CC BY

College of Basic Education Research Journal

www.berj.mosuljournals.com

Spectrophotometric determination of tamoxifen citrate using eosin B in aqueous medium

Intisar Adel Shihab Al-Hamoudi
Zainab Maysar Zian Al-Taie
Ahmed Muzaffar Muhammad
University of Mosul/ College of Education for Girls

Article Information

Article history:

Received: September 6.2023

Reviewer: October 22.2023

Accepted: October 22.2023

Key words :
Tamoxifen citrate, ion association complex, Spectrophotometric Method

Correspondence:

Abstract

A spectrophotometric method has been proposed for the determination of tamoxifen citrate. The method relies on formation of ion association complex with a pink color in an aqueous medium resulting from reaction of microgram quantities of tamoxifen citrate with 1 milliliter of Eosin B in acetic acid at a concentration of 1 M. The absorption was calculated at a wavelength of 543 nm. and the molar absorptivity was found to be 3.9×10^4 L/mol.cm, indicating sensitivity of the method. The method obeyed Beer ʼs law within the range of (0.5-22.5) µg /ml, with a relative standard deviation of less than 0.84. Recovery rate reached 98.80%. Detection limit was 0.259, and quantification limit was 0.865. Method adopted stood out for its precision and good linearity, as well as its ease of application to pharmaceutical formulations of the above mentioned drug. In this way, it can be said that working on such experiments in the future is beneficial, economically speaking. Additionally, researchers in analytical chemistry can follow methodology employed in this study with other dyes. Similarly, the same methods can other local or international pharmaceutical products.

ISSN: 1992 – 7452

التقدير الطيفي للتاموكسيفين سترات باستخدام ايوسين B في الوسط المائي

انتصار عادل شهاب الحمودي زينب ميسر زيان الطائي احمد مظفر محمد
جامعة الموصل/ كلية التربية للبنات

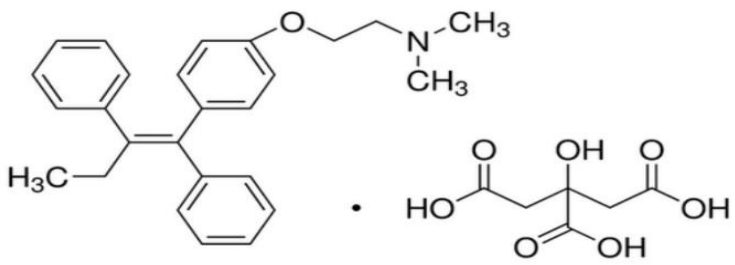
ملخص البحث

أُقترحت طريقة طيفية لتقدير التاموكسيفين سترات. حيث اعتمدت الطريقة على تكوين معقد التجمع الايوني ذو لون وردي في الوسط المائي وذلك نتيجة تفاعل كمية مايكروغرامية من التاموكسيفين سترات مع ١ مللتر من صبغة الأيوسين B وبوجود حامض الخليك تركيزه١ مولاري . قيس الامتصاص عند طول موجي ٥٤٣ نانوميتر حيث بلغ مُعامل الامتصاص المولاري 3.9×10^{4} لتر/ مول. سم، دلالةُ على حساسية الطريقة. والتي كانت مطاوعة لقانون بير ضمن المدى (٠.٥-22.5) مايكروغرام/ مللتر وبانحراف قياسي نسبي اقل من٠.٨٤. فيما بلغت قيمة الاسترجاعية .80.98 % حيث بلغ حد الكشف 0.259 وحد التقدير الكمي ٠.٨٦٥ مايكروغرام/مللتر كما امتازت الطريقة بدقة وتوافقية جيدتين وبسهولة التطبيق على المستحضرات الصيدلانية للتاموكسيفين سترات . وبهذا المبدأ مستقبلا يمكن القول ان العمل على هكذا تجارب مستقبلا يكون ذو فائدة نسبة الى الطريقة الاقتصادية التي تم اجراء البحث فيها. كذلك بإمكان الباحثين في حقل الكيمياء التحليلية اتباع الطريقة المتبعة في هذا البحث مع صبغات أخرى وكذلك يمكن ان تجرى نفس الطرق المتبعة انفا مع مستحضرات صيدلانية أخرى محلية او عالمية المنشأ. اذن يجب العمل بهذا الاتجاه للوصول الى أفضل النتائج الممكنة بأقل تكاليف.

