------مجلة علوم الرافدين، المجلد 21، العدد 4، ص123-140،2010------

التقدير الطيفي للنايترازيبام باقتران الصيغة المختزلة المؤزوتة مع الميتا- امينوفينول ككاشف اقتران

مها ذنون حسين

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 30/ 9 / 2009 ؛ تاريخ القبول 16 / 8 / 2010)

الملخص

يتضمن البحث تطوير طريقة طيفية لتقدير كميات متناهية في الصغر من النايترازيبام بالاعتماد على ازوتة ناتج اختزال النايترازيبام ثم الاقتران مع ميتا-امينوفينول ككاشف اقتران في وسط قاعدي لتكوين صبغة أزوية ذائبة في الماء ومستقرة ذات لون برتقالي وتعطي أعلى شدة امتصاص عند الطول الموجي 478 نانوميتر. وكانت حدود قانون بير من 5 إلى 200 مايكروغرام/ 25 مل وبلغت الامتصاصية المولارية 17581.25 لتر. مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ، ودلالة ساندل 0.016 مايكروغرام. سم$^{-2}$ والخطأ النسبي تراوح بين 2.11- و 4. 1+% والانحراف القياسي النسبي بين 0.55± و 2.10± % اعتمادا على مستوى تركيز الدواء، تم تطبيق الطريقة بنجاح في تقدير النايترازيبام بالأقراص الدوائية.

Spectrophotometric Determination of Nitrazepam by Coupling of it's Diazotized Reduced form with m- Aminophenol as Coupling Reagent

Maha T. Hussin

Department of Chemistry

College of Science

Mosul University

ABSTRACT

This paper describes the development of a spectrophotometric method for the determination of microgram amounts of nitrazepam after diazotization of it's reduced product and coupling with m-aminophenol in basic medium, to form an intense orange – coloured, water – soluble and stable azo-dye which shows a maximum absorption at 478

nm. Beer's law is obeyed over the concentration range of 5 to 200µg/25ml with a molar absorptivity 17581.25 l. $mol^{-1}.cm^{-1}$ and Sandell's sensitivity of 0.016 µg.cm^{-2}. The relative error is ranged from -2.11 to +1.4 % and relative standard deviation from ±0.55 to ±2.10 %, depending on the concentration level.

The method has been applied successfully to the determination of nitrazepam in pharmaceutical preparation (tablet).

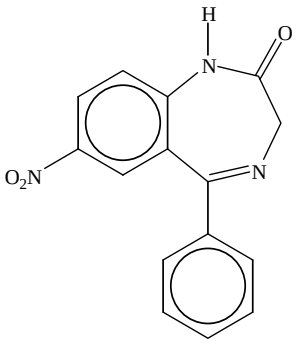
Keywords : Nitrazepam; reduction; diazotisation; m- aminophenol, spectrophotometry .

المقدمة

النايترازيبام هو مركب دوائي ذو الاسم العلمي:

7 -Nitro-5-phenyl-1,3-dihydro-2H- 1,4-benzodiazepin-2-one.

ويكون بشكل مسحوق اصفر له درجة انصهار تتراوح بين 226 و230 م ويمتلك الصيغة الكيميائية المذكورة أدناه (British pharmacopia , 2002).



$C_{15}H_{11}N_3O_3$
M.wt=281.3

ويستخدم هذا الدواء في معالجة حالات الأرق وحالات التشنج العـصبي (Castro *et al.*, 2001) و يتواجـد النـايترازيبام بعدة أسـماء تـجـاريـة منهـا Mogadon, Alodorm, Hypnotex. (Yasui *et al.*, 2005). يصنف النايترازيبام ضمن مجموعة البنزودايازيبنز (banzodiazepines) والتي تعتبـر مـن أهـم مجاميع الأدوية المهدئة ذات التأثير المباشر على الجهاز العـصبي المركـزي (The free encyclopedia, 2008).

لقد تم تطبيق طرائق تحليلية متعددة لتقدير النايترازيبام، حيث تم تقدير النايترازيبام ونواتجه الايضية في الإدرار باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الورقة (Inoue and Niwaguchi, 1985). كمـا أمكـن اسـتخدام كروماتوغرافيا الغاز لتـقديره في البلازما (Kangas *et al.*, 1977). فـي حـين أمكـن اسـتخدام تقنيـة كروماتوغرافيا الـسائل ذات الأداء العـالي (HPLC) لتقـدير كـلا مـن النايترازيبـام و الفلانترازيبـام (Flunitrazepam) في المشروبات حيث بلغ المدى الخطي للتقدير 20 نانوغرام/مل في حين بلغـت نـسبة الاسترجاع لكل من النايترازيبام والفلانترازيبام 95.5% و 78% على التوالي (Kevin *et al.*, 2008).

تم فصل وتقدير نواتج التحال الحامضي للنايترازيبام باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) و كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي (HPLC) مع مطيافية طيف الكتلة ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي (NMR) (DeBruyue *et al*., 1984).

