعلى قيمة للاستجابة (الامتصاص) بطريقة رياضية. أظهرت النتائج أن قيمة حجم محلول حامض الانثرانك المؤزوت = 3 مليلتر وقيمة محلول هيدروكسيد الصوديوم = 1 مليلتر، وأما قيمة الزمن اللازم للاقتران المحسوب فكان 8 دقيقة. ويمكن اعتبار هذه القيم ظروفًا فضليات لتقدير عيار تتراسايكلين هيدروكلوريد عند تفاعله مع ملح الديازونيوم لحامض الانثرانك. يبين الشكل (4) طراز سطح الاستجابة لهذا النظام بين كل متغيرين قيد الدراسة مع الاستجابة (الامتصاصية) وتثبيت المتغير الأخر عند قيمته الفضلى في كل حالة.

### دراسة استقرارية صبغة الأزو المتكونة

تم دراسة استقرارية صبغة الأزو المتكونة من خلال قياس قيمة امتصاصية المحلول بعد التخفيف في فترات زمنية مختلفة، إذ تم اضافة 1.2 مليلتر من ملح الديازونيوم الى قنبينة حجمية سعة 10 مليلتر تحتوي على 1 مليلتر من محلول عيار تتراسايكلين هيدروكلوريد بتركيز 100 ميكروغرام/مليلتر مع الرج ثم اضيف اليه 0.4 مليلتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم 1مولاري، بعدها يضاف 0.6 مليلتر من محلول حامض الهيدروكلوريك المركز 5 مولاري ويكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر ويقاس الامتصاص مقابل المحلول الصوري عند الطول الموجي 419 نانوميتر، بعد فترات زمنية مختلفة تراوحت من (0-24) ساعة. وقد لوحظ من النتائج التي تم الحصول عليها ان المعقد مستقر حيث وجد ان قيمة امتصاصية المحلول المقاسة بلغت 93.5% من قيمتها الاصلية بعد ترك الناتج لمدة 24 ساعة في مكان مظلم وفي درجة حرارة الغرفة (الجدول 4).

### اطياف الامتصاص النهائية

تم تسجيل طيف امتصاص المعقد المتكون من اقتران 10 ميكروغرام.مليلتر<sup>-1</sup> من تتراسايكلين هيدروكلوريد مع ملح الديازونيوم عند الظروف الفضلى التي تم الحصول عليها بأسلوبين مختلفين، مقابل المحلول الصوري. وأظهرت الاطياف المسجلة ان اعلى قيمة للامتصاصية كانت في كلا الحالتين عند الطول الموجي 419 نانوميتر. يبين الشكل (5) اطياف الامتصاص لصبغة الأزو المتكونة ولمحاليها الصورية.

### منحنيات المعايرة والمعالجة الإحصائية

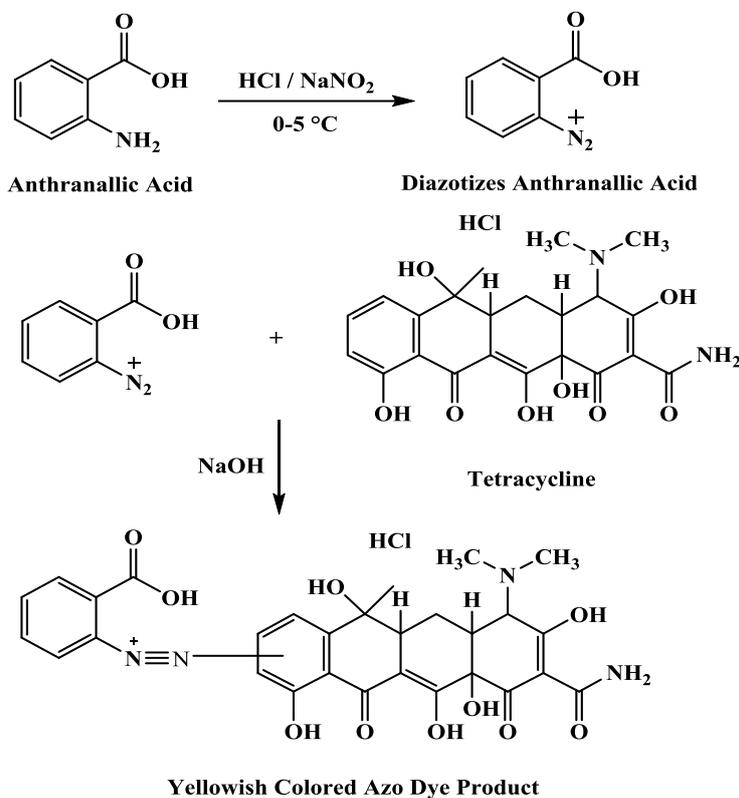
تم بناء منحنيات معايرة بتطبيق الظروف الفضلى لاسلوب المتغير الأحادي والمتغيرات المتعددة (الشكل 6) A و B على التوالي. وقد اظهر كلا المنحنيين ان النظام اللوني الناتج من تفاعل الاقتران يخضع لقانون بير في مديات من التراكيز تراوحت بين (0.5-50 ميكروغرام/مليلتر) و (0.5-60 ميكروغرام/مليلتر) عند تطبيق الظروف الفضلى لاسلوبين المذكورين على التوالي. ويبين الجدول 5 بعض الخصائص التحليلية للطريقة المقترحة لتقدير عيار تتراسايكلين هيدروكلوريد .