الكلمات المفتاحية: التاموكسيفين سترات، صبغة ايوسين B، التجمع الايوني، طريقة طيفية

مقدمة

التاموكسيفين سترات هو عقار مضاد للأستروجين يستخدم لعلاج سرطان الثدي ويؤخذ عن طريق الفم. قابلية ذوبانه في الماء قليلة [١] هو دواء قابل للذوبان في الدهون يستخدم على نطاق واسع كخط للعلاج الكيميائي [٢] ويمتلك الصيغة التركيبية الاتية [٣]:



(Z) 2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl) phenoxy]N,N-dimethylethanamine
M.Wt=563.6 g/mol

وتم تقديره بطرائق طيفية [4-٥] واخرى كروماتوغرافية[٦-٨]. ونظرا لقلة المصادر المنشورة لتقدير الادوية باستخدام هذه الصبغة، لذا تم اقتراح طريقة طيفية لتقدير هذا العقار باستخدام صبغة الايوسين B.

الجزء العملي:

الأجهزة المستخدمة:

تمت القياسات الطيفية بواسطة جهاز المطياف الفوتومتري ثنائي الحزمة نوعه " **Shimadzu UV-1800spectrophotometary**"**واستخدمت** خلايا زجاجية عرض ١سم، وتم الوزن باستخدام الميزانٍ الحساس نوعه "**ae ADAM**"، وأُجري التسخين باستخدام الحمام المائي نوع ."**elektro-mag**"

محاليل المواد الكيميائية المستخدمة

كانت جميع المواد المستخدمة بنقاوة عالية.

محلول التاموكسيفين سترات (١٠٠ مايكروغرام/ مللتر)

حُضر المحلول بإذابة ٠.٠١ غرام من المركب الدوائي النقي بكمية قليلة من الماء المقطر ثم نقل الى قنينة حجمية سعة الى ١٠٠ مللتر لتر وأكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة.

محلول صبغة الايوسين B (١٠٠ مايكروغرام / مللتر)

حُضر المحلول بإذابة ٠.٠١ غم من المادة النقية بكمية قليلة من الماء المقطر، ثم نقل الى قنينة حجمية سعة الى ١٠٠ مللتر واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة.

محلول حامض الخليك التقريبي (٠.٠٥ مولاري)

حُضر محلول الحامض بتركيز ٠.٠٥ مولاري وذلك بتخفيف كمية مناسبة من الحامض المركز بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة ١٠٠ مللتر.

محاليل المواد الفعّالة سطحياً

حُضرت جميع المحاليل (Tween 20,SDS,CPC, Triton X-114) بتركيز ٠.١٪، وذلك بإذابة ٠.١ غم من كل عامل شد سطحي ثم نُقلت المحاليل الى القناني الحجمية وأكمل الحجم بالماء المقطر الى ١٠٠ مللتر.

الدراسة التمهيدية:

عند إضافة ١.٠ مللتر من حامض الخليك تركيزه ١.٠ مولاري الى كمية مايكروغرامية من التاموكسيفين سترات ١٠ مايكروغرام/ مللتر $^{-1}$ و اضافة ١.٠ مللتر لتر من الايوسين B بتركيز ١٠٠ مايكروغرام /مللتر تمزج المحتويات جيدا وتخفف بالماء المقطر الى حد العلامة باستخدام قنينة حجمية سعة ١٠ مللتر. لوحظ تكون معقد بلون وردي قيس له الامتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر.

ضبط الظروف المثلى:

تأثير نوع الحامض:

تم دراسة تأثير أنواع مختلفة من الحوامض (حامض الهيدروكلوريـــك، حامض الكبريتيـــك، حامض الفسفوريك، حامض النتريك وحامض الخليك) فـي التقدير وذلك بإضافة ١.٠ مللتر و بتركيز ١.٠ مولاري، من كل منها كلٌ على انفراد الى قناني حجمية سعة ١٠ مللتر تحتوي على ١٠ مايكروغرام/مللتر من التاموكسيفين سترات ويتبعها إضافة ١.٠ مللتر من الايوسينB بتركيز ١٠٠ مايكروغرام /مللتر. وقيس الامتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر. يتبين من الجدول (١) ان حامض الخليك هو الأنسب في التقدير لذا اعتمد في الدراسات اللاحقة.