كما استخدمت تقنية HPLC في تقدير الديازيبام والنايترازيبام في مصل الدم حيث كانت الطريقة ذات انتقائية وحساسية عالية بالإضافة إلى كونها طريقة سريعة وبلغ فيها المدى الخطي للتقدير 1- 1000 نانوغرام/مل (Welk, 1997). فضلا عن ذلك أمكن تقدير النايترازيبام باستخدام نفس التقنية في مصل الدم حيث بلغ المدى الخطي للتقدير 11.2-1670 نانوغرام/مل في حين بلغت نسبة الاسترجاع 75.8% (Kevin *et al*., 2006) .

كما طورت طريقة حساسة باستخدام التقنية ذاتها في فصل وتقدير خليط من بعض مركبات بنزودايازيبين (بالتحديد مركبات نايترازيبام، دايازيبام و ميدازيبام) حيث تم فصل المركبات الثلاثة في اقل من دقيقتين وقد وجد أن الطريقة قياسية للتقدير الكمي لهذه المركبات في المستحضرات الدوائية حيث كانت نسبة الاسترجاع 101.6% والانحراف القياسي النسبي ±0.11 جزء في المليون وكان الحد الأدنى لتركيز الدواء بحدود 200 جزء في البليون (El – Mubarak *et al*., 2000) .

في حين طورت طريقة بولاروغرافية سريعة وسهلة لتقدير النايترازيبام باستخدام الايثانول كمذيب للاستخلاص وباستخدام محاليل منظمة مختلفة (Arvind and Kamal, 1985). وصفت طريقة طيفية تعتمد على قياس امتصاصية النايترازيبام في مستحضراته الدوائية عند طول موجي 282 نانوميتر وفي وسطين مختلفين، الأول باستخدام محلول حامض الهيدروكلوريك (0.1) مولاري وعند دالة حامضية 1.0 ، والوسط الثاني باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1) مولاري وعند دالة حامضية 13.0 (Davidson and Lia, 1989) . كما وصفت طريقة طيفية تعتمد على اختزال مركب النايترازيبام باستخدام مسحوق الزنك مع حامض الهيدروكلوريك وقياس الاختلاف في الإمتصاص قبل وبعد الاختزال، حيث طبقت الطريقة بنجاح على الأقراص الدوائية للنايترازيبام وبلغ المدى الخطي للتقدير 1 - 20 مايكروغرام / مل وبخطأ نسبي اقل من 1% (El – Brashy and Aly, 2005). فضلا عن ذلك قدر النايترازيبام في مستحضراته الصيدلانية بطريقة طيفية معتمدة على مفاعلة 1- نفثول مع ملح الدايزونيوم الناتج من ازوتة ناتج التحال المائي ألحامضي للنايترازيبام وقياس امتصاصية الصبغة الناتجة عند الطول الموجي 600 نانوميتر (Manual *et al*., 1992) .

كما تم تقدير النايترازيبام بطريقة طيفية من خلال مفاعلة كاشف الريسورسينول مع ملح الدايزونيوم الناتج من ازوتة ناتج التحال المائي الحامضي للنايترازيبام وقياس امتصاص الصبغة الناتجة عند الطول الموجي 485 نانوميتر (Al-Ghabsha *et al*.,2008) في حين استخدمت الطرائق التسحيحية (Greenhow

Baltazar and Carla ,) والفولتامتريـة (Monzon and Yudi, 2001) والمجهادية (and Todipo, 2004 2000) في تقدير المركب نفسه.

وفي هذا البحث تم تطوير طريقة طيفية بسيطة لتقدير النايترازيبام في الوسط المائي بعـد اختـزال مجموعة النايترو إلى مجموعة الامينو ثم مفاعلة الناتج بعد ازوتته مع ميتا - امينوفينول ككاشف اقتران فـي وسط قاعدي لإعطاء صبغة أزوية مستقرة لها أقصى امتصاص عند الطول الموجي 478 نانوميتر.

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة

تمت القياسات الطيفية بواسطة جهاز المطياف الضوئي ذو الحزمة الواحـدة نـوع (CECIL –CE1021 digital single beam spectrophotometer) و المطياف الضوئي ذو الحزمتين نـوع Shimadzu UV-160A باستخدام خلايا زجاجية ذات عرض 1سم، قيست الدالة الحامضية باستخدام جهاز الدالة الحامضية من نوع PW 9421 pH meter PHILIPS مزود بقطب من نوع CE1 PHILIPS وتمت عملية الوزن للعينات باستخدام ميزان حساس من نوع Sartorius-BL-2105.

المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة

المواد الكيميائية المستعملة جميعها على درجة عالية من النقاوة .

- **محلول النايترازيبام النقي (10000 مايكروغرام / مللتر) :**

حضر من إذابة 0.5 غرام من النايترازيبام النقي في 20 مللتر ثنائي مثيل فورم اميد (DMF) ثم أكمل الحجم في قنينة حجمية إلى 50 مللتر بالايثانول (Al-Ghabsha *et al*.,2008) .