### حساب الدقة والضبط للطريقة المقترحة

لغرض حساب دقة وتوافقية الطريقة تم قياس ثلاثة تراكيز مختلفة (5, 10, 30) ميكروغرام.مليلتر<sup>-1</sup> من محلول تتراسايكلين هيدروكلوريد ولثلاثة تكرارات لكل منها وذلك بتطبيق الطريقة المقترحة تحت مجموعة الظروف التجريبية التي تم الوصول اليها بأسلوب المتغير الأحادي والمتغيرات المتعددة. أظهرت النتائج المبينة في الجدول 6 انه أمكن الحصول على نتائج دقيقة ومضبوطة في كلا الحالتين. إذ تراوحت قيم النسبة المئوية للخطأ النسبي (0.2800-0.0011-) و (0.4630-0.9200) وقيم النسبة المئوية للانحراف القياسي النسبي (0.170-0.420) و (0.327-1.040) عند تطبيق الطريقة تحت الظروف المستحصلة بأسلوب المتغير الأحادي والمتغيرات المتعددة على التوالي.

## دراسة صبغة المعقد المتكون

لتعيين النسبة التي يقترن بها عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد مع ملح حامض الانثرانلك المؤزوت لتكوين صبغة الازو، تمت دراسة التكافؤية لصبغة الازو المحضرة باستعمال محاليل متساوية التركيز ( $5.1986 \times 10^{-4} M$ ) لكل من العقار والكاشف المؤزوت وبالاعتماد على طريقتي النسبة المولية والمتغيرات المستمرة (الشكل 7). اثبتت النتائج التي تم الحصول عليها بالطريقتين المذكورتين اعلاه ان نسبة العقار الى الكاشف المؤزوت هي (1:1). مخطط (2) يوضح الميكانيكية المقترحة للفاعل مع الصيغة المقترحة لصبغة الازو المتكونة.



### مخطط (2)

## دراسة تأثير المتداخلات

تم دراسة تأثير عدد من المتداخلات المتعارف وجودها في المستحضرات الصيدلانية، وقد دلت النتائج على امكانية تطبيق الطريقة بوجود 1000 ميكروغرام.مليتر<sup>-1</sup> من تلك المتداخلات دون حدوث اي تأثير يذكر. جدول (7) يوضح النتائج التي تم التوصل اليها.

## تقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد في المستحضرات الصيدلانية

تم بحث امكانية تقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد في بعض المستحضرات الصيدلانية المتوفرة في الاسواق المحلية ولشركتين مختلفتين بأعتماد طريقة العمل المعتمدة بحسب الظروف الفضلى التي تم الوصول اليها بنمط تصميم التراكم المركزي (طريقة المتغيرات المتعددة). اظهرت النتائج امكانية تطبيق الطريقة بنجاح لتقدير العقار اعلاه في تلك المستحضرات وبدون تأثير يذكر من المتداخلات المتواجدة في تلك المستحضرات. جدول (8) يبين النتائج المستحصلة وقيم الدقة والضبط اضافة الى اختبار (t-test) وعند مستوى ثقة 95%.