جدول (١) تأثير نوع الحامض على امتصاص المعقد

Acid used 0.1M	Without	HCl	H_2SO_4	CH_3COOH	HNO_3	H_3PO_4
Absorbance	0.062	0.027	0.015	0.211	0.016	0.115

تأثير تركيز الحامض:

تم دراسة تراكيز مختلفة من حامض الخليك تراوحت ٠.٠٠٥ –٥ مولاري ، وذلك بإضافة ١.٠ مللتر من كل حامض الى قنانـي حجمية سعة ١٠ مللتر لتر تحتوي على ١٠ مايكروغرام /مللتر لتر من الدواء ويتبعها إضافة ١.٠مللتر من الايوسينB بتركيز ١٠٠ مايكروغرام /مللتر واكمل الحجم بالماء

المقطر الى حد العلامة وقيس الامتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر. يتبين من الجدول (٢) ان التركيز0.05 كان الأنسب في التقدير لذا اعتمد في الدراسات اللاحقة.

جدول (٢) تأثير تراكيز مختلفة من حامض الخليك على الامتصاص

Acetic acid (M)	0.05	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
Absorbance	0.335	0.201	0.207	0.210	0.132	0.118

تأثير حجم الحامض:

تم دراسة حجوم متزايدة من حامض الخليك تركيزه ٠.٠٥ مولاري تراوحت ٠.١–2.0 مللتر واتبعت نفس طريقة العمل والإضافات في الخطوة السابقة ، يتبين من الجدول (٣) ان الحجم ٠.١ كان الأنسب في التقدير لذا اعتمد في الدراسات اللاحقة.

جدول (٣) تأثير حجم الحامض على الامتصاص

Volume of CH_3COOH(0.05)M	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0
Absorbance	0.09	0.335	0.453	0.430	0.395	0.210	0.332	0.327

تأثير تركيز وحجم صبغة الايوسين B:

تم تحضير تراكيز مختلفة من الصبغة تراوحت ٢٥–٢٠٠ مايكروغرام /مللتر وتم إضافة ١.٠ مللتر من كل تركيز الى ١٠ مايكروغرام/مللتر من الدواء بوجود ٠.١ مللتر من الحامض وتم قياس الامتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر بعد اكمال الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة. يتبين من الجدول (٥) ان التركيز ٢٠٠ مايكروغرام /مللتر هو الانسب وعليه أُعتمد بالدراسات اللاحقة.

جدول (٤) تأثير تركيز الايوسين B على امتصاص المعقد المتكون

Conc.EosinB (ppm)	25	50	100	150	200
Absorbance	0.170	0.292	0.453	0.481	0.589

تم تمت دراسة تأثير إضافة حجوم متزايدة من الكاشف بتركيز ٢٠٠ مايكروغرام /مللتر تراوحت ٠.٢–4.0 مللتر واتبعت نفس طريقة العمل والإضافات في الخطوة السابقة، يتبين من الجدول (٥) ان الحجم 2.5 مللتر كان الأنسب في التقدير لذا اعتمد في الدراسات اللاحقة.

جدول (٥) تأثير حجم الايوسين B

Volume of Eosin B ml	٠,٢	٠,٥	٠,٨	1.0	1.5	2.0	2.5	٣,٠	٤,٠
Absorbance	٠,١٦٧	٠,٤٥٥	٠,٤٨٢	٠,٥٨٩	0.621	0.650	0.725	0.602	0.562

تأثير المواد الفعّالة سطحياً

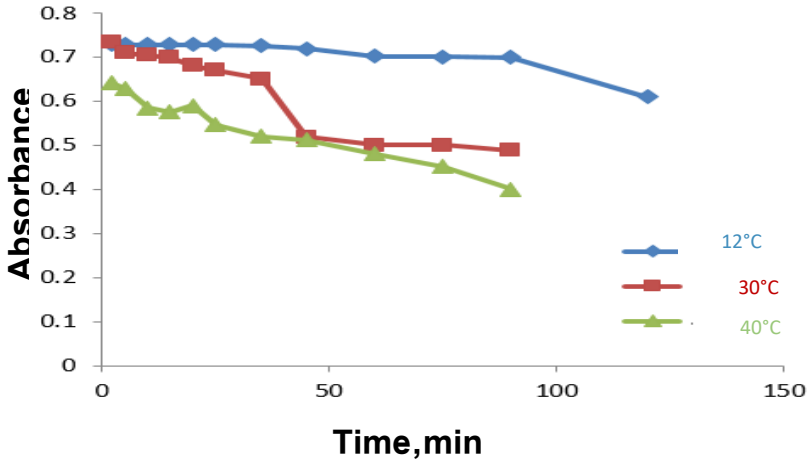
لغرض زيادة الحساسية تم دراسة تأثير عدد من المواد الفعّالة سطحياً. الجدول (٦) يبين ان اضافة المواد الفعالة سطحيا ادى الى نقصان في شدة الامتصاص، لذا تم استبعادها من الدراسة.