- **محلول النايترازيبام المختزل (500 مايكروغرام / مللتر) :**

تم تحضيره بأخذ 5 مللتر من محلول النايترازيبام النقي (10000 مايكروغرام / مللتر) ووضعه فـي بيكر وأضيف له 4 غرام من مسحوق الخارصين و10 مللتر من الماء المقطر و 20 مللتر من حامض الهيدروكلوريك المركز وتم رج الخليط بصورة متقطعة لمدة نصف ساعة. بعد ذلك تم ترشيح الخلـيط باستخدام قمع بخنر ووضع الراشح في قنينة حجمية سعة 100 مللتر وأكمل الحجم إلـى حـد العلامـة بالماء المقطر ثم حفظ في قنينة داكنة .

- **محلول النايترازيبام المختزل والمعادل (100 مايكروغرام / مللتر) :**

تم اخذ 5 مللتر من محلول 500 مايكروغرام / مللتر من النايترازيبام المختزل وأضيف إليه 7 مللتـر من محلول 20% كاربونات الصوديوم وقد لوحظ تكون راسب ابيض من كاربونات الخارصـين، ثـم رشح المحلول باستخدام بودقة ترشيح زجاجية نوع (Sintered glass crucible No.2) واخذ الراشـح

ووضع في قنينة حجمية سعة 25 مللتر وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر ويحفظ في قنينة داكنة اللون ذات سداد محكم (Subhi, 2004) و (تماضر الغريري، 2004) .

- محلول ميتا-امينوفينول (0.5% وزن / حجم) :

حضر هذا المحلول بإذابة 0.5 غرام من ميتا-امينو فينول في 100 مللتر من الماء المقطر وحفظ في قنينة داكنة وكان مستقراً لمدة أسبوعين .

- محلول حامض الهيدروكلوريك (1عياري) :

حضر هذا المحلول بتخفيف 8.47 مللتر من حامض الهيدروكلوريك المركزN 11.8 إلى 100 مللتر بالماء المقطر .

- محلول نتريت الصوديوم (1% وزن/حجم) :

حضر هذا المحلول بإذابة 1 غرام من نتريت الصوديوم في قنينة حجمية سعة 100 مللتر بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى حد العلامة. يحفظ هذا المحلول في قنينة معتمة ويكون مستقراً لمدة أسبوع.

- محلول حامض السلفاميك (3% وزن / حجم) :

حضر هذا المحلول بإذابة 3 غرام من حامض السلفاميك في قنينة حجمية سعة 100 مللتر بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى حد العلامة. يحفظ هذا المحلول في قنينة معتمة ويكون مستقراً لمدة أسبوع.

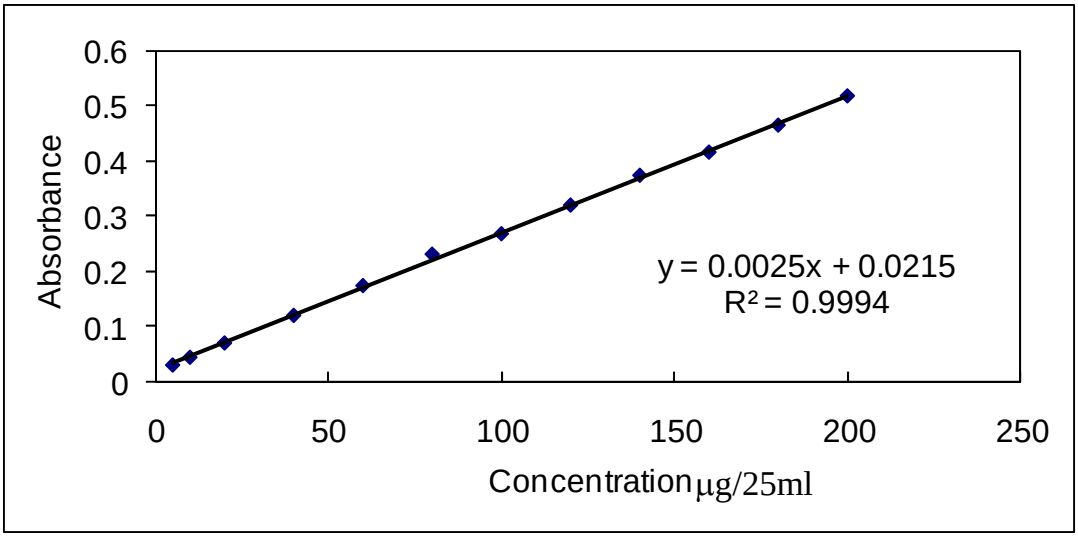
- محلول كاربونات الصوديوم (1عياري) :

حضر هذا المحلول بإذابة 5.3غرام من كاربونات الصوديوم في 100 مللتر من الماء المقطر .

