

## Indirect Spectrophotometric Determination of Atenolol, Isoniazid and Pyridoxine Hydrochloride Using N-bromosuccinimide and Neutral Red Dye

Masara N. Khalil

Zeena Z. Al Abdali

University of Mosul / College of Education for Pure Science/ Department of Chemistry

### Article Information

### Abstract

#### Article history:

Received: July 26.2023

Reviewer: September 5.2023

Accepted: September 11.2023

**Keywords:** spectrophotometric determination, atenolol, isoniazid, pyridoxine hydrochloride, neutral red dye, N-bromosuccinimide, oxidation and reduction.

#### Correspondence:

A simple and sensitive indirect spectrophotometric method was developed for the determination of atenolol, isoniazid and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical preparations, the method depending on the oxidation of the studied drugs with an excess of N-bromosuccinimide in hydrochloric acid medium and the remaining instead left amount of oxidizing agent reacted with fixed amount of neutral red and bleaching its color of the dye neutral red which absorbs at 530 nm. Calibration graphs were linear over 0.3-13, 0.2-10, and 0.3-17.5 µg/ml, with a molar of absorptivity  $1.98 \times 10^4$ ,  $1.88 \times 10^4$ , and  $1.62 \times 10^4$  l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> for each of Atenolol, isoniazid, and pyridoxine hydrochloride, respectively. The average recovery was ranged between 99.89 and 100.45%, and RSD is less than 1.3%. The method was successfully applied for the determination of studied drugs in pharmaceutical preparations. The results were in a good agreement with the certified values, standard addition procedure and official of British Pharmacopoeia. It was found that the experimental values of t and F-test less than the tabulated values at 95% confidence level,

## التقدير الطيفي غير المباشر للاتينولول و الايزونايزايد و البايريديوكسين هيدروكلوريد باستعمال N-بروموسكسينميد والصبغة الحمراء المتعادلة

مسرة نكتل خليل  
زينة زهير العبدلي  
جامعة الموصل/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم الكيمياء

### الخلاصة

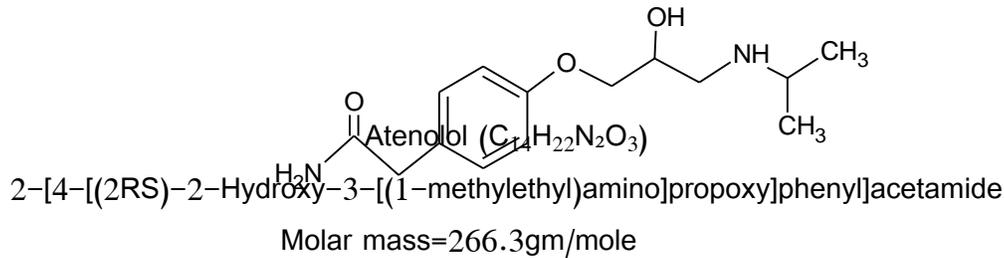
تم تطوير طريقة طيفية غير مباشرة يسيرة وحساسة لتقدير الاتينولول والايزونايزايد والبايريديوكسين هيدروكلوريد، اعتماداً على مبدأ اكسنتها بزيادة محسوبة من محلول N-بروموسكسينميد في وسط حامض الهيدروكلوريك ثم مفاعلة المتبقي من العامل المؤكسد مع كمية ثابتة من الصبغة الحمراء المتعادلة وقصر لونها وقياس شدة امتصاص المتبقي من الصبغة عند الطول الموجي 530 نانوميتر. وجد ان المنحنيات القياسية خطية ضمن مدى التراكيز 0.3-13 و 0.2-10 و 0.3-17.5 مايكروغرام/ملتر بامتصاصية مولارية  $10 \times 1.98$  و  $10 \times 1.88$  و  $10 \times 1.62$  لتر.مول<sup>-1</sup>. سم<sup>-1</sup> لكل من الاتينولول والايزونايزايد والبايريديوكسين هيدروكلوريد على التوالي. كانت الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين إذ تراوح معدل نسب الاسترجاع بين 99.89% و 100.45% وانحراف قياسي نسبي أقل من 1.3%. تم تطبيق الطريقة المطورة بنجاح في تقدير المركبات الدوائية المدروسة وكانت النتائج متوافقة على نحو جيد مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية ومع طريقة الاضافة القياسية والطريقة القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني اذ كانت قيم t و F اقل من القيم الجدولية عند مستوى ثقة 95%.

الكلمات المفتاحية: تقدير طيفي, الاتينولول , الايزونايزايد , البايريديوكسين هيدروكلوريد, الصبغة الحمراء المتعادلة, N-بروموسكسينميد, اكسدة واختزال.

### المقدمة

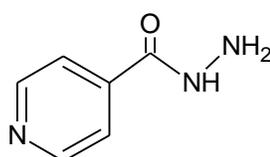
### الاتينولول Atenolol

يعتبر الاتينولول احد الحاصرات الانتقائية لمستقبلات بيتا 1 (B<sub>1</sub>) الادرينالية (Gruetter, 2007) يستعمل في علاج ارتفاع ضغط الدم والذبحة الصدرية واحتشاء عضلة القلب وعدم انتظام ضربات القلب (Tomiya and Yamashina, 2014) ، كما يستعمل في الوقاية من الصداع النصفي قبل بدء النوبة الفعلية (Silberstein, 2015) ، وحديثاً تم استعماله في علاج اعراض القلق النفسي (Armstrong and Kopolowicz, 2020) ، وعلاج الاورام الوعائية عند الاطفال (Seebauer, et al.,2022). يمتلك الاتينولول التركيب الكيميائي التالي (British pharmacopoeia,2013):



### الايزونايزايد Isoniazid

يعد الايزونايزايد اول مضاد حيوي بكتيري استخدم في علاج مرض السل (tuberculosis) والية عمله تستند على تثبيط تخليق حامض المايكوليك Mycolic acid الذي يعد احد اهم مكونات جدار خلية جرثومة السل مما يؤدي الى تثبيط نموها (Vilcheze and Jacobs, 2019) عند تناول هذا العقار فانه يصل الى جميع اعضاء الجسم وجميع السوائل الحيوية من ضمنها السائل الشوكي ، وان لهذه الخاصية اهمية في علاج التهاب السحايا الناتج عن مرض السل (Pazdernik,et al., 2003). يمتلك الايزونايزايد التركيب الكيميائي التالي (British pharmacopoeia, 2013) :

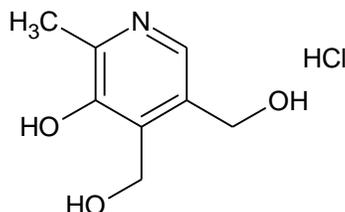


Isoniazid (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O) Pyridine-4-carbohydrazide

Molar mass=137.1gm/mole

### البايريدوكسين هيدروكلوريد Pyridoxine.HCl

يدعى البايريدوكسين هيدروكلوريد بفيتامين B<sub>6</sub> وهو ضروري في العديد من المسارات الكيموحيوية والتي تشمل الجهاز العصبي وخلايا الدم الحمراء والجهاز المناعي واستقلاب البروتين (Ueland,et al.,2015) ، لذلك يستعمل في علاج فقر الدم (Camaschella,2008) وبعض حالات الصرع عند الاطفال (Karnebeek,et al.,2012)، كما يستعمل في ايقاف القيء لدى النساء الحوامل (Hu,et al.,2022) ، يمتلك البايريدوكسين هيدروكلوريد التركيب الكيميائي التالي (British pharmacopoeia,2013) :



Pyridoxine hydrochloride (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.HCl)

(5-Hydroxy-6-methylpyridine-3,4-diol)dimethanol hydrochloride

Molar mass=205.6 gm/mole

وصفت طرائق تحليلية مختلفة لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة والتطبيق على المستحضرات الصيدلانية، وفي ما يلي مراجعة مختصرة لبعض من هذه الطرائق:

اذ امكن تقدير الاتينولول طيفياً وذلك بأكسده بواسطه برمنغنات البوتاسيوم في وسط قاعدي (Vaikosen, et al., 2020). كما قدر باستعمال نظام التفاعل N-بروموسكسينيميد عاملاً مؤكسداً وصبغة المثل الاحمر في وسط حامضي (Zakaria, et al., 2021). او من خلال تكوين معقد التجمع الايوني بين المركب الدوائي وصبغة بروموكريسول الارجواني (Jassim and Khaleel, 2022). ونشرت طريقة للتقدير بالاعتماد على تطبيق تفاعل زرقة بروسيا في الوسط حامضي (Mhemeed, 2021). كما استعملت مطيافية المشتقة في التقدير الحساس للمركب الدوائي (Omer, et al., 2022). فضلاً عن تقديره بطريقة غير مباشرة بالاعتماد على تأثيره التثبيطي لتألق جسيمات الذهب النانوية (AuNPs) (Bakir, et al., 2018) كما طبقت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC لتقدير الاتينولول المقترن بمكشاف تفلوري (Yilmaz, 2023) وفولتامترياً باستعمال قطب عجينة الكربون المحور والمغلف بانسجة الموز (Broli, et al., 2022).

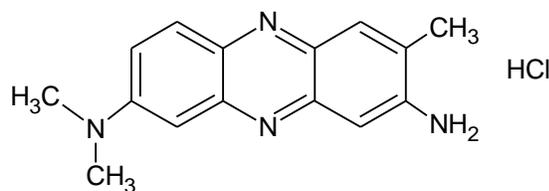
وقدرت كميات مايكروغرامية من الايزونايزيد طيفياً وذلك بمفاعله اما مع بيرويدات البوتاسيوم وكاشف 4,2-ثنائي نيتروفييل هيدرازين في الوسط القاعدي (Nayif and Mohammed, 2023). أو اكسده ب Fe III لتكوين Fe II والذي يتفاعل بدوره مع الكاشف 2,2-ثنائي البريديين لتكوين معقد ملون (Tu and Wen, 2021). بتفاعله مع ملح الدايزونيوم المقابل لكاشف 4-نيتروانيلين لتكوين ناتج ملون يستخلص بخلات الاثيل (Adegoke, et al., 2019). كما قدر الايزونايزيد بطريقة تحليل المعادلات انياً (Sudarman and Haris, 2023) او بتطبيق طريقة الاضافة القياسية-النقطة المشتركة بالتفاعل مع الكاشف الكروموجيني 2,1-نفثوكوينون سلفونات (NQS) في وسط كربونات الصوديوم بوجود عامل الشد السطحي CTAB لتكوين معقدات شيف الملونة (Theia'a and Habeb, 2018). وقدر بطريقة غير مباشرة اعتماداً على اخماد شدة تفلور نقاط الكربون المشبعة بالكبريت والنتروجين (S,N-CDs) (Azizi, et al., 2022). أو باستعمال تقنية HPLC - عكوسة الطور والمقترنة بمطيافية التفلور (Demirkaya Miloglu, et al., 2023) او باستعمال تقنية فولتامتري النبضي التفاضلي وفولتامتري الحلقي (Sharafi and Sadeghi, 2023).