جدول (٦) تأثير المواد الفعّالة سطحياً على تكوين المعقد

Surfactant 0.1%(1.0ml)	without	CPC	SDS	Tween-20	Triton x-114
Absorbance	٠,٧٢٤	-0.003	0.438	0.510	0.441

تأثير درجة الحرارة والزمن على امتصاص المعقد واستقراره:

تمت دراسة تأثير درجة الحرارة وزمن استقرار الناتج عند (١٢°م،٣٠°م ،٤٠°م) بوجود كمية ثابتة من الدواء ١٠ مايكروغرام/مللتر لتر و٠.١ مللتر بتركيز ٠.٠٥ مولاري من حامض الخليك ويتبعها إضافة ٢.٥ مللتر من الايوسين B بتركيز ٢٠٠ مايكروغرام /مللتر، وقيس الامتصاص بعد التخفيف بالماء المقطر الى١٠ مللتر عند ٥٤٣ نانوميتر. الشكل (١) يوضح ان المعقد يتكون مباشرة من بدء التفاعل وبزمن استقرار أكثر من خمس وثلاثون دقيقة وان درجة حرارة المختبر(١٢°م) كانت هي الأفضل حيث أعطت اقصى امتصاص للمعقد المتكون.



شكل (١) تأثير درجة الحرارة وزمن استقرار المعقد المتكون

تأثير تسلسل الإضافة:

تم دراسة تأثير تسلسل الإضافة على قيم الامتصاص للحصول على أفضل تسلسل يعطي اعلى امتصاص وإن النتائج المُدونة في الجدول (٧) تشير الى ان التسلسل الأول هو الأفضل وعليه اعتمد في الدراسات اللاحقة.

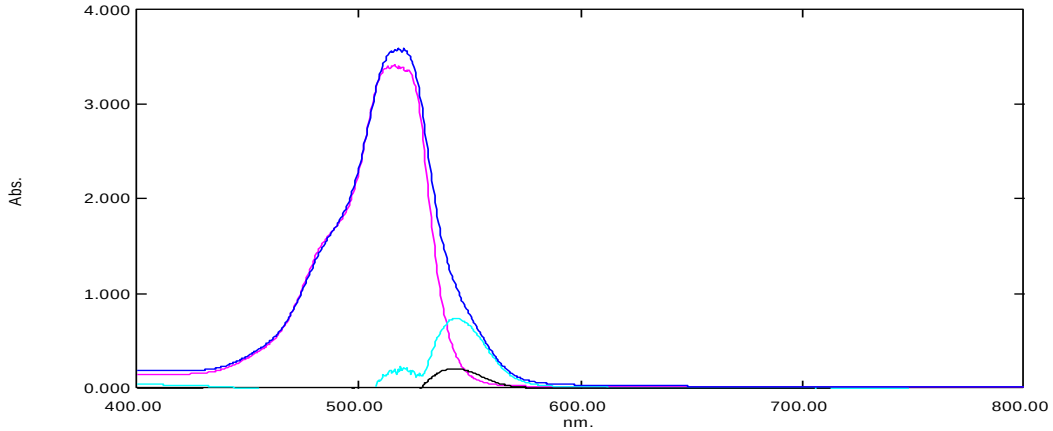
جدول (٧) تأثير تسلسل الإضافة

Order Number	Reaction of component	Absorbance
I	D + A +R	٠,٧٢٤
II	A + R + D	٠,٦٧٠
III	D + R + A	٠,٦٣٧

الدواء (D) ، الايوسينB (R) ، حامض الخليك(A)

طيف الامتصاص النهائي:

بعد الوصول الى الظروف المُثلى في تقدير التاموكسيفين سترات وتثبيتها رُسِم طيف الامتصاص النهائي والذي اعطى اعلى امتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر، كما موضح في الشكل (٢) .