طريقة العمل المعتمدة والمنحني القياسي :

اعتمادا على الظروف المثلى (والموصوفة لاحقاً) التي تم التوصل إليها تمت إضافة 1 مللتر من(1 عياري) حامض الهيدروكلوريك إلى مجموعة من القناني الحجمية سعة 25 مللتر والحاوية على حجوم متزايدة من النايترازيبام المختزل 5 - 200 مايكروغرام/ 25 مللتر ثم إضافة 1 مللتر من 1% نتريت الصوديوم مع الرج والتحريك والترك لمدة خمسة دقائق لكي يكتمل التفاعل ومن ثم أضيف 0.7 مللتر من محلول 3% حامض السلفاميك مع التحريك ثم الترك لمدة 7 دقائق لكي يتم تحطيم الزيادة من النتريت. يتبع ذلك إضافة 2 مللتر من كاشف ميتا-امينوفينول ثم جعل الوسط قاعدي بإضافة 2 مللتر من 1عياري كاربونات الصوديوم وأخيرا أكملت الحجوم بالماء المقطر إلى حد العلامة. وقيست شدة الامتصاص لها مقابل المحلول الصوري عند الطول الموجي 478 نانوميتر وبرسم الامتصاص مقابل التركيز تم الحصول على

المنحني القياسي لتقدير النايترازيبام الشكل (1) والذي يكون موافقا لقانون بير في مـدى تركيـز 5 - 200 مايكروغرام/ 25 مللتر .



الشكل 1: المنحني القياسي لتقدير النايترازيبام باستخدام كاشف ميتا-امينوفينول .

بلغت قيمة معامل التقدير (0.9994) مما يدل إحصائيا إن المنحني القياسي يمتلك مواصـفات خطيـة ممتازة، وتم حساب الامتصاصية المولارية فوجد أنها تساوي 17581.25 لتر. مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ودلالـة سـاندل تساوي 0.016 مايكروغرام. سم$^{-2}$ مما يدل على الحساسية للطريقة.

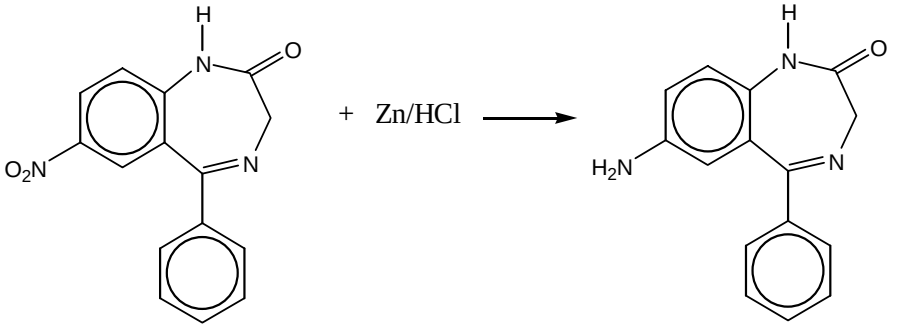
- تحليل أقراص النايترازيبام (5mg)

تم وزن محتوى عشر أقراص من النايترازيبام وبعد مزجها جيدا تم وزن ما يكافئ وزن قرص واحد، إذ تم إذابته في 20 مللتر من DMF وأكمل الحجم إلى 50 مللتر بالايثانول من اجل الحصول على محلـول النايترازيبام المختزل والمعادل. تمت معاملة 5 مللتر من هذا المحلول مع مـسحوق الخارصـين وحـامض الهيدروكلوريك المركز وكاربونات الصوديوم بإتباع الخطوات المذكورة في تحضير محلـول النايترازيبـام المختزل والمتعادل. ثم أخذت حجوم مختلفة من هذا المحلول تحتوي 5-200 مـايكروغرام/25 مـل مـن النايترازيبام ووضعت في قناني حجمية سعة 25 مللتـر وأضـيف لهـا الحجـوم المثاليـة مـن حـامض الهيدروكلوريك والنتريت والسلفاميك وميتا-امينوفينول والقاعدة وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة وتم إيجاد تركيز النايترازيبام للقرص الواحد باستخدام المنحني القياسي للنايترازيبام النقي .

النتائج والمناقشة

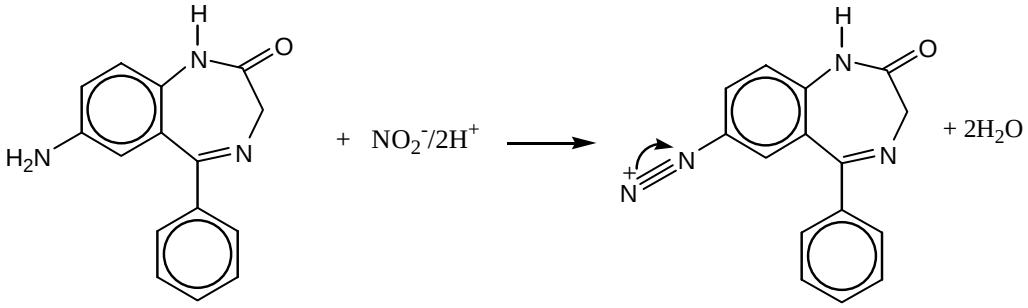
مبدأ الطريقة

يتم اختزال مجموعة النايترو في مركب النايترازيبام بواسطة الخارصين بالوسط الحامضي كما في المعادلة :