## المصادر

1. Budavari, S. (2001) The Merck index, New Jersey, Merck Company, Inc.
2. Talaro, K., and Talaro, A., 1996. Foundations in Microbiology, 2nd. ed. WCB publishers, Dubuque, IA. 366.
3. Alwan, A.A.S., and Abou, Y.Z. (1990) Iraqi Drug Guide, National Board for the Selective of Drugs and Central Drug Information Burean, Baghdad, 45,112-113, 210,219,221,230
4. British Pharmacopeia (2012) CD-ROM, Majesty's Stationary office, London , BP, Co.-UK.
5. Connell, S. R.; Tracz, D. M.; Nierhaus, K. H. and Taylor, D. E. (2003) Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance, Antimicrob Agents Chemother, 47(12):3675-3681.
6. Shalaby, A.; Abou-Raya, S.; Wafaa, H. and Mehaya, F. (2011) Validation HPLC method for determination of tetracycline residue in chicken meat and liver. Food Chem., 124(4):1660-1666.
7. William, A., M. and Raida, H.(1995) Rapid HPLC Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk, J. Agric. Food Chem., 43 (4), 931-934
8. Kazo, I.; Norio, O. and Mitsuru, Y. (1992) Determination of tetracycline antibiotics by reversed phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatog. A, 623(1):153-158.
9. Innocenzo, G. and Fabio, P. (2009) Determination of tetracycline residues by liquid chromatography coupled with electrochemical detection and solid phase extraction. J. Agric. Food Chem., 57(19):8735-8741.
10. Parviz, N.; Reza, M. and Parandis, D. (2007) FFT-Adsorptive voltammetric technique for pico-level determination of tetracycline in capsules at a micro electrode in flowing solutions. Turk. J. Chem., 31(3):279-291.
11. Saisunee, L.; Boonson L.; Surasat W. and Wirt R. (2006) Flow injection spectrophotometric determination of tetracycline in a pharmaceutical preparation by complexation with aluminium III. Anal.Sci.22(1),15-19.
12. Jose, L.; Patricia, L.; Helena, R. and Pezza, L. (2009) Flow injection spectrophotometric determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramines-T as oxidizing agent. Quim Nova, 32(7):1764-1769.
13. Prinya, M.; Saisunee, L. and Suphachock, U. (2008) Spectrophotometric flow-injection analysis assay of tetracycline antibiotics using a dual light-emitting diode based detector, Mj.Int.J.Sci.Tech., 2(1):201-209.
14. Ronald, B. (2006). Determining trace levels of tetracycline in solid and liquid samples utilizing complexation with transition metal cation. Anal.Chem.3(4-6):114-123
15. Ayad, M.; El-Sadik, M. and Mostaffa, S. (1986) 4-Aminoantipyrine as an analytical reagent for the colorimetric determination of tetracycline and oxytetracycline. Anal.Lett., 19(21-22):2169-2181.
16. Al-Abbasi, K. (2009). Spectrophotometric determination of tetracycline by azo dye formation with diazotized p-nitroaniline-application to pharmaceutical preparation and biological fluids. J.Raf.Sci., 20(1):61-74.
17. Khairi, F. (2008). Analysis of tetracycline and oxytetracycline through charge transfer complexation, Amer.J.,3(3):212-218.

18. Yongnian, Ni.; Deng, Na. and Serge, K. (2010) Simple Kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of tetracycline by use of chemometrics". *Anal.Methods*, 2(9):1302-1309.
19. Hemn, A. Q. (2007) Batch and flow-injection spectrophotometric determination of nitrite in curing meat and nitrate in wastewater samples. M.Sc. Thesis. Department of Chemistry, College of Education, Salah Al-din University, Erbil, Iraq:44.
20. Palaniyappan, M.; Vijayagopal, V.; Renuka V. and Viruthagiri, T. (2009) Statistical Optimization of Substrate, Carbon and Nitrogen Source by Response Surface Methodology for Pectinase Production Using *Aspergillus fumigatus* MTCC 870 in Submerged Fermentation, *African Journal of Biotechnology* 8 (22):6355-6363.
21. Narongchai, S.; Putipong, B. and Bandhita, P.(2006) Central Composite Design in Optimization of the Factors of Automatic Flux Cored Arc Welding for Steel ST37, *Proceeding of the 2 nd ed IMT-GT Regional Conference on Mathematics, Statistics and Applications Universiti Sains Malaysia, Penang*:13-15.