شكل (٢) طيف الامتصاص النهائي لمعقد التاموكسيفين سترات- الايوسين B

a: ناتج تفاعل 5 مايكروغرام / مللتر من التاموكسيفين سترات مع ٢.٥ مللتر من الايوسين B بوجود حامض الخليك مقابل المحلول الصوري.

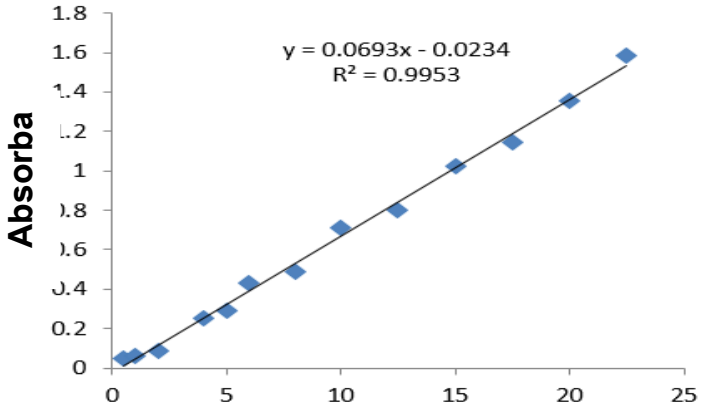
b: ناتج تفاعل ١٠ مايكروغرام / مللتر من التاموكسيفين سترات مع 2.5 مللتر من الايوسين B بوجود حامض الخليك مقابل المحلول الصوري.

c: المحلول الصوري مقابل الماء

e: ناتج تفاعل ١٠ مايكروغرام / مللتر من التاموكسيفين سترات مع ٢.٥ مللتر من الايوسين B بوجود حامض الخليك مقابل الماء.

طريقة عمل المنحني القياسي للتاموكسيفين سترات:

لرسم المنحني القياسي للتاموكسيفين سترات تم اخذ حجوم متزايدة (٠.٠٠٥-٢.٥) مللتر من محلول ١٠٠ مايكروغرام /مللتر من التاموكسيفين سترات واضيفت الى مجموعة من القناني الحجمية سعة ١٠مللتر بوجود ٠.١ مللتر من حامض الخليك بتركيز ٠.٠٠٥ مولاري ويليها إضافة ٢.٥ مللتر من الايوسينB وقيس الامتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر بعد التخفيف بالمـاء المقطر الى حد العلامة الشكل (٣) يوضح المنحني القياسي للتاموكسيفين سترات الذي يتبع قانون بير ضمن تراكيز تراوحت بين ٠.٥-٢٢.٥ مايكروغرام /مللتر وبمعامل تقدير ارتباط ٠.٩٩٥٣ مما يدل على امتلاك المنحني القياسي مواصفاتٍ خطيةٍ جيدة، وبلغت الامتصاصية المولارية ٣.٩×١٠^4 لتر/ مول. سم مما يدل على ان الطريقة حساسة، وبلغ كل من حد الكشف والحد الكمي ٠.٢٥٩، ٠.٨٦٥ مايكروغرام/مللتر على التوالي. الجدول (٨) يبين النتائج التي تم التوصل إليها.



شكل (٢) المنحني القياسي للتاموكسيفين سترات

جدول (٨) المواصفات الخطية للتاموكسيفين سترات

Parameters	Tamoxifen Citrate
Linearity range(µg/ml)	(0.5-22.5)
Intercept	-0.0234
Slope	٠,٠٦٩٣
Determination coefficient(R^2)	٠,٩٩٥٣
LOD (µg/ml)*	٠,٢٥٩
LOQ (µg/ml)*	٠,٨٦٥
Molar absorptivity ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	3.9×10^4

*Average of ten determinations

دقة الطريقة وتوافقها

تم دراسة دقة وتوافقية الطريقة المقترحة من خلال حساب نسبة الاسترجاع والانحراف القياسي النسبي باستخدام ثلاث مكررات لثلاثـة تراكيزٍ مختلفة للدواء. دُونت النتائج في الجدول (٩).