Nitrazepam — Reduced nitrazepam

ثم يتم ازوتة الناتج بمفاعلته مع نتريت الصوديوم بوسط حامضي :

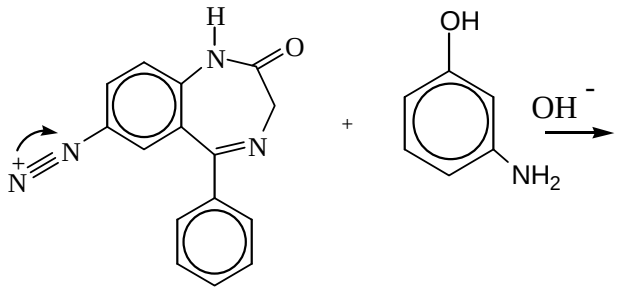


Reduced nitrazepam — Diazotized nitrazepam

وبعد إزالة الزيادة من النتريت بواسطة حامض السلفاميك :

$$HNO_2 + H_2N{-}SO_3H \longrightarrow N_2\uparrow + H_2O + H_2SO_4$$

يتم اقتران النايترازيبام المؤزوت مع كاشف ميتا-امينوفينول في وسط قاعدي معطيا صبغة ازوية ذات لون برتقالي .



صبغة ازوية ذات لون برتقالي

Diazotized nitrazepam m- Aminophenol

دراسة الظروف المثلى للتفاعل

تمت دراسة مختلف الظروف التي تؤثر في شدة امتصاص الصبغة المتكونة لغرض الحصول على أفضل الظروف وتم استخدام 100 مايكروغرام من النايترازيبام في حجم نهائي 25 مللتر في التجارب اللاحقة.

دراسة تأثير الحوامض

تمت دراسة تأثير تراكيز مختلفة لعدة حوامض ضعيفة وقوية على تكوين ملح الدايزونيوم وذلك بإضافة حجوم مختلفة من كل حامض والجدول (1) يوضح النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول 1 : تأثير أنواع وكميات الحوامض في شدة امتصاص الناتج المتكون.

Acid solution used (1N)	Absorbance / ml of acid used for diazotization					
	0.25	**0.5**	**1.0**	**1.5**	**2.0**	**3.0**
HCl	0.078	0.122	0.151	0.105	0.070	0.083
HNO_3	0.128	0.126	0.128	0.0123	0.089	0.075
H_2SO_4	0.112	0.118	0.120	0.120	0.115	0.115
H_3PO_4	0.110	0.125	0.103	0.101	0.105	0.106
CH_3COOH	0.104	0.114	0.107	0.106	0.090	0.092
HCOOH	0.106	0.108	0.097	0.088	0.046	0.048

بينت النتائج في الجدول أعلاه إن استخدام 1 مللتر من حامض الهيدروكلوريك (1 عياري) يعطي أعلى شدة امتصاص للصبغة الناتجة عند الطول الموجي 478 نانوميتر لذلك استخدم في التجارب اللاحقة.

دراسة تأثير كمية نتريت الصوديوم والزمن

تمت إضافة حجوم مختلفة من محلول 1% نتريت الصوديوم وبفترات زمنية مختلفة وقيست شدة الامتصاص لكل منها مقابل المحلول الصوري عند طول موجي 478 نانوميتر. لقد تبين من نتائج الجدول (2) إن استخدام 1 مللتر من نتريت الصوديوم وبزمن تفاعل قدره 5 دقائق يعطي أعلى شدة امتصاص لذلك تم اعتماده في التجارب اللاحقة.

الجدول 2 : تأثير كمية النتريت والزمن في شدة امتصاص الصبغة الناتجة.

ml of $NaNO_2$ solution (1%)	Abs./min. standing time					
	0	2	3	5	7	10
0.25	0.126	0.129	0.130	0.130	0.126	0.125
0.5	0.127	0.130	0.137	0.138	0.131	0.132
1.0	0.138	0.142	0.148	0.174	0.176	0.142
1.5	0.132	0.147	0.142	0.143	0.147	0.140
2.0	0.131	0.133	0.135	0.142	0.138	0.138

دراسة تأثير كمية حامض السلفاميك والزمن

إن الزيادة من حامض النتروز يتم إزالتها بواسطة إضافة محلول حامض السلفاميك (S.A.) (Bladyga and Bourne, 1999) والجدول (3) يوضح تأثير حجم حامض السلفاميك والزمن على شدة امتصاص الصبغة الناتجة .

الجدول 3 : تأثير كمية حامض السلفاميك والزمن في شدة امتصاص الصبغة الناتجة.

ml of S.A. (3%)	Abs./min. standing time					
	0	2	3	5	7	10
0.5	0.411	0.140	0.132	0.121	0.119	0.088
0.7	0.241	0.188	0.146	0.145	0.244	0.154
1.0	0.195	0.156	0.140	0.132	0.146	0.116
1.5	0.192	0.133	0.121	0.126	0.143	0.125

من الجدول (3) يلاحظ بان استخدام 0.7 مللتر من حامض السلفاميك وبزمن قدره سبع دقائق تعطي أعلى شدة امتصاص للناتج المتكون لذلك تم استخدامه في التجارب اللاحقة.