جدول (1) تأثير تسلسل الاضافة على امتصاص 10 ميكروغرام.مليتر<sup>-1</sup> من محلول تتراسايكلين هيدروكلوريد باستخدام 1.2 ملليتر من 0.005 مولاري من ملح الديازونيوم.

Order of mixing			Absorbance
1	2	3	
Drug	Salt	Base	0.3241
Drug	Base	Salt	0.2828
Salt	Base	Drug	0.1673

جدول (2) مدى القيم المشفرة وغير المشفرة للمتغيرات المستخدمة.

Independent variable	Coded unit		
	-1	0	1
Volume of salt (mL)	0.8	1.4	2.0
Volume of NaOH (mL)	0.1	0.6	1.1
Time (min.)	0.0	10.0	20.0

جدول (3) تصميم التراكم المركزي لتقدير 10 ميكروغرام. ملليتر<sup>-1</sup> من محلول تتراسايكلين هيدروكلوريد باستخدام 0.005 مولاري من ملح الديازونيوم و1 مولاري من هيدروكسيد الصوديوم.

Standard Run	Volume of salt (mL)	Volume of NaOH (mL)	Time (mint)	A
1	1.4	1.1	10	0.3067
2	2.0	0.1	0	0.0545
3	2.0	1.1	20	0.2343
4	2.0	0.1	20	0.0375
5	1.4	0.6	10	0.2728
6	1.4	0.6	10	0.2728
7	1.4	0.6	10	0.2728
8	1.4	0.6	10	0.2728
9	1.4	0.6	20	0.2001
10	0.8	0.6	10	0.2775
11	0.8	0.1	0	0.2905
12	1.4	0.6	10	0.2728
13	0.8	1.1	20	0.1952
14	1.4	0.1	10	0.1942
15	1.4	0.6	0	0.2525
16	2.0	1.1	0	0.2345
17	0.8	1.1	0	0.2606
18	1.4	0.6	10	0.2728
19	0.8	0.1	20	0.1603
20	2.0	0.6	10	0.3104

جدول (4) تأثير الزمن على امتصاص 10 ميكروغرام. ملليتر<sup>-1</sup> من محلول تتراسايكلين هيدروكلوريد باستخدام 1.2 ملليتر من 0.005 مولاري من ملح الديازونيوم.

Time/(hour)	Absorbance
0.0	0.3241
0.5	0.3241
1.0	0.3240
1.5	0.3238
3.0	0.3237
6.0	0.3235
8.0	0.3199
24.0	0.3030

جدول (5) بعض الخصائص التحليلية للطريقة المعتمدة لتقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد عند الظروف القياسية التي تم الوصول اليها بأسلوب المتغير الاحادي والمتغيرات المتعددة (تصميم التراكم المركزي).

Parameter	Value	
	Univariate	Multivariate
$\lambda_{\max}$ (nm)	419	419
Color	Yellow	Yellow
Linearity range ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0.5 – 50.0	0.5 – 60
Molar absorptivity ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )	16350	14619
Regression equation	$A = 0.0340[\text{Tet. } \mu\text{g.mL}^{-1}] - 0.0161$	$A = 0.0304[\text{Tet. } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0.0427$
Calibration Sensitivity ( $\text{L.mg}^{-1}$ )	0.0340	0.0304
Sandal's Sensitivity ( $\mu\text{g.cm}^{-2}$ )	0.0294	0.0329
Correlation of Linearity ( $R^2$ )	0.9996	0.9998
Correlation coefficient (R)	0.9998	0.9999
Detection limit ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0.2781	0.2813

جدول (6) دقة وضبط الطريقة المعتمدة لتقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد عند الظروف القياسية.

Method	Tetracycline hydrochloride Conc. ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		Relative Error %	S. D.	R.S.D.* %
	Taken	Found			
Univariate	5	5.014	0.280	0.021	0.419
	10	9.989	-0.110	0.017	0.170
	30	30.282	0.940	0.125	0.413
Multivariate	5	5.046	0.920	0.052	1.031
	30	30.139	0.463	0.098	0.325
	50	50.272	0.544	0.202	0.402

\* Average of three determinations.