ووصفت طرائق طيفية لتقدير البايريديوكسين هيدروكلوريد بالاعتماد على تفاعلات الازوتة والاقتران باستعمال كاشف ميتوكلوبراميد هيدروكلوريد في وسط قاعدي (Abdul-Aleem, et al., 2020). أو من خلال اكسده بزيادة محسوبة من N-بروموسكسينيميد والكمية الفائضة منه تؤكسد صبغة الاريوكروم بلاك-

T (Altaee and Al-Hammoodi, 2023) كما قدر في خليط ثنائي المكون باستعمال طريقة الاضافة القياسية-النقطة المشتركة (HPSAM) (Kamel and Abdoon, 2022). كما قدر بقياس معقد التجمع الايوني الناتج من تفاعله مع Cu (II) و صبغة الكرومازول الاسود Chlorazol black بوجود عامل الشد السطحي SDS (Khudhair, et al., 2019). أو من خلال تفاعله مع الكاشف ٩-كلورواكريدين (Shehab and Al-Sabha, 2020). كما تم تقدير البايريدوكسين هيدروكلوريد باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC المرتبطة بمكشاف قياس الكثافة (Zandarek, et al., 2023). أو باستعمال تقنية فولتامتري النبضي التفاضلي وذلك بأكسدته على قطب انتقائي من كرافيت قلم الرصاص (Antherjanam and Saraswathamma, 2023).

### الصبغة الحمراء المتعادلة وتطبيقاتها التحليلية

الصبغة الحمراء المتعادلة (Neutral Red) أو تسمى تولويلين الحمراء (Toluylene red) وهي صبغة فينازين كاتيونية مصنعة قابلة للذوبان في الماء والكحول حضرت لأول مرة قبل Witt عام 1879 (Beckmanna, et al., 2018) تعمل كمؤشر للأس الهيدروجيني ، إذ تعطي لون احمر عند الدالة الحامضية الاقل من 6.8 ولوناً اصفر عند الدالة الحامضية الاعلى من 8 (Winfried and Wolfgang, 1975) وهي صبغة تفلورية تعتمد شدة تفلورها على الاس الهيدروجيني لمحاليلها (Ericson, et al., 2021). استعملت في تلوين الانسجة الحيوية منذ عام 1921 اذ انها تعمل على تلوين الجسيمات المحللة (Lysosomes) في الخلية الحية نتيجة لذلك تم استعمالها في الاستدلال على تسمم وموت الخلايا الحية من خلال التناقص في اللون الاحمر والذي يتوافق مع فقدان حيوية الخلايا (Repetto, et al., 2008). تمتلك الصبغة الحمراء المتعادلة التركيب الكيميائي التالي (Ericson, et al., 2021).



Neutral Red

3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride

Molar mass=288.78 gm/mole

استعملت الصبغة الحمراء المتعادلة في التقدير الطيفي لعدد من المركبات المهمة ومنها تقدير الحامض النووي الرايبوزي RNA (Niu, et al., 2008) والمبيد الحشري (methyl parathion) في

انواع مختلفة من الخضراوات ومياه الصرف الصحي (Tiwari,et al., 2013) و الفاموتدين في مستحضراته الصيدلانية (Zenita and Basavaiah, 2011) والهايڤروكسيل امين (Danilina and Buskina, 2017) بالاضافة الى التقدير الفلورومتري للتايروسين في الاقراص الدوائية ومصل الدم (Attia,et al., 2012). كما استعملت الصبغة في تقدير ايونات النترات والنتريت وثاني اوكسيد النتروجين في الهواء والنتريت في الماء والتربة وبعض المستحضرات مثل معجون الاسنان (Gayathri and Balasubramanian, 1999).

### الجزء العملي

#### الاجهزة المستعملة:

تمت القياسات الطيفية بواسطة جهاز المطياف ذي الشعاع المزدوج نوع UV +T92 Spectrophotometer PG instrument باستخدام خلايا الكوارتز ذات مسار ضوئي مقداره اسم، وأجري الوزن باستعمال ميزان حساس نوع KERN ABS-Germany. وتمت عمليات الاذابة باستعمال جهاز Ultrasonic Cleaner للرج بالموجات فوق الصوتية نوع Power Sonic 405 مجهز من شركة Tech-Korea واجريت عمليات التسخين باستعمال حمام مائي نوع BS-11 من شركة Lab Companion-Korea.

#### محاليل المواد الكيميائية المستعملة

كانت المواد الكيميائية والكواشف المستعملة جميعها على درجة عالية من النقاوة

#### محلول الاتينولول ( 80 مايكروغرام /ملتر)

يحضر المحلول بتركيز 100 مايكروغرام/ملتر بإذابة 0.01 غرام من المركب الدوائي بصيغته النقية في 2 ملتر من الايثانول ثم ينقل الى قنينة حجمية سعة 100 ملتر ويكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة ومنه يحضر محلول بتركيز 80 مايكروغرام /ملتر.

#### محلول الايزونايزايد ( 50 مايكروغرام /ملتر)

يحضر المحلول بتركيز 50 مايكروغرام/ملتر بإذابة 0.01غرام من المركب الدوائي بصيغته النقية في 200 ملتر من الماء المقطر.

#### محلول البايريدوكسين هيدروكلوريد ( 80 مايكروغرام /ملتر)

يحضر المحلول بتركيز 100 مايكروغرام/ملتر بإذابة 0.01غرام من المركب الدوائي في 100 ملتر ماء مقطر ومنه يحضر محلول بتركيز 80 مايكروغرام/ملتر .

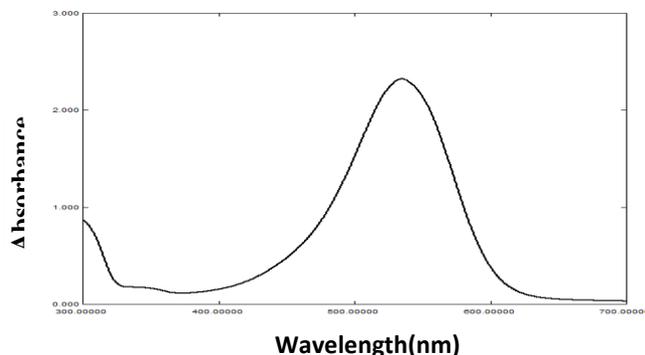
محاليل العوامل المؤكسدة N-بروموسكسينميد و N-كلورو سكسينميد والكلورامين-T ( 200 مايكروغرام /ملتر) تحضر جميعها بتركيز 200 مايكروغرام/ملتر وذلك بإذابة 0.02 غرام من كل مركب في 100 ملتر من الماء المقطر، وتبقى هذه المحاليل مستقرة لمدة اسبوع.

محلول برومات- بروميد ( 50 مايكروغرام /ملتر):يحضر أولاً محلول مزيج من برومات البوتاسيوم (0.002 مولاري) وبروميد البوتاسيوم (0.02 مولاري) وذلك بإذابة 0.0334 و 0.2380 غرام من المركبين اعلاه على التوالي في 100 ملتر من الماء المقطر للحصول على محلول البرومات بتركيز 334 مايكروغرام/ملتر ومنه يحضر محلول بتركيز 50 مايكروغرام/ملتر ويبقى مستقراً لمدة اسبوع واحد .  
محلول صبغة الحمراء المتعادلة ( 100 مايكروغرام /ملتر):حضر المحلول بتركيز 100 مايكروغرام/ملتر بأذابة 0.01 غرام من الصبغة في 100 ملتر ماء مقطر ولضمان الاذابة التامة للصبغة وضعت القنينة الحجمية في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة ٥ دقائق ويحفظ المحلول في قنينة معتمة بالثلاجة ويبقى المحلول مستقراً لأكثر من اسبوع .

محلول حامض الهيدروكلوريك (1.0 مولاري):يحضر محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1.0 مولاري بتخفيف 8.8 ملتر من الحامض المركز بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 ملتر .

#### الدراسة التمهيدية وطيف امتصاص الصبغة الحمراء المتعادلة

بغية تطوير طريقة طيفية يسيرة وحساسة لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة اجريت تجارب اولية لبيان امكانية استخدام الصبغة الحمراء المتعادلة في التقدير الطيفي غير المباشر لهذه المركبات فقد تمت اولاً دراسة طيف امتصاص محلول الصبغة الحمراء المتعادلة في وسط حامض الهيدروكلوريك عند اطوال موجية بين 300 و 700 نانوميتر فوجد ان الصبغة تعطي اقصى امتصاص عند 530 نانوميتر مقابل المحلول الصوري وكما موضح في الشكل(1).