دراسة تأثير كمية محلول كاشف الاقتران

تمت دراسة تأثير كمية محلول ميتا-امينوفينول على امتصاص الصبغة، إذ تمت إضافة حجوم مختلفة من محلول ميتا-امينوفينول (0.5- 3.0 مللتر) والجدول (4) يوضح ذلك.

الجدول 4 : تأثير كمية ميتا-امينوفينول في شدة امتصاص الصبغة المتكونة.

ml of 0.5% m-Aminophenol	Abs.
0.5	0.222
1	0.235
1.5	0.235
2	0.242
2.5	0.241
3.0	0.240

من الجدول (4) يلاحظ أن استخدام 2 مللتر من الكاشف فأكثر يعطي أعلى امتصاص لذلك تم استخدام 2 مللتر كقيمة مثلى في التجارب اللاحقة .

دراسة تأثير المواد الفعالة سطحيا

تم دراسة تأثير أنواع مختلفة من المواد الفعالة سطحيا الموجبة والسالبة والمتعادلة في شدة امتصاص الناتج والجدول (5) يوضح النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول 5 : تأثير المواد الفعالة سطحيا على الامتصاصية .

Surfactant solution	Absorbance/ ml of surfactant			
	0	1	3	5
CTAB* (1×10^{-3} M)	0.242	0.182	0.166	0.150
Tritronx-100 (1%)**	0.242	0.206	0.215	0.187
SDS* (1×10^{-3} M)**	0.242	0.176	0.185	0.161

*CTAB : Cetyl trimethyl ammonium bromide .

**Tritronx-100: iso-ostyl phenoxy polyethoxy ethanol, containingapproximate 10 mole of ethylene oxide .

*** SDS : Sodium dodecyl sulphate .

بينت النتائج في الجدول أعلاه إن استخدام العوامل الفعالة سطحيا ليس لها تأثير ولذلك تـم اسـتبعادها فـي التجارب اللاحقة .

دراسة تأثير القواعد

تم دراسة تأثير أنواع مختلفة من القواعد (القوية والضعيفة) وبكميات مختلفة علـى شـدة امتـصاص الصبغة المتكونة والنتائج موضحة في الجدول (6) .

الجدول 6 : تأثير القواعد وكمياتها في شدة امتصاص الصبغة الازوية المتكونة.

Base solution used (1N)	Variable	ml of Base used							
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
NaOH	A*	0.198	0.241	0.246	0.236	0.230	0.225	0.214	0.202
	pH	2.05	8.65	11.96	12.27	12.41	12.47	12.60	12.67
KOH	A	0.196	0.201	0.236	0.235	0.233	0.231	0.226	0.222
	pH	2.18	7.83	11.11	12.02	12.33	12.45	12.58	12.66
Na_2CO_3	A	0.196	0.214	0.260	0.262	0.268	0.251	0.249	0.245
	pH	2.02	6.53	9.53	9.89	10.07	10.16	10.25	10.27
$NaHCO_3$	A	0.194	0.208	0.201	0.201	0.214	0.213	0.212	0.212
	pH	2.05	5.65	6.39	6.73	6.98	7.09	7.24	7.24
NH_4OH	A	0.185	0.201	0.211	0.212	0.212	0.213	0.20	0.198
	pH	1.84	1.91	2.04	2.26	2.87	5.16	8.61	8.74
CH_3COONa	A	0.190	0.237	0.234	0.234	0.232	0.232	0.233	0.217
	pH	2.05	3.64	4.71	4.41	4.90	5.04	5.12	5.21

* A: Absorbance .

يلاحظ من الجدول (6) إن استخدام 2.5 مللتر من 1 عياري كاربونات الصوديوم تعطي صـبغة ذات شـدة امتصاص جيدة لذلك تم استخدامها في التجارب اللاحقة.