جدول (7) تأثير وجود 1000 ميكروغرام ملليتر<sup>-1</sup> من المتداخلات الدوائية في تقدير 10 ميكروغرام ملليتر<sup>-1</sup> من عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد بطريقة تصميم التراكم المركزي (طريقة المتغيرات المتعددة).

Excipients	Tetracycline hydrochloride Conc. Taken $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Conc. Found $\mu\text{g.mL}^{-1}$	% Recovery
glucose	10.391	103.91
Sucrose	10.370	103.70
Lactose	10.106	101.06
Starch	9.958	99.58
sodium Citrate	10.454	104.54

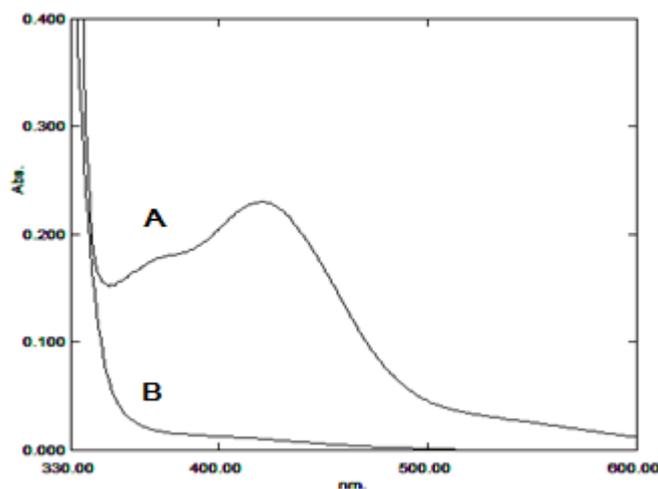
\*Average of three determinations.

جدول (8) تقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد في بعض المستحضرات الصيدلانية حسب طريقة العمل المقترحة في تصميم التراكم المركزي (طريقة المتغيرات المتعددة).

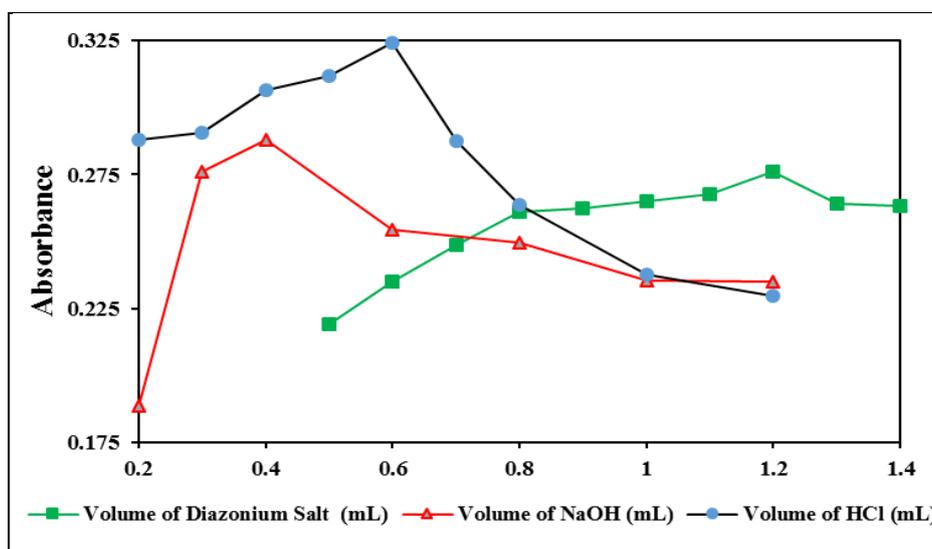
Sample	Labeled amount mg	Found amount mg	Conc. taken $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Conc.* found $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Reco. %	S.D*	R.S.D* %	t-test**
SAMACYCLINE (Tetracycline HCl) 250 mg/ Capsule SDI/Iraq	250	248.80	10	9.9521	99.521	0.1758	1.7665	0.1202
		246.71	30	29.6053	98.684	0.5823	1.9669	1.1742
APCYCLINE (Tetracycline HCl) 250 mg/ Capsule Ajanta/India	250	246.49	10	9.8596	98.596	0.1709	1.7333	1.4224
		251.13	30	30.1580	100.530	0.5587	1.8526	0.4908

\* Average of three determinations.