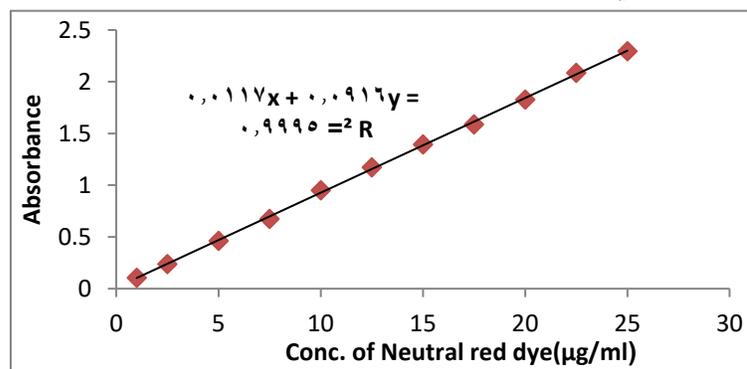
الشكل (1) طيف امتصاص الصبغة الحمراء المتعادلة في وسط حامض الهيدروكلوريك مقابل محلولها الصوري

ثانياً وجد تجريبياً حدوث تفاعل اكسدة للصبغة الحمراء المتعادلة بواسطة كمية مايكروغرامية من محلول العامل المؤكسد  $N-BrO_3$  بروموسكسينيميد في وسط حامض الهيدروكلوريك إذ انخفضت امتصاصية الصبغة كميّاً بزيادة تركيز العامل المؤكسد وذلك من خلال قصر لونها وبالاعتماد على هذه الخاصية درست امكانية التقدير الطيفي غير المباشر للمركبات الدوائية (الاتينولول و الايزونايزايد و البايريديوكسين هيدروكلوريد)، إذ تمت اكسدة كميات مايكروغرامية من هذه المركبات في قنّانٍ حجمية سعة 10 ملتر مع كمية محسوبة من  $N-BrO_3$  بروموسكسينيميد في وسط حامض الهيدروكلوريك وتركت لمدة 10 دقائق مع الرج بدرجة حرارة الغرفة ثم أضيفت كمية ثابتة من الصبغة الحمراء المتعادلة واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة. فقد اشارت النتائج العملية الى حدوث زيادة خطية في طيف امتصاص الصبغة عند 530 نانوميتر بزيادة تركيز المركب الدوائي وهذا يشير الى امكانية استعمال الصبغة الحمراء المتعادلة في تقدير المركبات الدوائية.

### ضبط الظروف المثلى

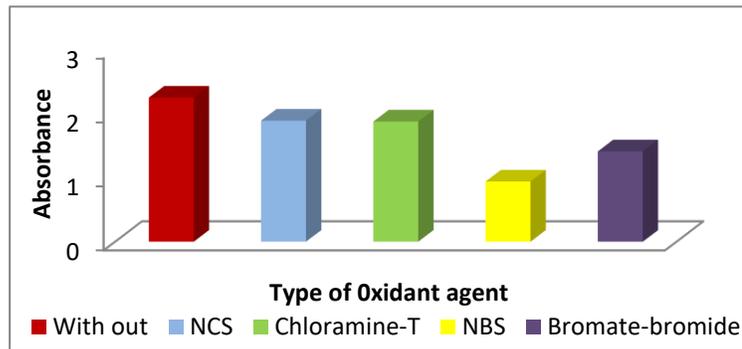
#### دراسة كمية الصبغة الحمراء المتعادلة

لتحديد الكمية المثلى من الصبغة الحمراء المتعادلة التي يمكن استخدامها في تقدير المركبات الدوائية المدروسة أُضيفت حجوم متزايدة (ملترات) من محلول الصبغة بتركيز 100 مايكروغرام/ملتر الى قنّانٍ حجمية سعة 10 ملتر تحتوي على 1.0 ملتر من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1.0 مولاري واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة وقيست شدة الامتصاص عند الطول الموجي 530 نانوميتر فوجد من النتائج المبينة في الشكل (2) أن مدى التركيز الخطي للصبغة الحمراء المتعادلة هو 1.0-25 مايكروغرام/ملتر وعليه ثبت التركيز 25 مايكروغرام/ملتر (2.5 ملتر من محلول تركيزه 100 مايكروغرام/ملتر) لاعتماده في الدراسات اللاحقة.

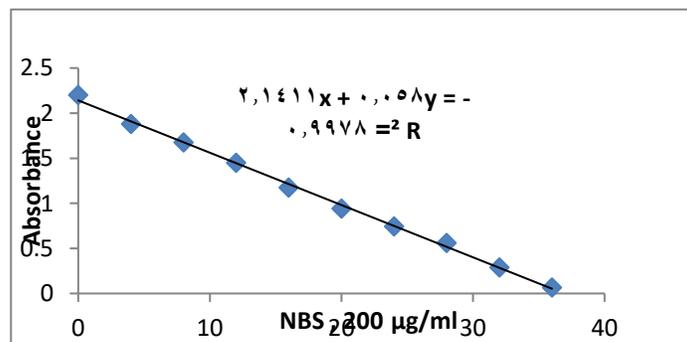


#### اختيار العامل المؤكسد لقصر الصبغة الحمراء المتعادلة

تمت دراسة تأثير عدد من العوامل المؤكسدة المذكورة في الشكل (3) والتي كانت بتركيز 200 مايكروغرام/ملتر لكل من N-بروموسكسينميد وN-كلوروسكسينميد والكلورامين-T وبتركيز ٥٠ مايكروغرام/ملتر من محلول برومات-بروميد ومحلول يودات-يوديد بحجم 1.0 ملتر كلاً على انفراد في اكسدة الصبغة الحمراء المتعادلة (25 مايكروغرام/ملتر) في وسط حامض الهيدروكلوريك ( 1.0 ملتر بتركيز 1.0 مولاري ) وقياس الامتصاص بعد 10 دقائق من التخفيف بالماء المقطر الى حد العلامة وادرجت النتائج في الشكل (3) والتي تبين ان العامل المؤكسد N-بروموسكسينميد كان الانسب في اكسدة الصبغة إذ اعطى اقل شدة امتصاص مقارنة ببقية العوامل المؤكسدة.



**تأثير كمية العامل المؤكسد N-بروموسكسينميد في قصر لون الصبغة الحمراء المتعادلة**  
 أجريت هذه الدراسة لتحديد الكمية المثلى من العامل المؤكسد N-بروموسكسينميد واللازمة لقصر لون الصبغة الحمراء المتعادلة (25 مايكروغرام/ملتر) وذلك بمفاعلتها مع حجوم متزايدة من العامل المؤكسد بتركيز 200 مايكروغرام/ملتر في وسط حامض الهيدروكلوريك (1.0 ملتر بتركيز 1.0 مولاري) وقياس شدة الامتصاص بعد 10 دقائق من التخفيف بالماء المقطر الى حد العلامة فوجد من النتائج المبينة في الشكل (4) أن الكمية المثلى من العامل المؤكسد واللازمة لقصر لون الصبغة هي 1.8 ملتر (36 مايكروغرام/ملتر) لذا اعتمدت هذه الكمية في الدراسات اللاحقة .



الشكل (4) اختيار كمية العامل المؤكسد المثلى.

## تأثير المذيبات

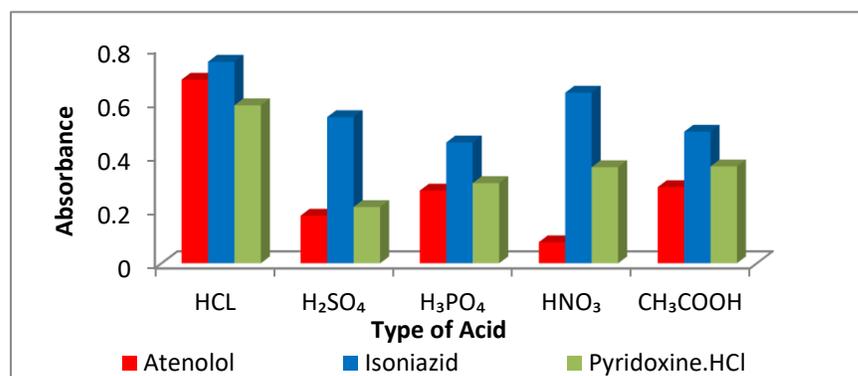
لأجل الوقوف على تأثير المذيبات على امتصاص الصبغة في تقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة تمت دراسة تأثير عدد من المذيبات عند تقدير 8 مايكروغرام/ملتر من البايريدوكسين هيدروكلوريد أنموذجاً وذلك بإكمال الحجم الى 10 ملتر بالمذيبات المختلفة وتم الاستدلال من النتائج المدونة في الجدول (1) التأثير السلبي للمذيبات العضوية في حساسية الطريقة إذ تم الحصول على محاليل معكرة عند التخفيف بـ DMSO او DMF او حدوث زيادة في قيمة امتصاصات محاليلها الصورية مقارنة مع استخدام الماء المقطر وعليه استبعدت من الدراسات اللاحقة واعتمد الماء المقطر مذيباً للصبغة ووسطاً مناسباً لتفاعل الاكسدة للمركبات الدوائية والصبغة.

الجدول (1) تأثير المذيبات في طيف الامتصاص لتقدير 8 مايكروغرام/ملتر من البايريدوكسين هيدروكلوريد.

Solvent	$\max\lambda$	Absorbance	Absorbance blank
DMSO		Turbid	
DMF		Turbid	
Ethanol	536	0.403	0.151
Methanol	553	0.636	0.271
Acetone	536	0.467	0.287
Water	530	0.599	0.059

## اختيار الحامض المناسب

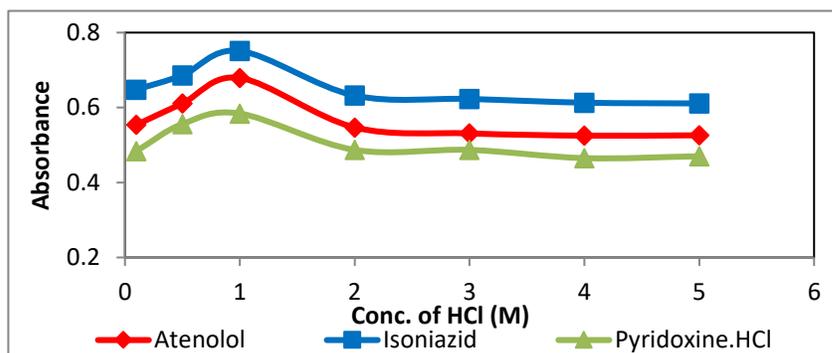
اثبتت النتائج العملية أن اكسدة الصبغة الحمراء المتعادلة والمركبات الدوائية المدروسة بواسطة N-بروموسكسينيميد تسري في الوسط الحامضي وفي درجة حرارة الغرفة, لذا تم دراسة تأثير حوامض مختلفة في التقدير والمبينة في الشكل (5) إذ اضيفت كميات ثابتة (1.0 ملتر بتركيز 1.0 مولاري) من الحوامض كلاً على انفراد الى قنّانٍ حجمية تحتوي على 8 مايكروغرام/ملتر من الاتينولول او البايريدوكسين هيدروكلوريد او 5 مايكروغرام/ملتر من الايزونايزيد بوجود الكمية المثلى من العامل المؤكسد ثم تركت المحاليل لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة لإتمام عملية الاكسدة ثم تضاف الكمية الثابتة من الصبغة الحمراء المتعادلة (25 مايكروغرام/ملتر) وقياس الامتصاصات بعد التخفيف بالماء المقطر عند الطول الموجي 530 نانوميتر. إذ تشير النتائج المبينة في الشكل (5) الى ان حامض الهيدروكلوريك هو الانسب لتفاعل اكسدة المركبات الدوائية المدروسة والصبغة وذلك للحصول على اعلى شدة امتصاص عند استعماله وسطاً للتفاعل ، وعليه اعتمد في الدراسات اللاحقة.