جدول (٨) دقة الطريقة وتوافقها

Compound	Amount added(µg/ml)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD*
Tamoxifen Citrate	٥	٩٧,٠٨	٩٨,٨٠	٠,٨٣٠
	٨	١٠١,٠٨		٠,٤٠٩
	١٥	٩٨,٢٥		٠,٣٨٠

*Average of three determinations

تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية

وزنت سبعة أقراص من التاموكسيفين (٢٠ ملغم) وطحنت جيدا، واخذ ما يُعادل وزن قرص واحد وأذيب بالماء المقطر ثم رشح واكمل الحجم الى ١٠٠ مللتر لتر باستخدام الماء المقطر للحصول على تركيز ٢٠٠ مايكروغرام .مللتر $^{-1}$، وسحب منه ٥٠ مللتر وخففت الى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر لتحضير محلول بتركيز ١٠٠ مايكروغرام /مللتر وأخذت منه حجوم مختلفة للحصول على التراكيز(٥ ،٨ ،١٥) مايكروغرام /مللتر. وتم إيجاد تركيز المركب الدوائي في الأقراص باستخدام معادلة الخط المستقيم للمنحني القياسي للمادة النقية، الجدول (١٠) يبين النتائج.

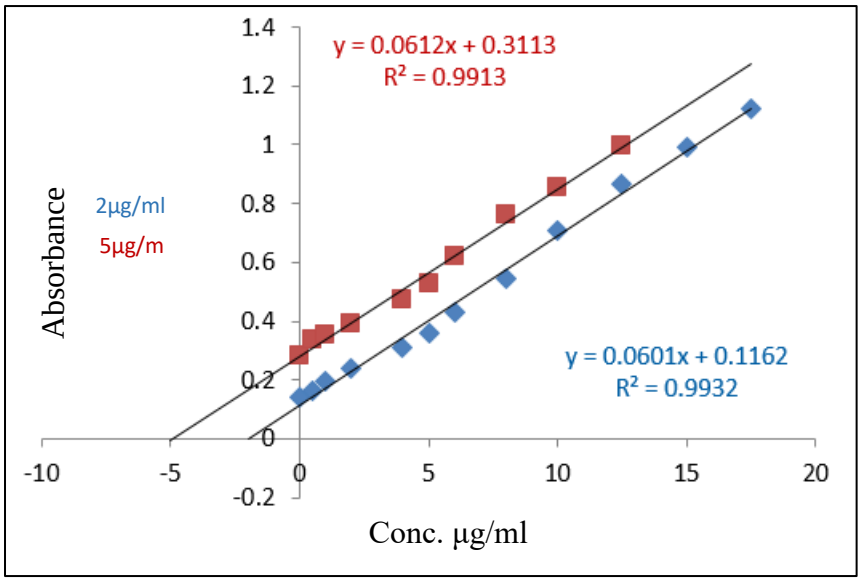
جدول (١٠) تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية

Pharmaceutical preparation	Certified Value (mg)	Amount present (µg/ml)	Amount found (µg/ml)	Recovery (%)	Average recovery (%)	Drug content (mg)
Tamoxifen(20mg)	٢٠	٥	٤,٨١٠	٩٦,٢	٩٧,٩٦	١٩,٢٤
		٨	٧,٩٨٥	٩٩,٨١		١٩,٩٦٢
		15	١٤,٦٨١	٩٧,٨٧		١٩,٥٧٤

* Average of three determinations. . WOCKHARDT,UK (Tablet)

تطبيق طريقة الإضافة القياسية على المستحضرات القياسية

تم تطبيق طريقة الإضافة القياسية لإثبات كفاءة الطريقة المقترحة ومدى نجاحِها في تقدير التاموكسيفين سترات في مستحضراته الصيدلانية بشكل اقراص وخلوها من تأثير المتداخلات. الشكل (٤) والجدول (١١) يبين النتائج المستحصلة .