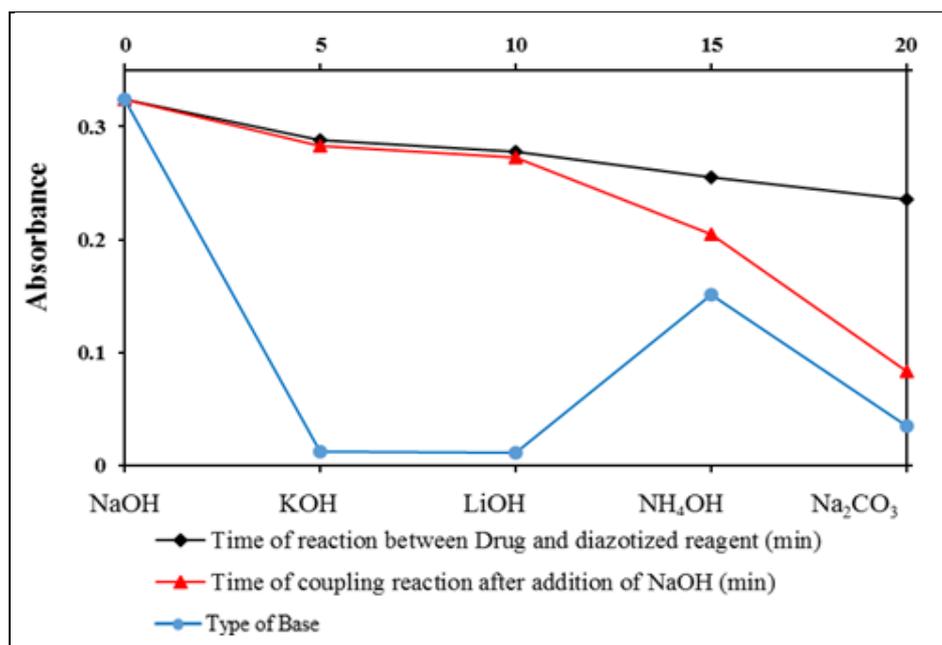
\*\* Theoretical value for t-test at 95% confidence limit were N=2 is 4.303.



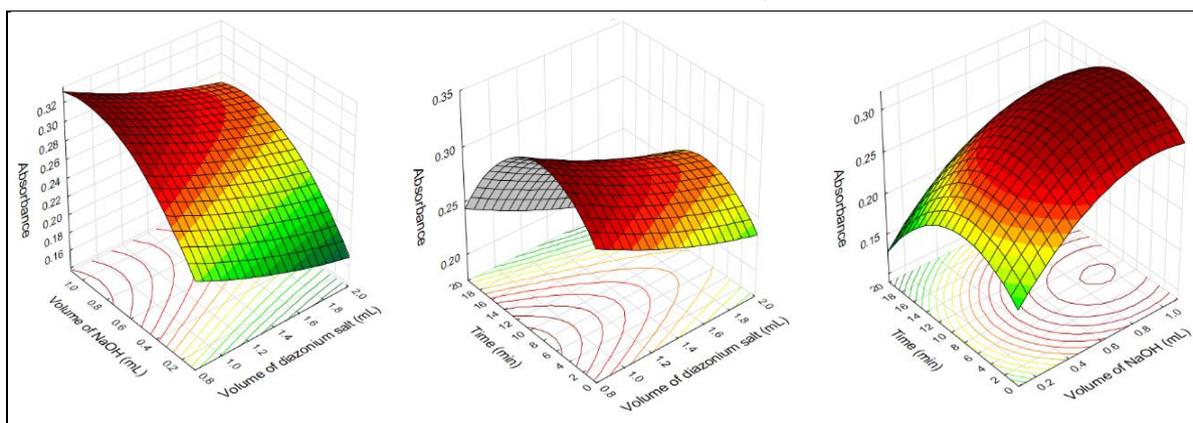
شكل (1) اطيف الامتصاص الاولية لكل من A: صبغة الازو المتكونة من اقتران (10 ميكروغرام.مليتر<sup>-1</sup> من تتراسايكلين هيدروكلويد- حامض الانثرانك الموزوت) مقابل المحلول الصوري، B: المحلول الصوري مقابل الماء المقطر، عند الظروف التمهيدية.