الشكل (5) اختيار الحامض المناسب وسطاً في تقدير المركبات الدوائية المدروسة

### تأثير كمية وتركيز حامض الهيدروكلوريك

بينت الدراسة في الشكل (6) والتي اجريت لنتيبت تركيز حامض الهيدروكلوريك بالاعتماد على اضافة 1.0 مللتر من الحامض ضمن مدى التراكيز (0.1- 5.0) مولاري ، ان التركيز 1.0 مولاري هو الانسب في تقدير جميع المركبات الدوائية قيد الدراسة.



شكل (6) تأثير تركيز حامض الهيدروكلوريك في تقدير المركبات الدوائية المدروسة

كما أُجريت دراسة لبيان تأثير حجوم متزايدة (0.5-2.5) مللتر من محلول حامض الهيدروكلوريك في حساسية الطريقة، إذ بينت النتائج التي تم الحصول عليها في الجدول (2) أن 1.0 مللتر من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1.0 مولاري هو الامثل عند تقدير المركبات الدوائية المدروسة.

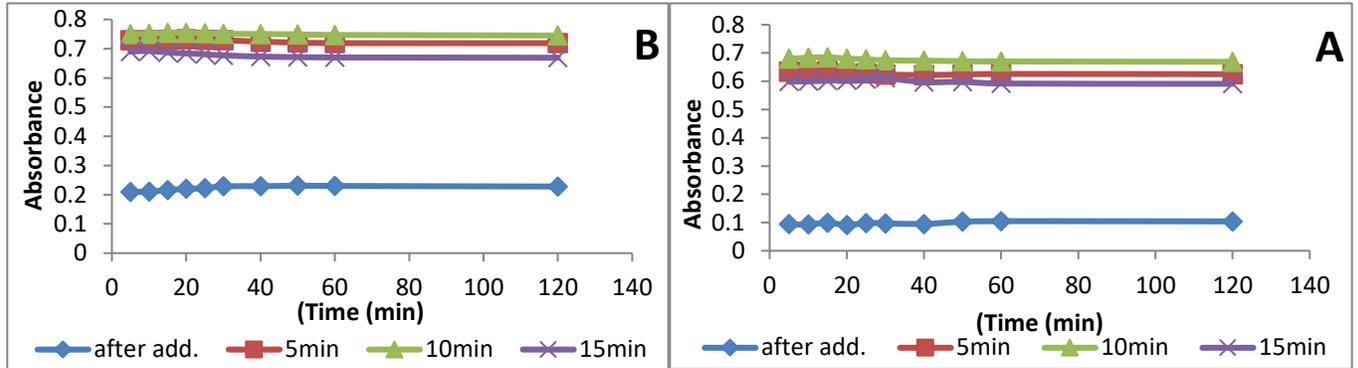
الجدول (2) تأثير حجم حامض الهيدروكلوريك M1 في تقدير المركبات الدوائية المدروسة.

Drug	Absorbance/Volume of Hydrochloric acid(ml)				
	0.5	1	1.5	2	2.5
Atenolol	0.602	0.683	0.588	0.543	0.519
Isoniazid	0.677	0.753	0.672	0.654	0.641
Pyridoxine.HCl	0.557	0.591	0.583	0.491	0.479

## تأثير الزمن في اكسدة المركبات الدوائية وصبغة الحمراء المتعادلة

لأجل تحديد الفترة الزمنية اللازمة لأكسدة المركبات الدوائية المدروسة والصبغة، تمت مفاعلة كميات مايكروغرامية من المركبات الدوائية مع الكمية المحسوبة من N-بروموسكسينيميد (1.8 مللتر) في وسط حامض الهيدروكلوريك بأزمنة مختلفة مع الرج وبعد اضافة الكمية الثابتة من الصبغة الحمراء المتعادلة (25 مايكروغرام /مللتر) والتخفيف بالماء المقطر الى حد العلامة تم دراسة زمن اكسدة الصبغة بالكمية المتبقية من العامل المؤكسد واستقراريتها عند درجة حرارة الغرفة ( $25 \pm 2$  م°)، وقد اظهرت النتائج في الجدول (3) والشكل (7) أن 10 دقائق مدة زمنية كافية لأكسدة كل من الاتينولول والايرونيازيد والبايريديوكسين هيدروكلوريد قبل اضافة الصبغة الحمراء المتعادلة و 5 دقائق لأكسدة الصبغة. الجدول (3) تأثير الزمن في أكسدة الباييريديوكسين هيدروكلوريد والصبغة الحمراء المتعادلة.

Standing time before adding Neutral Red & dilution(min)	Absorbance/standing time after adding Neutral Red & dilution(min)										
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	120	Over Night
After addition	0.112	0.119	0.120	0.123	0.125	0.130	0.132	0.133	0.128	0.124	0.120
5 min	0.572	0.570	0.569	0.569	0.570	0.567	0.564	0.561	0.560	0.559	0.550
10 min	0.583	0.584	0.585	0.584	0.584	0.583	0.583	0.581	0.581	0.578	0.573
15 min	0.570	0.574	0.571	0.569	0.564	0.563	0.561	0.560	0.558	0.556	0.551



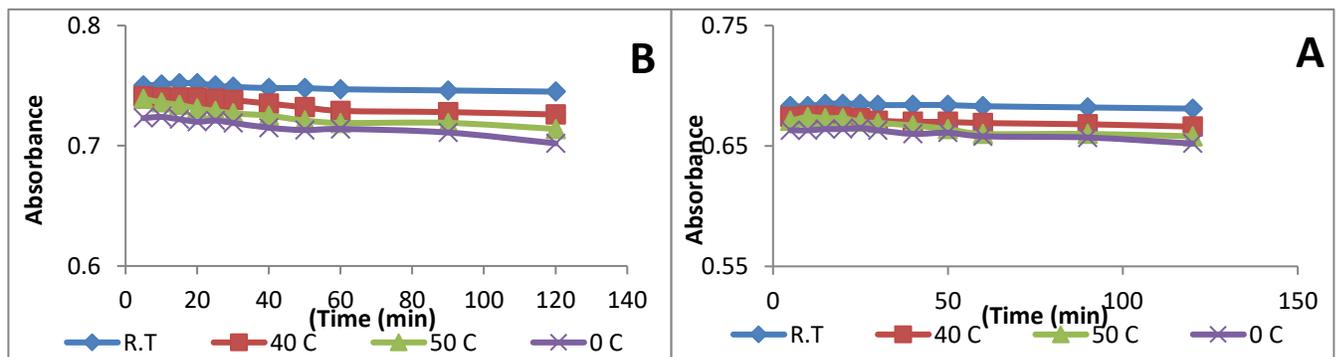
الشكل (7) تأثير الزمن في اكسدة المركبين الدوائيين (A: اتينولول و B: الايزونايزايد)

### تأثير درجة الحرارة في تفاعل الاكسدة واستقرارية الصبغة الحمراء المتعادلة

اجريت هذه الدراسة لبيان تأثير درجات حرارية مختلفة (0-50 م°) في تفاعل اكسدة المركبات الدوائية المدروسة بفترة زمنية مقدارها 10 دقائق وعلى استقرارية الصبغة بعد 5 دقائق من التخفيف الى حد العلامة وتحت الظروف المثلى المستحصل عليها في التجارب السابقة وظهرت النتائج المبينة في الجدول (4) و الشكل (8) أن درجة حرارة المختبر (25±2 م°) هي المثلى في التقدير إذ تم الحصول على اعلى شدة امتصاص بعد 5 دقائق من بدء التفاعل وباستقرارية لا تقل عن ساعتين لذا اعتمدت للاحقا.

الجدول (4) تأثير درجة الحرارة في استقرارية الصبغة الحمراء المتعادلة عند تقدير البايريدوكسين هيدروكلوريد (8 مايكروغرام/ملتر)

Temp. (C°)	Absorbance / min standing time										
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	90	120
R.T	0.583	0.584	0.585	0.584	0.584	0.583	0.583	0.581	0.581	0.580	0.578
40	0.580	0.581	0.582	0.581	0.579	0.576	0.574	0.573	0.57	0.57	0.552
50	0.582	0.58	0.576	0.573	0.569	0.565	0.56	0.558	0.55	0.548	0.54
0.0	0.578	0.575	0.571	0.568	0.565	0.563	0.563	0.561	0.556	0.547	0.546



B: الايزونايزايد (5 مايكروغرام/ملتر)

A: الاتينولول (8 مايكروغرام/ملتر)

## تأثير تسلسل الاضافة

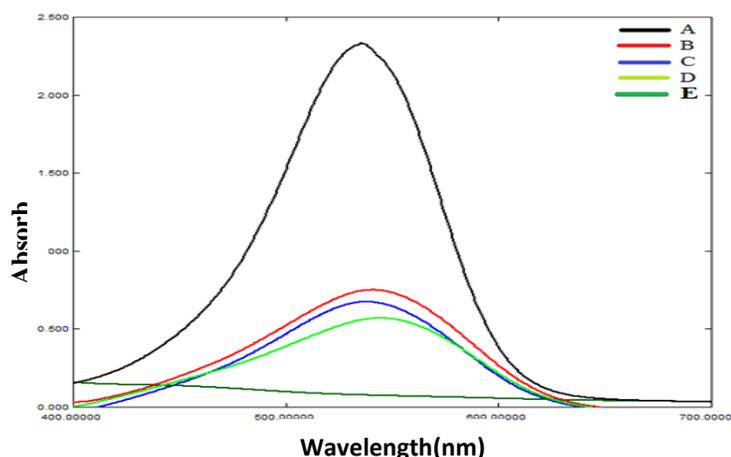
تشير النتائج المستحصلة في الجدول (5) ان التسلسل I المتبع في تثبيت الظروف المثلى للمركبات الدوائية ملائم في التقدير وأن حدوث اي تغير في هذا التسلسل يؤثر سلباً على شدة الامتصاص ويزيد من قيمة امتصاص المحلول الصوري. البايريدوكسين هيدروكلوريد (S)+حامض الهيدروكلوريك (A)+ العامل المؤكسد (NBS)+الصبغة الحمراء المتعادلة (NR)

الجدول (5) تأثير تسلسل الاضافة عند تقدير البايريدوكسين هيدروكلوريد بوصفه انموذجاً .