شكل(٤)) منحني الإضافة القياسية لتقدير التاموكسيفين سترات في المستحضر الصيدلاني الاقراص

جدول(١١) الإضافة القياسية للتاموكسيفين سترات

Pharmaceutical preparation	Certified Value (mg)	Amount present (µg/ml)	Amount found (µg/ml)	Recovery (%)
Tamoxifen	٢٠	٢	1.933	96.65
		٥	5.086	101.72

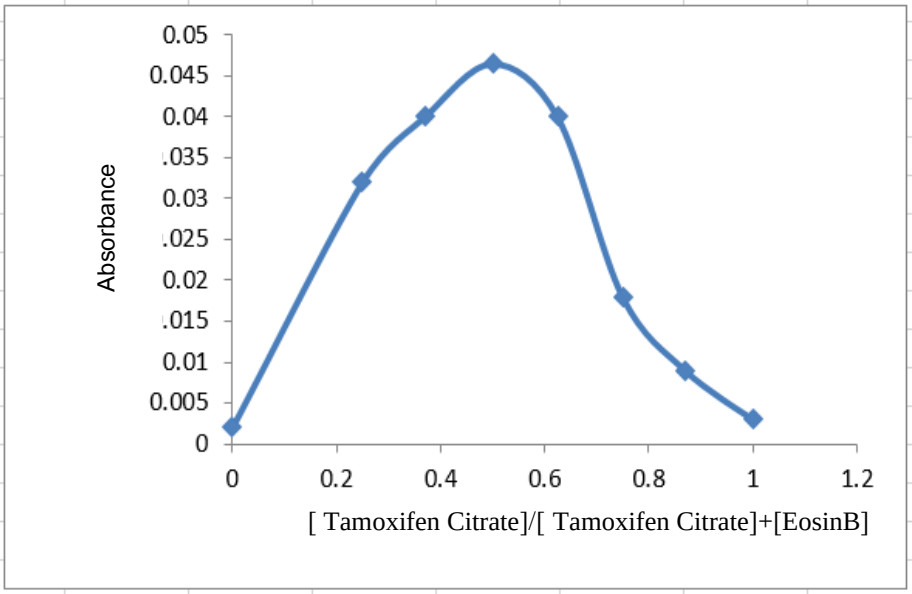
* Average of three determinations.

دراسة طبيعة الناتج المتكون

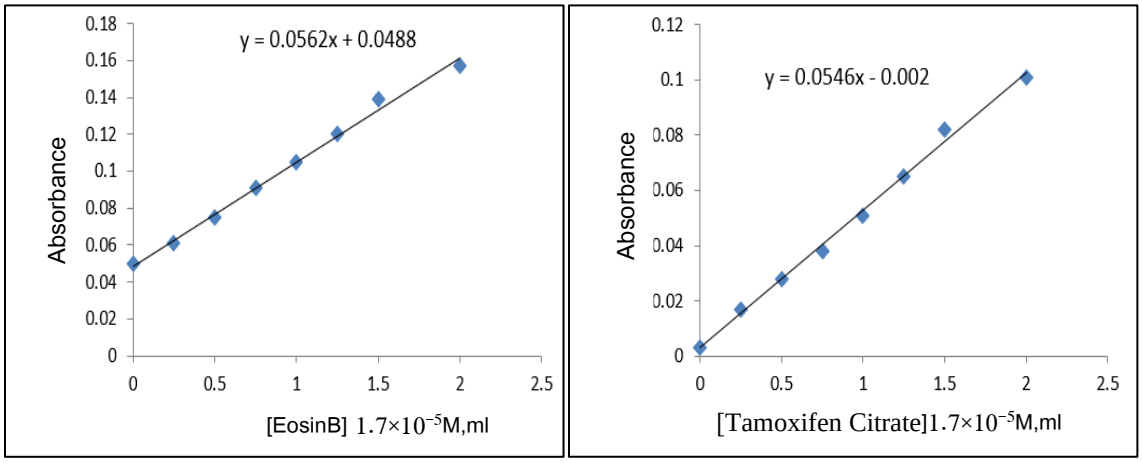
تمت دراسة طبيعة الناتج المتكون وذلك باتباع طريقتي