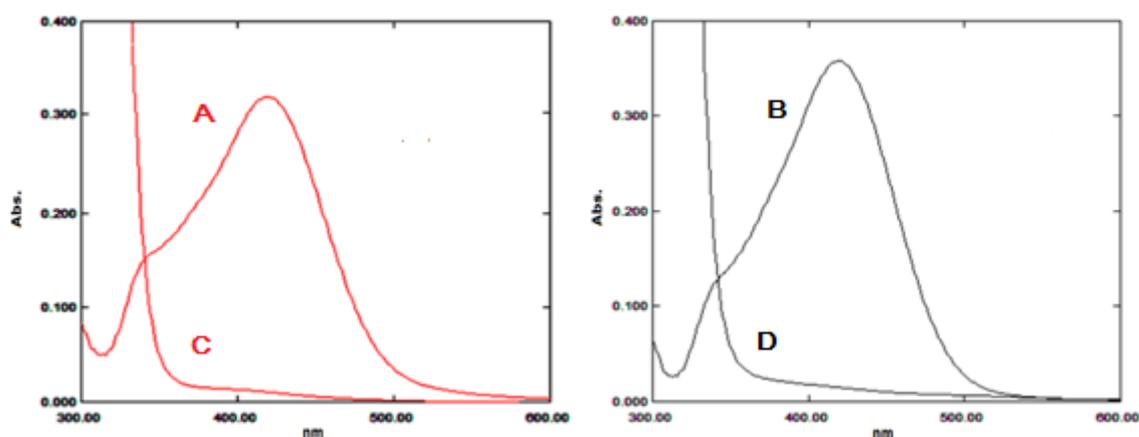
شكل (2) تأثير حجوم محاليل ملح الديازونيوم وهيدروكسيد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك على امتصاص 10 ميكروغرام.مليتر<sup>-1</sup> من عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد تحت الظروف التجريبية.



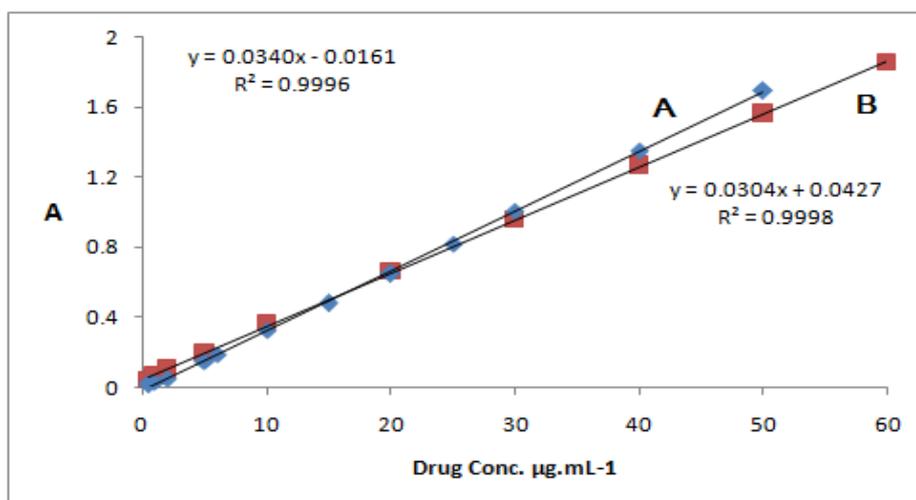
شكل (3) تأثير زمن تفاعل العقار مع الكاشف المؤزوت وزمن تفاعل الازدواج وتأثير استعمال انواع مختلفة من الاوساط القاعدية على امتصاص 10 ميكروغرام، ملليتر<sup>-1</sup> من محلول تتراسايكلين هيدروكلوريد تحت الظروف التجريبية.