Order number	Reaction components	Absorbance	Absorbance blank
I	S+A+NBS+NR	0.598	0.063
II	A+NBS+S+NR	0.487	0.098
III	NBS+A+S+NR	0.574	0.187
VI	NBS+NR+S+A	0.523	0.099

## أطياف الامتصاص النهائي

يبين الشكل (9) أطياف الامتصاص النهائية للصبغة الحمراء المتعادلة بوجود كميات مايكروغرامية من المركبات الدوائية المدروسة والعامل المؤكسد N-بروموسكسينميد و بعد تثبيت الظروف المثلى للتفاعل إذ أعطت الصبغة أقصى امتصاص عند الطول الموجي 530 نانوميتر في حين أن المحلول الصوري لا يعطى طيفاً في منطقة طيف الصبغة.

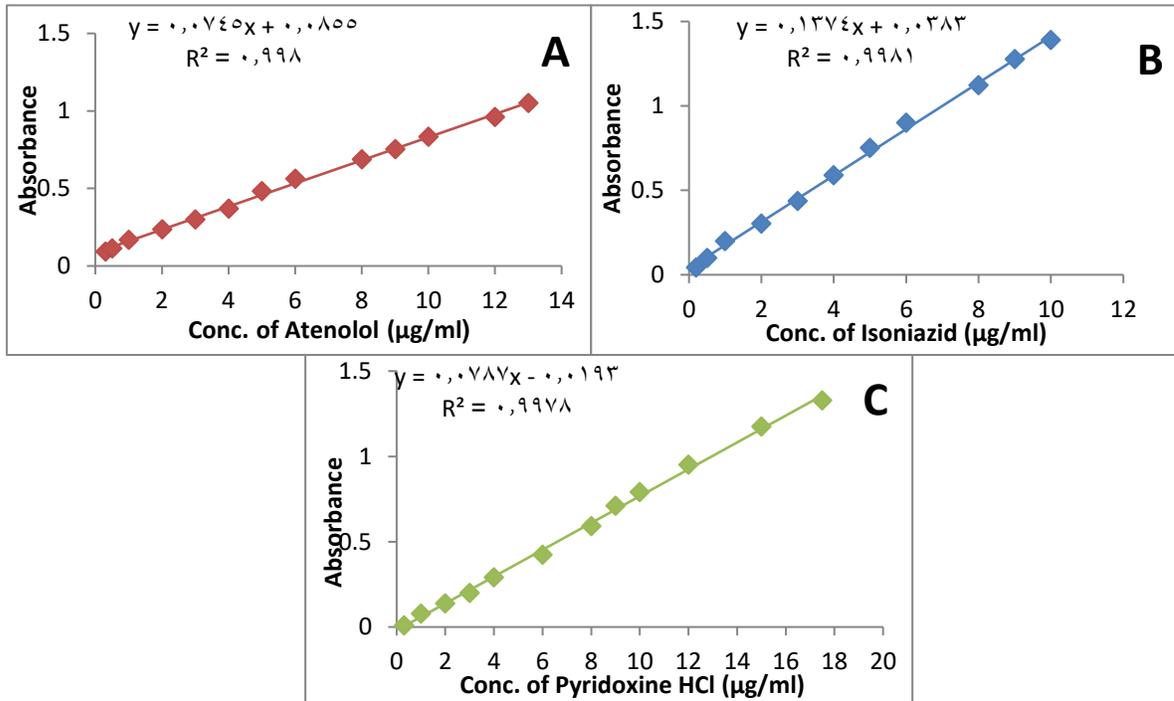


الشكل (9) أطياف الامتصاص. (A) الصبغة الحمراء المتعادلة (25 مايكروغرام/ملتر) في وسط حامض الهيدروكلوريك (B) بوجود 5 مايكروغرام/ملتر الايزونايزايد و N-بروموسكسينميد. (C) بوجود 8 مايكروغرام/ملتر الاتينولول و N-بروموسكسينميد. (D) بوجود 8 مايكروغرام/ملتر البايريدوكسين هيدروكلوريد و N-بروموسكسينميد (E) المحلول الصوري.

**طريقة العمل والمنحنيات القياسية لتقدير الاتينولول والايزونايزايد والبايريدوكسين هيدروكلوريد**  
باتباع الظروف المثلى لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة تم تحضير المنحنيات القياسية وفق  
الآتي :

أضيفت الى مجموعة من القناني الحجمية سعة 10 ملتر حجوم متزايدة (ملترات) من محاليل المركبات  
الدوائية المدروسة بتركيز 80 مايكروغرام/ملتر للاتينولول او البايريدوكسين هيدروكلوريد و50  
مايكروغرام/ملتر للايزونايزايد لتغطية مدى التراكيز الموضحة في الجدول (6) والكمية المثلى من  
حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1 مولاري يليها إضافة 1.8 ملتر من N-بروموسكسيناميد (200  
مايكروغرام/ملتر)، وتركت المحاليل لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة المختبر تبعها إضافة محلول الصبغة  
الحمراء المتعادلة (25 مايكروغرام/ملتر) واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة وقيست امتصاصات  
المحاليل عند الطول الموجي 530 نانوميتر مقابل محاليلها الصورية بعد 5 دقائق.

ومن خلال رسم الامتصاصات مقابل التركيز تم الحصول على المنحنيات القياسية الموضحة في  
الشكل (10) والتي تشير الى أن الطريقة تتبع قانون بير ضمن المديات الخطية الموضحة في الجدول (6)  
للمركبات الدوائية المدروسة وأن هناك انحرافاً سلبياً عن قانون بير بعد الحدود العليا التقديرية.



الشكل (10) المنحنيات القياسية للمركبات الدوائية المدروسة.  
A: الاتينولول B: الايزونايزايد C: البايريدوكسين هيدروكلوريد.

احتسبت قيم حد الكشف (LOD) وحد التقدير الكمي (LOQ) (Valcarcel, 2000) , بقياس شدة امتصاص عشرة مكررات للمحلول الصوري وبتطبيق العلاقتين الآتيتين:

$$LOQ = \frac{10\sigma B}{S} \quad \text{و} \quad LOD = \frac{3\sigma B}{S}$$

$\sigma B$ : الانحراف القياسي النسبي لامتصاص المحلول الصوري. S: ميل المنحني القياسي.

ويبين الجدول (6) القيم التحليلية والاحصائية و الامتصاصية المولارية و دلالة ساندل وحدود الكشف والتقدير الكمي للمركبات الدوائية وقد بينت القيم المستحصلة والمبينة في الجدول أن الطريقة المقترحة ذات حساسية عالية في تقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة.

الجدول (6) القيم التحليلية للمعالجات الاحصائية للمنحنيات القياسية وحدي الكشف والتقدير الكمي في تقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة.

Parameter	Atenolol	Isoniazid	Pyridoxine.HCL
Linearity range ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.3 -13	0.2-10	0.3-17.5
Intercept	0.0855	0.0383	-0.0193
Slope	0.0745	0.1374	0.0787
Determination Coefficient ( $R^2$ )	0.998	0.9981	0.9978
Standard deviation of intercept	0.007164	0.011036	0.010666
Standard deviation of slope	0.001014	0.001996	0.001176
Molar absorptivity ( $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )	$1.98 \times 10^4$	$1.88 \times 10^4$	$1.62 \times 10^4$
Sandell' s Sensitivity ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	13.45	7.29	12.69
LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.089	0.048	0.084
LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.296	0.160	0.280

## دقة وتوافقية الطريقة

فحصت دقة الطريقة وتوافقها وذلك باحتساب نسبة الاسترجاع والانحراف القياسي النسبي (RSD) باستعمال خمس مكررات لثلاث تراكيز مختلفة لكل مركب دوائي، وتشير النتائج الموضحة في الجدول (7) أن الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين.