دراسة استقرارية الصبغة الناتجة

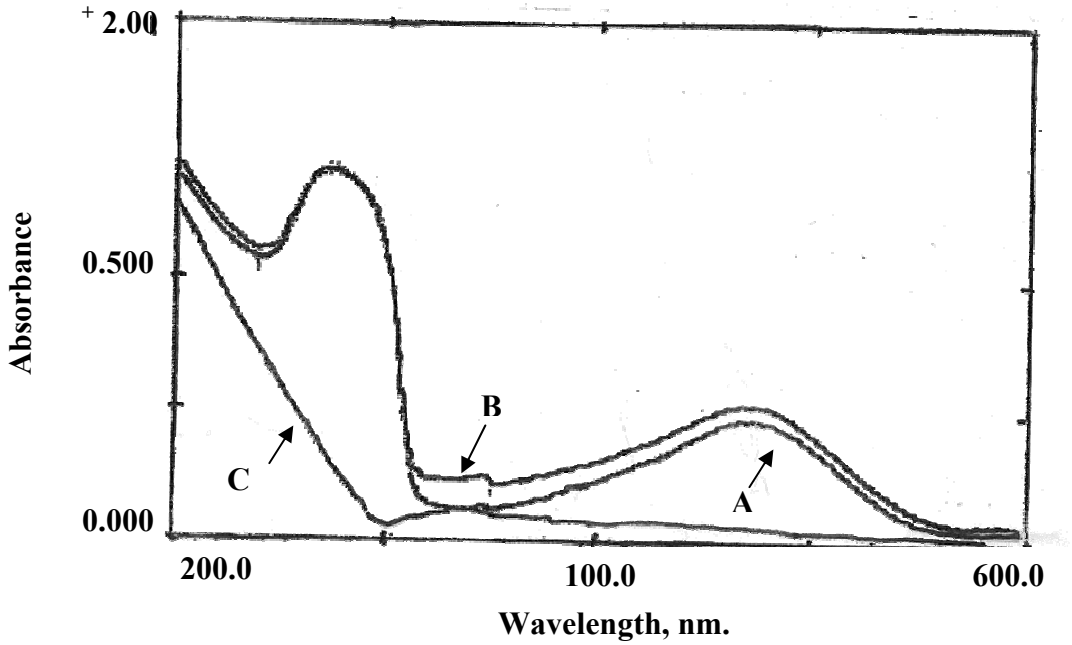
تم دراسة استقرارية الصبغة الناتجة وذلك بقياس شدة امتصاصها في فترات زمنية مختلفة وفي درجة حرارة الغرفة .إن النتائج الموضحة في الجدول (7) توضح إن الصبغة الازوية ذات استقرارية عالية ولمـدة ثلاث ساعات على الأقل وهذه الفترة تكون كافية لإجراء عدة قياسات في آن واحد .

الجدول 7 : زمن تكوين واستقرار الصبغة الازوية.

Time (min.)	Abs.
5	0.267
10	0.268
15	0.268
20	0.268
25	0.268
30	0.268
35	0.268
40	0.268
45	0.268
50	0.268
55	0.268
60	0.268
65	0.268
70	0.268
75	0.268
80	0.268
85	0.270
90	0.270
120	0.274
180	0.263

طيف الامتصاص النهائي

بعد ازوتة النايتروزيبام المختزل في درجة حرارة الغرفة باستخدام الظروف المثلى التي تـم التوصـل إليها تم رسم طيف الامتصاص النهائي لصبغة الازو الناتجة من اقتران 1 مللتر من النايترازيبام مع كاشـف ميتا-امينوفينول في وسط قاعدي وقد اظهر رسم طيف الامتصاص أعلى شدة امتصاص للصبغة عند الطول الموجي 478 نانوميتر، بينما أعطى المحلول الصوري امتصاصا ضعيفا عند هذا الطول الموجي شكل (2) .



الشكل 2 : طيف الامتصاص النهائي للصبغة الناتجة.

A: طيف الامتصاص النهائي للصبغة الناتجة من 100 مايكروغرام / 25 مللتر من النايترازيبام مقابل المحلول الصوري.

B: طيف الامتصاص النهائي للصبغة الناتجة مقابل الماء المقطر.

C: طيف الامتصاص النهائي للمحلول الصوري مقابل الماء المقطر.

دقة وتوافق الطريقة :

تم حساب دقة المنحني القياسي بتطبيق طريقة العمل المعتمدة في المنحني القياسي لثلاثة تراكيز مختلفة (180,100,20) مايكروغرام /25 مللتر ولأربع مكررات من النايترازيبام وتم حساب الخطأ النسبي والانحراف القياسي النسبي لمعرفة مدى توافقية الطريقة ، والنتائج موضحة في الجدول (8).

الجدول 8 : دقة الطريقة وتوافقها لتقدير النايترازيبام.

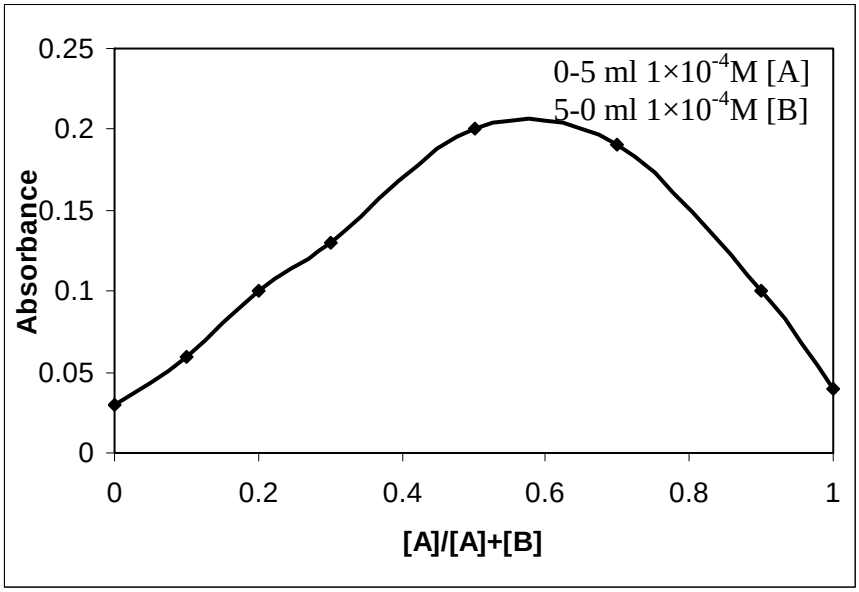
Amount of nitrazepam taken µg/25 ml	Amount of nitrazepam found µg/25ml	Relative error %*	Relative standard deviation %*
20	20.2	+1.0	±2.10
100	101.4	+1.4	±0.55
180	176.2	-2.11	±0.78