التغير المستمر [٩] و نسبة الميل[١٠] للمعقد الناتج من التفاعل بين الدواء مع الأيوسينB وباستخدام محاليل مخففة لكل من الدواء و الأيوسين B وبتركيز (١.٧×١٠$^{-٥}$) مولاري وبوجود الكمية المثلى من حامض الخليك وقيس الامتصاص بعد إكمال الحجم إلى حد ١٠ مللتر بالماء المقطر عند ٥٤٣ نانوميتر. الشكل (٥)) والشكل (٦) يؤكدان بان الناتج يتكون بنسبة ١:١(التاموكسيفين سترات: الأيوسينB). وتم احتساب ثابت الاستقرار بتطبيق القانون الاتي:

$$K_{st} = \frac{1-\alpha}{\alpha^2 c}$$



شكل (٥) رسم التغيرات المستمرة للمعقد المتكون من التاموكسيفين سترات-الأيوسينB



شكل (٦) رسم نسبة الميل للمعقد المتكون من من التاموكسيفين سترات—الأيوسين B

$$K_{st} = \frac{1-\alpha}{\alpha^2 c}$$

جدول (١٢) ثابت الاستقرار للمعقد المتكون

Compound	Conc. (mol.l^{-1})	Absorbance		α	Average K_{st} (l.mol^{-1})
		As	Am		
Tamoxifen Citrate	8.50×10^{-٧}	0.002	0.086	0.976	3.2×10^{4}
	1.02×10^{-6}	0.008	0.102	0.921	
	١.36×10^{-٦}	0.029	0.111	0.738	

الاستنتاج

طورت طريقة طيفية لتقدير التاموكسيفين سترات اعتمدت على تفاعل تكوين معقد التجمع الايوني في الوسط المائي سترات مع الأيوسين B بوجود حامض الخليك ، وتم قياس الامتصاص عند ٥٤٣ نانوميتر، فقد تم تقدير كميات تراوحت (٠.٥- 22.5) مايكروغرام /مللتر وبلغ معامل الامتصاص المولاري 3.9×10^{4} لتر/مول .سم دلالةُ على حساسية الطريقة . تميزت هذه الطريقة بدقة توافقية، حيثُ بلغ مُعدل نسبة الاسترجاع 98.80%. في حين الانحراف القياسي النسبي اقل من ٠.٨٤، وتم تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية للتاموكسيفين سترات فوجد ان النتائج تتفق بشكل جيد مع طريقة الإضافة القياسية.

المصادر

1. Elnaggar, Y. S., El-Massik, M. A., and Abdallah, O. Y. (2009). "Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: design and optimization". International journal of pharmaceutics, 380(1-2), 133-141.
2. Alyami, M. H., Alyami, H. S., Alshehri, A. A., Alsharif, W. K., Shaikh, I. A., and Algahtani, T. S. (2022). "Tamoxifen Citrate Containing Topical Nanoemulgel Prepared by Ultrasonication Technique: Formulation Design and In Vitro Evaluation". Gels, 8(7), 456.
3. El-Leithy, E. S., and Abdel-Rashid, R. S. (2016). "Validation and application of Vierordt's spectrophotometric method for simultaneous estimation of tamoxifen/coenzyme Q10 in their binary mixture and pharmaceutical dosage forms". asian journal of pharmaceutical sciences, 11(2), 318-325.
4. Brown, S. A., Akpabio, E. I., Akpa, P. A., Nnamani, P. O., Akabuogu, B. C., and Onunkwo, G. C. (2007). "Studies on the Charge-Transfer Interaction Between Tamoxifen Citrate and Chloranilic Acid". Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(4), 203-208
5. Sastry, C. S., Rao, J. L., and Rao, K. R. (1995). "Spectrophotometric methods for the determination of tamoxifen citrate". Talanta, 42(10), 1479-1485
6. Jamshidi, A., and Sharifi, S. (2009). "HPTLC analysis of tamoxifen citrate in drug-release media during development of an in-situ-cross-linking delivery system". JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC, 22, 187-189.
7. Sandhu, P. S., Beg, S., Katare, O. P., and Singh, B. (2016). "QbD-driven development and validation of a HPLC method for estimation of tamoxifen citrate with improved performance". Journal of chromatographic science, 54(8), 1373-1384.
8. Saleh, G. A., Abdel-aal, F. A., and Abbas, N. S. (2018). "Simultaneous TLC–densitometric determination of tamoxifen citrate and medroxyprogesterone

acetate and UV-degradation kinetic study of medroxyprogesterone acetate". Biomedical Chromatography, 32(12), e4366.
9. Kenner, C.T. (1979). "Quantitative analysis" , Macmllian publishing Co. Inc., New York, U.S.A., p. 32.
10. Harvey, A., and Manning, D. (1950). "Spectrophotometric Methods of establishing empirical formulas of colored complexes in solution". Journal of the American Chemical Society. 72, 4488-4493.