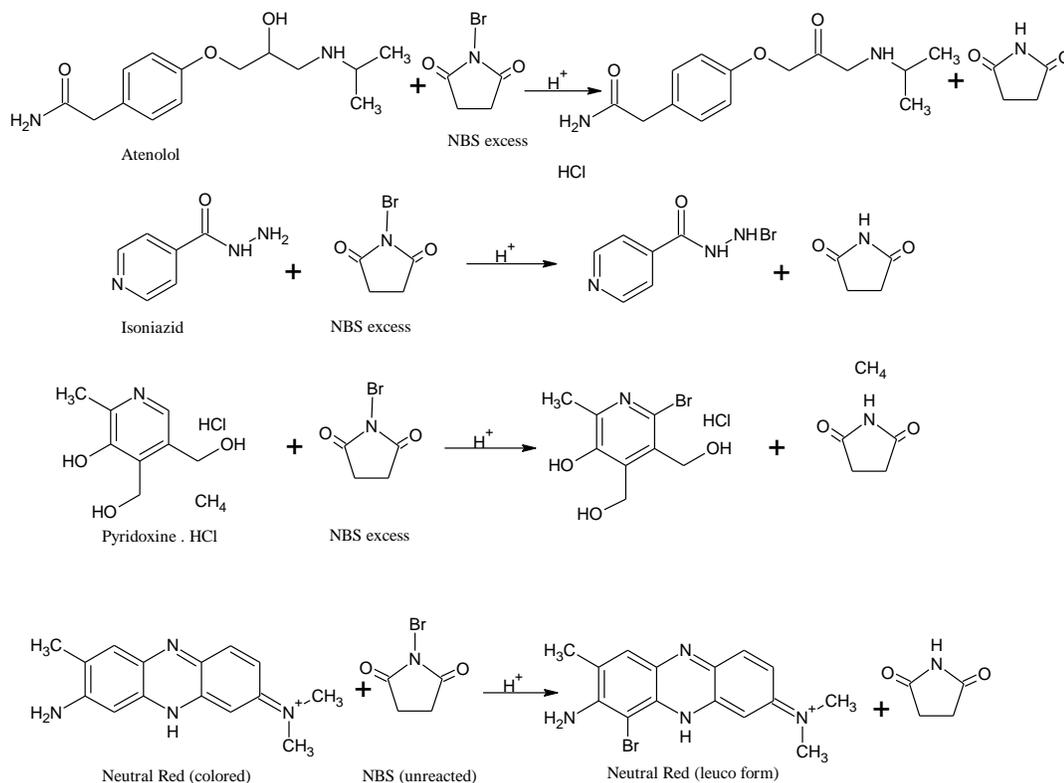
الجدول (7) دقة وتوافق الطريقة لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة.

Drug	Conc. of drug ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
Atenolol	5	101.50	100.45	0.948
	8	100.24		0.343
	10	99.60		0.572
Isoniazid	2	99.47	99.89	1.262
	5	100.07		0.471
	8	100.12		0.179
Pyridoxine.HCL	5	99.57	99.98	0.735
	8	100.77		0.755
	10	99.62		0.533

\*Average of five determinations

## التفاعل الكيميائي المقترح

اعتماداً على ميكانيكية التفاعلات في البحوث المنشورة فإن N- بروموسكسينيميد يعتبر عاملاً مؤكسداً وكاشف بروم في الوسط الحامضي للمركبات العضوية (Inam-ul-Haque, et al., 2007) (Zakaria, et al., 2021) و (Altaee and Al-Hammoodi, 2023) لذا افترض حدوث اكسدة للاتينولول وبرومة للايزونايزيد و البايريديوكسين هيدروكلوريد بواسطة الكمية المثلى من N-بروموسكسينيميد في وسط حامض الهيدروكلوريك وبعدها يتم إضافة الكمية المعلومة من الصبغة الحمراء المتعادلة والتي يتم اكسدها بواسطة المتبقي من العامل المؤكسد مؤدياً الى قصر لونها ويتم قياس المتبقي من الصبغة عند الطول الموجي 530 نانوميتر والذي يتناسب مع تركيز المركبات الدوائية قيد الدراسة (مخطط 1).



### مخطط (1) يوضح التفاعلات الكيميائية المقترحة

#### تطبيق الطريقة المطورة على المستحضرات الصيدلانية

تم تطبيق الطريقة المطورة لتقدير المركبات الدوائية الاتينولول والايزونايزايد والبايريديوكسين هيدروكلوريد في مستحضراتها الصيدلانية والتي كانت بشكل حقن واقراص والمصنعة من منشئ مختلفة كما مشار اليها في الجدول (8) والذي يبين دقة الطريقة المطورة واتفاقها على نحو جيد مع المحتوى الاصيل للمركبات الدوائية المدروسة في مستحضراتها الصيدلانية.

الجدول (8) المستحضرات الصيدلانية ومناشئها.

Pharmaceutical Preparation	Declared composition	Company
<b>Atenolol</b>		
<b>NOVATEN-100</b>	<b>Per tablet: 100mg Atenolol</b>	<b>Ajanta- India</b>
<b>TENORMIN</b>	<b>Per tablet: 50mg Atenolol</b>	<b>AstraZeneca UK Limited</b>
<b>Isoniazid</b>		
<b>Isoniazid Tablets IP Solonex</b>	<b>Per tablet: 300mg Isoniazid</b>	<b>Macleods-India</b>
<b>Pyridoxine.HCL</b>		
<b>VITA-6 Pyridoxine.HCl ampoules</b>	<b>Per ampoule: 100mg/2ml Pyridoxine.HCl</b>	<b>Pioneer-Co. Iraq</b>
<b>Vitasaf B<sub>6</sub>-50</b>	<b>Per tablet: 50mg Pyridoxine.HCL</b>	<b>SAFA-Co.Diala-Iraq</b>

### تحليل اقراص الاتينولول

تم وزن 5 أقراص بدقة من كل مستحضر دوائي للاتينولول ( يحتوي القرص على 50 ملغرام او 100 ملغرام) وبعد طحنها ومزجها جيداً وزن من المسحوق ما يكافئ 10 ملغرام، أذيب في بيكر مع 2 ملتر من الايثانول النقي واكمل بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 ملتر ثم وضعت القنينة في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة 5 دقائق لإتمام الاذابة ومن ثم رشح وحضر منه محلول بتركيز 80 مايكروغرام/ملتر ، ثم اخذ من هذا المحلول كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل المعتمدة وتم ايجاد تركيز الاتينولول في القرص الواحد باستخدام المنحنى القياسي للمركب الدوائي بصيغته النقية ودرجت النتائج في الجدول (9).

### تحليل أقراص الايزونايزيد

وزن بدقة محتوى 5 اقراص من المستحضر الدوائي للايزونايزيد (يحتوي القرص على 300 ملغرام) وبعد طحنها ومزجها جيداً وزن من المسحوق ما يكافئ 10 ملغرام أذيب بالماء المقطر واكمل

الحجم في قنينة حجمية سعة 100 مللتر ثم وضعت في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة 5 دقائق لاتمام الاذابة ثم رشح المحلول وحضر منه محلول بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر ، اخذ كميات مايكروغرامية مختلفة وعوملت على وفق طريقة العمل المعتمدة وتم ايجاد تركيز الايزونايزايد في القرص الواحد باستخدام المنحنى القياسي للمركب الدوائي بصيغته النقية ودرجت النتائج في الجدول (9).

#### تحليل حقن البايريدوكسين هيدروكلوريد

تحتوي الحقنة على 100 ملغرام / 2مللتر من البايريدوكسين هيدروكلوريد خففت الحقنة بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مللتر للحصول على محلول بتركيز 1000 مايكروغرام/مللتر ثم حضر منه محلول بتركيز 80 مايكروغرام/مللتر وأخذت كميات مايكروغرامية مختلفة من المحلول الاخير وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة . وتم ايجاد تركيز البايريدوكسين هيدروكلوريد في الحقنة باستخدام المنحنى القياسي للمركب الدوائي بصيغته النقية ودرجت النتائج في الجدول (9).

#### تحليل اقراص البايريدوكسين هيدروكلوريد

وزن بدقة محتوى 5 اقراص من المستحضر الدوائي لالبايريدوكسين هيدروكلوريد ( يحتوي القرص على 50 ملغرام) وبعد طحنها ومزجها جيداً وزن من المسحوق ما يكافئ 10 ملغرام أذيب بالماء المقطر ونقل الى قنينة حجمية سعة 100 مللتر واكمل بالماء المقطر الى حد العلامة ثم وضعت القنينة في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة 5 دقائق لاتمام الاذابة ومن ثم رشح وحضر منه محلول بتركيز 80 مايكروغرام /مللتر ثم اخذ كميات مايكروغرامية مختلفة وعوملت على وفق طريقة العمل المعتمدة وتم ايجاد تركيز البايريدوكسين هيدروكلوريد في القرص الواحد باستخدام المنحنى القياسي للمركب الدوائي بصيغته النقية ودرجت النتائج في الجدول (9).

الجدول (9) تقدير المركبات الدوائية المدروسة في مستحضراتها الصيدلانية بالطريقة المقترحة.

Drug	Pharmaceutical Preparation	Certified value	Amount Present (µg/ml)	Drug content found (mg)	Recovery (%)	Average recovery (%)
Atenolol	TENORMIN Atenolol tablets B.P 50mg	50	1	51.18	102.36	101.60
			2	51.72	103.44	
			5	50.52	101.04	
			8	49.70	99.41	
			12	50.89	101.78	
	NOVATEN-100 Atenolol	100	1	96.44	96.44	99.67
			2	102.15	102.15	
			5	99.58	99.58	
			8	99.70	99.70	
			10	100.52	100.52	
Isoniazid	Solonex	300	1	307.5	102.5	100.09
			2	294.89	98.29	
			5	298.41	99.47	
			8	302.43	100.81	
			10	298.27	99.42	
Pyridoxine. HCl	Vitasaf B <sub>6</sub> -50 mg	50	1	51.29	102.59	100.86
			2	51.85	103.70	
			5	50.27	100.55	
			8	48.38	96.76	
			12	50.36	100.72	
	VITA-6 Pyridoxine.HCL Ampoules	100	1	103.89	103.89	99.71
			2	96.29	96.29	
			5	96.92	96.92	
			8	101.70	101.70	
			12	99.79	99.79	

من النتائج المدرجة في الجدول (9) تبين أن الطريقة المطبقة في تقدير المركبات الدوائية المدروسة في مستحضراتها الصيدلانية كانت عالية الدقة ومنتجة بشكل جيد مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية لكل مركب دوائي.

## تقييم نتائج الطريقة المقترحة

لأثبات كفاءة الطريقة الطيفية المطورة وصلاحياتها في تقدير المركبات الدوائية المدروسة فقد طبقت الطريقة القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني على المستحضرات الصيدلانية لهذه المركبات والتي تتضمن طريقة التسحيح المجهادي القياسية على مستحضرات الاتينولول والبايريدوكسين هيدروكلوريد والطريقة التسحيحية على مستحضر الايزونايزايد (British pharmacopoeia,2013). ولمعرفة مدى دقة وصلاحيه التطبيق التحليلي للطريقة المقترحة اجريت مقارنة وتقييم احصائي بين الطريقتين باستعمال اختباري t و F (Ravisankar,et al.2015) ودرجت النتائج المستحصل عليها في الجدول (10).