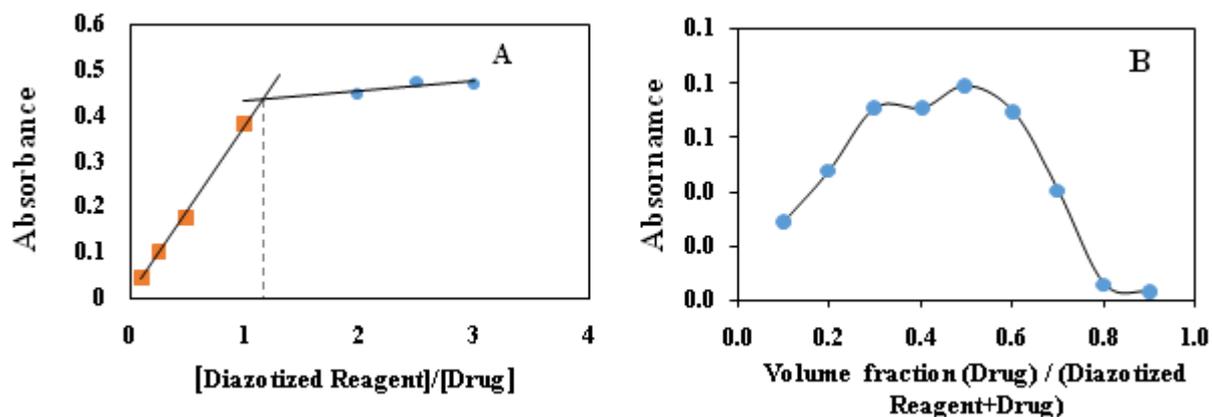
شكل (4) الرسوم البيانية لسطح الاستجابة لامتناس ناتج التفاعل بين عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد وحامض الاثرانك المؤزوت كدالة لكل متغيرين قيد الدراسة (عند ثبوت الثالث عند قيمته الفضلى).



شكل (5) اطيف الامتناس النهائية لصبغة الازو المتكونة من اقتران (10 ميكروغرام، ملليتر<sup>-1</sup> من تتراسايكلين هيدروكلويد- حامض الاثرانك المؤزوت) مقابل المحلول الصوري عند الظروف الفضلى التي تم الوصول اليها بأسلوب: (A) المتغير الأحادي، (B) المتغيرات المتعددة، واطيف امتصاص المحلول الصوري مقابل الماء المقطر عند الظروف الفضلى اعلاه على التوالي (D,C).



شكل (6) المنحنيات القياسية لتقدير عقار تتراسايكلين هيدروكلوريد حسب طريقة العمل المعتمدة عند الظروف الفضلى التي تم التوصل إليها بأسلوب: (A) المتغير الأحادي، (B) المتغيرات المتعددة.



شكل (7) ايجاد تكافؤية المقعد المتكون بطريقة (A- النسبة المولية B- المتغيرات المستمرة) باستعمال  $5.1986 \times 10^{-4}$  مولاري من تتراسايكلين هيدروكلوريد و  $5.1986 \times 10^{-4}$  مولاري من الكاشف (ملح الديازونيوم المحضر)



# Spectrophotometric Determination of Tetracycline Hydrochloride in Pure Form and Pharmaceutical Preparation by Coupling with Diazotized Anthranilic Acid

Maryam Muhson Abd  
Sarmad Bahjat Dikran  
Ali Khalil Mahmood

Dept. of Chemistry/ College of Education for Pure Science (Ibn- Al Haitham)/  
University of Baghdad

Received in:8/May/2016,Accepted in:5/June/2016

## Abstract

A simple, fast and sensitive spectrophotometric method has been applied for the determination of tetracycline hydrochloride in its pure form and in pharmaceutical preparations. The method based on coupling reaction of the antibiotic with diazotized anthranilic acid to form a stable yellow azo dye which shows a maximum absorption at 419 nm. Uni- and multivariate approaches were followed in optimizing the experimental conditions. Under optimum experimental conditions obtained via multivariate (Central Composite Design), the linearity of the constructed calibration curve was in the range of 0.5-60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  with molar absorptivity of  $14619 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  and the value of detection limit was  $0.2813 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . The capability of the method for the analysis of real tetracycline samples was evaluated. The results show that the method could successfully be applied with no significant interference from the common excipients.

**Keyword:** Spectrophotometry, Tetracycline Hydrochloride, Azo, Uni and Multivariate.