الجدول (10) مقارنة دقة الطريقة المقترحة لتقدير المركبات الدوائية المدروسة في مستحضراته الصيدلانية مع الطريقة القياسية.

Pharmaceutical Preparation		Recovery (%)		T <sub>exp</sub>	F <sub>test</sub>
		Present method*	Standard method**		
Atenolol	TENORMIN Atenolol tablets	101.60	99.77	1.76	1.15
	NOVATEN-100 Atenolol	99.67	98.57	0.87	2.10
Isoniazid	Solonex	100.09	98.00	2.04	1.43
Pyridoxine .HCl	Vitasaf B <sub>6</sub> -50 mg	100.86	99.98	0.48	1.15
	VITA-6 Ampoules	99.71	99.36	0.16	1.03

\* Average of five determinations.

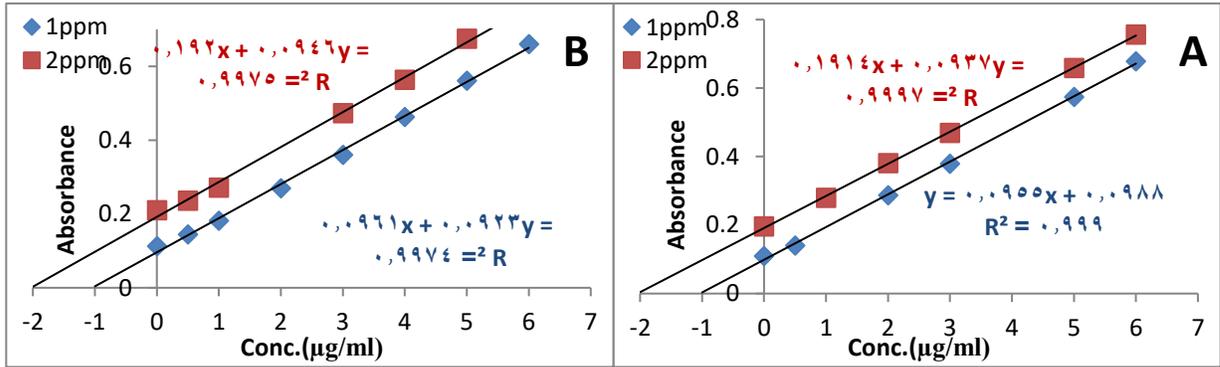
\*\* Average of three determinations.

ويمكن ملاحظة أن قيمة t التجريبية اقل من قيمة t الجدولية البالغة 2.44 عند مستوى ثقة 95% ولست درجات حرية وهذا يشير الى أن الطريقة المقترحة موثوق بها وذات صلاحية تطبيق جيدة على المستحضرات الصيدلانية للمركبات الدوائية المدروسة كما وجد أن قيمة F التجريبية أقل من قيمتها

الجدولية 6.94 عند مستوى ثقة 95% مما يدل على عدم وجود فرق واضح بين دقة الطريقتين القياسية والمقترحة وان الانحراف القياسي للطريقتين ناتج عن اخطاء عشوائية وبذلك تكون الطريقة المقترحة ذات مصداقية جيدة.

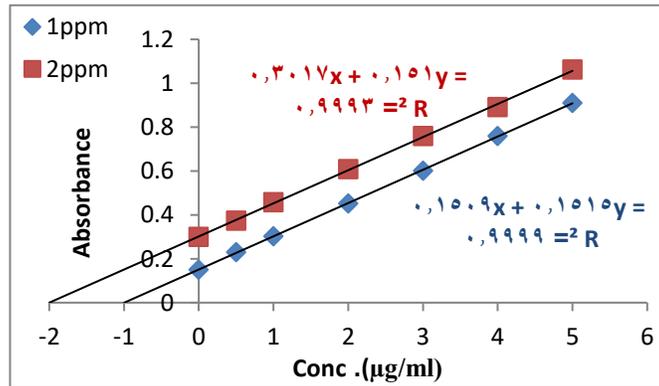
### تطبيق طريقة الاضافة القياسية

لأجل اثبات كفاءة الطريقة الطيفية المطورة ونجاحها في تقدير المركبات الدوائية وخلوها من تداخلات المضافات الدوائية في مستحضراتها الصيدلانية. تم تطبيق طريقة الاضافة القياسية على المستحضرات الصيدلانية لكل من الاتينولول والايروننايزايد والبايريديوكسين هيدروكلوريد. إذ يمكن الاستدلال من الشكل (11) والجدول (11) ان الطريقة المطورة خالية من تداخلات المواد المضافة وانها متفقة بشكل جيد مع طريقة الاضافة القياسية.

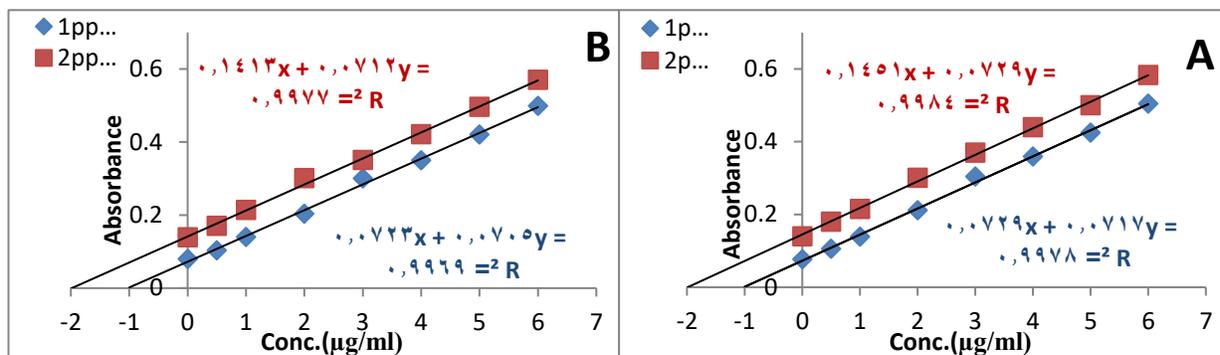


منحنيات الاضافة القياسية للاتينولول في مستحضراته الصيدلانية .

A: امريكي المنشأ B: هندي المنشأ



منحنيات الاضافة القياسية للايزونايزايد في مستحضراته الصيدلانية (هندي المنشأ)



منحنيات الاضافة القياسية للبايريدوكسين هيدروكلوريد في مستحضراته الصيدلانية.

Vitasaf B<sub>6</sub>-50mg:B

PIONEER ampoules:A

الشكل (11) منحنيات الاضافة القياسية للمركبات الدوائية المدروسة في مستحضراتها الصيدلانية

الجدول (11) طريقة الاضافة القياسية في تقدير المركبات الدوائية المدروسة .

Pharmaceutical Preparation	Certified Value	Amount Present (µg/ml)	Drug content found (mg)		Recovery (%) of Standard Addition Procedure
			Present Method*	Standard Addition Method	
Atenolol	50	1	51.18	51.72	103.44
		2	51.72	51.06	102.12
	100	1	96.44	104.1	104.1
		2	102.15	101.47	101.47
Isoniazid	300	1	307.5	298.81	99.60
		2	294.89	299.70	99.9
Pyridoxine. HCl	50	1	51.29	51.27	102.54
		2	51.85	49.61	99.22
	100	1	103.89	101.6	101.6
		2	96.29	99.51	99.51

## الاستنتاج

طورت طريقة طيفية يسيرة ودقيقة وحساسة في التقدير غير المباشر للمركبات الدوائية الاتينولول والايزونايزايد والبايريديوكسين هيدروكلوريد باستخدام نظام التفاعل N-بروموسكسينيميد والصبغة الحمراء المتعادلة في الوسط الحامضي. اعتمدت الطريقة على اكسدة المركبات الدوائية المدروسة في وسط حامض الهيدروكلوريك بواسطة زيادة محسوبة من محلول N-بروموسكسينيميد (36 مايكروغرام/ملتر) لاتباعها تقدير المتبقي من العامل المؤكسد من خلال قصر لون صبغة الحمراء المتعادلة والمضافة بكمية ثابتة (25 مايكروغرام/ملتر) وقياس شدة امتصاص الصبغة المتبقي عند 530 نانوميتر، إذ اعطت الامتصاصات زيادة خطية ضمن المدى من التراكيز 0.3-13 و 0.2-10 و 0.3-17.5 مايكروغرام/ملتر لكل من الاتينولول والايزونايزايد والبايريديوكسين هيدروكلوريد، كانت الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين إذ تراوح معدل نسبة الاسترجاع بين 99.89 و 100.45% وانحراف قياسي نسبي أقل من 1.3%. طبقت الطريقة بنجاح على المستحضرات الصيدلانية للمركبات الدوائية المدروسة والمستحصل عليها من مناشئ مختلفة، إذ كانت النتائج متفقة على نحو جيد مع المحتوى الاصيل للمستحضرات الصيدلانية ومع الطريقة القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني ومع طريقة الاضافة القياسية فضلاً عن ذلك تم تقييم نتائج الطريقة احصائياً بالمقارنة مع الطريقة القياسية من خلال احتساب قيم t و F عند مستوى ثقة 95% إذ وجد أن القيم التجريبية أقل من القيم الجدولية مما يدل على أن الطريقة المطورة ذات صلاحية تطبيق جيد على المستحضرات الصيدلانية للمركبات الدوائية المدروسة.

## المصادر

- Abdul-Aleem, Z. S., Abdul-Aleem, Z. R., and Sabeeh, O. N.(2021) Spectrophotometric Determination of Vitamin B6 in Pure and Pharmaceutical Formulations with Diazotized Metoclopramide Hydrochloride. *International. J Drug Deli. Tech.*, 11(3), 787-792
- Adegoke, O., Thomas, O., Babatunde, D., Oyelami, O., Adediran, A., and Omotosho, A. (2019). Two new spectrophotometric methods for the determination of isoniazid in bulk form and tablet dosage form. *ACTA Pharm. Sci.*, 57(3).

- Altaee, Z. M., and Al-Hammoodi, I. A. (2023). Indirect Spectrophotometric Determination of Pyridoxine Hydrochloride Using Eriochrome Black-T. **College Of Basic Edu. Res. J.**, 19(2), 827-845.
- Antherjanam, S., and Saraswathyamma, B. (2023). Electrochemical preparation and the characterizations of poly (3, 5-diamino 1, 2, 4-triazole) film for the selective determination of pyridoxine in pharmaceutical formulations. **Chem. Pap.**, 1-12.
- Armstrong, C. and Kapolowicz, M. R. (2020). A Preliminary investigation on the effects of atenolol for treating symptoms of anxiety. **Military Med.**, 185( 11-12): 1954-1960.
- Attia, M. S., Youssef, A. O., and Essawy, A. A. (2012). A novel method for tyrosine assessment in vitro by using fluorescence enhancement of the ion-pair tyrosine-neutral red dye photo probe. *Analytical Methods*, 4(8), 2323-2328.
- Azizi, N., Hallaj, T., and Samadi, N. (2022). A turn off–on fluorometric and paper-based colorimetric dual-mode sensor for isoniazid detection. **Luminesce**, 37(1), 153-160.
- Bakir, E., Gouda, M., Alnajjar, A., and Boraie, W. E. (2018). Spectrofluorimetric method for atenolol determination based on gold nanoparticles. **Act. Pharm.**, 68(2), 243-250.
- Beckmann, S., Cheema, S., Labine-Romain, M., Lal, B., Lauro, F. M., Lavania, M., Lee, M., Li, X., Manefield, M. and Zhang, M. (2018). Neutral red: The synthetic phenazine full of electrochemical surprises. **Encyclopedia of Interfacial Chemistry**, Elsevier, Oxford, pp. 382-391

- British Pharmacopoeia (2013) CD-ROM, system Simulation, **The Stationery Office Ltd.**, London.
- Broli, N., Vasjari, M., Vallja, L., Shehu, A., Duka, S., and Cenolli, S. (2022). A Carbon paste sensor modified with banana tissue for determination of atenolol in pharmaceutical tablets. **J Hygienic Eng. Des.**, 38.
- Camaschella, C. (2008). Recent advances in the understanding of inherited sideroblastic anaemia. **British J. Ham.**, 143(1), 27-38.
- Danilina, E. I., and Buskina, K. A. (2017). Kinetic spectrophotometric determination of hydroxylamine and nitrite ion in a mixture by their reactions with neutral red. **Estnik Luzhno-European State University. Series: Kimia**, 9(4), 5-13.
- Demirkaya Miloglu, F., Bayrak, B., and Kadioglu, Y. (2023). Determination of Isoniazid Gained Fluorescent with 9-Anthraldehyde by HPLC-FL Method in Dosage Forms. **Chem. Africa**, 1-8.
- Ericson, M. N., Shankar, S. K., Chahine, L. M., Omary, M. A., Herbing, I. H. V. and Marpu, S. B. (2021). Development of Neutral Red as a pH/pCO<sub>2</sub> Luminescent Sensor for Biological Systems. **Chemo sensor**, 9(8), 210.
- Gayathri, N., and Balasubramanian, N. (1999). Spectrophotometric determination of nitrogen dioxide, nitrite and nitrate with Neutral Red. **Analusis.**, 27(2), 174-180.
- Gruetter, C. A. (2007). x Pharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier Inc Oxford, pp. 1-6
- Hu, Y., Amoah, A. N., Zhang, H., Fu, R., Qiu, Y., Cao, Y., and Lyu, Q. (2022). Effect of ginger in the treatment of nausea and vomiting compared with

vitamin B6 and placebo during pregnancy: a meta-analysis. **J. Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, 35(1), 187-196.

Inam-ul-Haque, S. A. Hussain and N. Aslam (2007), 1-bromo-2,5-pyrrolidinedione - a review, **Sci. Int. (Lahore)**, 19(2), 111-123

Jassim, B. A., and Khaleel, A. I. (2022, November). Determination of atenolol in bulk and pharmaceutical normotic by derivative spectroscopy method for ion-pair complex. **In AIP Conference Proceedings**, 2394(1), 040039. AIP Publishing LLC.

Kamel, S. A., and Abdoon, F. M. (2022, October). Spectrophotometric method for the simultaneous determination of pyridoxine hydrochloride & phenylephrine hydrochloride via H-point standard addition method. **In AIP Conference Proceedings**, 2398(1), 030019). AIP Publishing LLC

Karnebeek, C. D., Hartmann, H., Jaggumantri, S., Bok, L. A., Cheng, B., Connolly, M., and Stockler, S. (2012). Lysine restricted diet for pyridoxine-dependent epilepsy: first evidence and future trials. **Mol. Gen. Met.**, 107(3), 335-344.

Khudhair, A. F., Saeed, S. I., Marhoon, A. A., and Alesary, H. F. (2019, July). A new spectrophotometric method to determine vitamin B6 in pharmaceutical formation samples using a micelle form. In **Journal of Physics: Conference Series**, 1234(1), 012087. IOP Publishing

Mhemeed, A. H. (2021). Spectrophotometric Determination of Metoprolol and Atenolol by Iron (III) and Ferricyanide. **Sys. Reviews Phar.**, 12(1), 34-39.

- Nayif, S. M., and Mohammed, D. H. (2023). Spectrophotometric Determination of Isoniazid in Pharmaceutical Preparations Using Oxidative Coupling Reaction with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. **Rafidain J Sci.**, 32(1), 149-160.
- Niu, X., Zhang, W., Lin, S., and Sun, W. (2008). Spectrophotometric determination of yeast RNA with neutral red. **Bull. Chem. Soc. Ethiopia**, 22(3).
- Omer, S .A ., Mohammad, M .Y ., and Abdullah ,M .S. (2022). Two different spectrophotometric methods for simultaneous determination of binary mixture of atenolol and amlodipine in commercial formulation. **Zanco J Pure Appl. Sci.** 34(1), 36-49
- Pazdernik, T. L., Kerecsen, L. and Shah, M. K. (2003), Pharmacology, Independence Square West, Philadelphia, pp. 110-112,
- Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., and Sri, D. N. (2015). A review on step-by-step analytical method validation. **IOSR J. Pharm.**, 5(10), 7-19
- Repetto, G., Peso, A. and Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, 3 (7): 1125-1131
- Seebauer, C. T., Graus, M. S., Huang, L., McCann, A., Wylie-Sears, J., Fontaine, F. and Francois, M. (2022). Non-beta blocker enantiomers of propranolol and atenolol inhibit vasculogenesis in infantile hemangioma. **J Clin Invest**, 132(3).
- Sharafi, E., and Sadeghi, S. (2023). A highly sensitive and ecofriendly assay platform for the simultaneous electrochemical determination of rifampicin and isoniazid in human serum and pharmaceutical formulations. **New J Che.**, 47(1), 500-514.

- Shehab, I. A., and Al-Sabha, T. (2020). Spectrophotometric determination of Aspirin and Pyridoxine Hydrochloride using 9-Chloroacridin reagent in aqueous solution. **J Educ. Sci.**, 29(1), 60-74.
- Silberstein, S. D.(2015), Preventive Migraine Treatment. *Continuum*, 21(4): 973–989.
- Sudarman, N. S., and Haris, M. S. (2023). Spectrophotometric simultaneous analytical method validation to determine isoniazid and pyridoxine in pure and 3D printed tablet forms. **J Phar.**, 3(1), 9-18.
- Theia'a, N., and Habeb, N. N. (2018). Simultaneous spectrophotometric determination of mesalazine and isoniazid using H-point standard addition method via Schiff's base formation reaction. **Iraqi Nat. J Che.**, 18(2).
- Tiwari, N., Asthana, A., and Upadhyay, K. (2013). Kinetic-spectrophotometric determination of methyl parathion in water and vegetable samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 101, 54-58.
- Tomiyama, H. and Yamashina, A.(2014). Beta-Blockers in the Management of Hypertension and/or Chronic Kidney Disease. **Int. J Hyper.** 2014.
- Tu, C., and Wen, X. (2021). Determination of Isoniazid by Fe (II)-2, 2'-Bipyridine Spectrophotometry. **In E3S Web of Conferences**, 290, 01028. EDP Sciences.
- Ueland, P. M., Ulvik, A., Rios-Avila, L., Midttun, Ø., and Gregory, J. F. (2015). Direct and functional biomarkers of vitamin B6 status. **An. Rev. Nut.**, 35, 33-70.
- Vaikosen, E. N., Bioghele, J., Worlu, R. C., and Ebeshi, B. U. (2020). Spectroscopic Determination of Two Beta-Blockers—Atenolol and Propranolol

by Oxidative Derivatization Using Potassium Permanganate in Alkaline Medium. **Rev. Anal. Chem.**, 39(1), 56-64

Valcarcel M. (2000), "Principles of analytical chemistry", Springer Verily, Berlin, Germany, pp 67-68.

Vilchèze, C., and Jacobs Jr, W. R. (2019). The isoniazid paradigm of killing, resistance, and persistence in Mycobacterium tuberculosis. **J. molecular bio.**, 431(18), 3450-3461.

Winfried A. and Wolfgang J.(1975) Neutral red raped indicator for pH-changes in the inner phase of thylakoids . **Feb. letters** , 59(2) : 310-315.

Yilmaz, B. (2023). Analysis of Atenolol in Rabbit Plasma by HPLC Method. Erzincan University **J Sci. Techn.**, 16(1), 1-10.

Zakaria, S. A., Zakaria, R. A., and Othman, N. S. (2021, November). Spectrophotometric determination of atenolol via oxidation and bleaching color reaction for methyl red dye. In Journal of Physics: **Conference Series**, 2063(1), 012008. IOP Publishing.

Żandarek, J., Binert-Kusztal, Ż., Starek, M., and Dąbrowska, M. (2023). Development and optimization of chromatographic conditions for the determination of selected B vitamins in pharmaceutical products. **Processe**, 11(3), 937.

Zenita, O., and Basavaiah, K. (2011). Utility of N-bromosuccinimide for the titrimetric and spectrophotometric determination of famotidine in pharmaceutical formulations. **Int. J Anal. Chem**, 2011.