*معدل أربع قراءات.

تشير نتائج جدول (8) إن الطريقة ذات دقة وتوافقية جيدة.

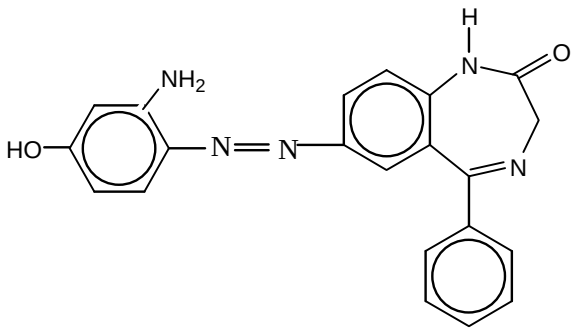
طبيعة الصبغة المتكونة

تم استخدام طريقة جوب (Hargis, 1988) في دراسة طبيعة الصبغة المتكونة، حيث تم تحضير مجموعة قناني سعة 25 مللتر وأضيف لها حجوم من 0 الى 5 مل من النايترازيبام المختزل(A) وحجوم من 5 الى 0 مل من ميتا-امينو فينول(B) بتركيز 1×10^{-4} مولاري لكل منهما، وتم قياس شدة الامتصاص للمحاليل الناتجة مقابل محاليلها الصورية عند الطول الموجي 478 نانوميتر (الشكل 3).



الشكل 3 : منحني طريقة جوب للصبغة الازوية المتكونة.

وتبين من الشكل (3) إن نسبة الاقتران الدواء: كاشف الاقتران هي 1:1 وعليه تكون الصيغة المقترحة للصبغة المتكونة بالشكل التالي:



Orange azo dye

تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية

طبقت الطريقة المقترحة في تقدير النايترازيبام على المستحضرات الصيدلانية للنايترازيبـام (أقـراص) والنتائج موضحة في الجدول (9).

الجدول 9 : تطبيق الطريقة المقترحة لتقدير للنايترازيبام في حبوب موكام.

Pharmaceutical preparation	Certified value (mg)/tablet	µg Nitrazepam present /25 ml	µg Nitrazepam found/25 ml	Recovery*(%)
Mogam (دومينا للصناعات الدوائية – سوريا)	5	20	20.6	103.0
		100	99.0	99.0
		180	182.6	101.44

* معدل 5 قراءات.

تشير النتائج إلى الدقة العالية للطريقة في تقدير النايترازيبام في الأقراص الدوائية حيث بلـغ معـدل نـسبة استرجاعه في الأقراص 101.14 % .

مقارنة الطريقة

لتقييم كفاءة طريقة الازوتة والاقتران المقترحة في تقدير النايترازيبام، أجريت مقارنـة بـين الطريقـة التحليلية المقترحة والطريقة القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني (British Pharmacopia, 1998) لتقدير النايترازيبام حيث بلغت نسبة الاسترجاع 98.344%. ودلت النتائج إن قيمـة t_{exp}. المحـسوبة هـي 2.191 وهي اقل من قيمة t الجدولية عند مستوى ثقة 95% ولستة درجات حريـة ممـا يـدل علـى إن الطريقتين لا تختلفان من حيث المصداقية، كما وجد أن قيمة F التجريبية هي 0.046 وهي اقل من قيمـة F الجدولية وعند مستوى ثقة 95% ولثلاث درجات حرية مما يدل على انـه لا يوجـد فـرق واضـح بـين الطريقتين، واعتمادا على نتائج اختباري t وF يمكن اعتبار الطريقة المقترحة ذات صلاحية تطبيق جيدة على المستحضر الصيدلاني. كذلك تم إجراء مقارنة بين بعض المتغيرات الطيفيـة للطريقـة المقترحـة لتقـدير النايترازيبام مع متغيرات لطريقة طيفية أخرى (Al-Ghabasha *et al.*, 2008) .

الجدول 10 : مقارنة الطريقة الطيفية لتقدير النايترازيبام.

Analytical parameters	Present method	*Resorcinol
pH	Basic medium	Basic medium
Temperature	R.T	R.T
Medium of reaction	Aqueous	Aqueous
Reagent	m-Aminophenol	Resorcinol
Beer`s law range(ppm)	0.2 - 8.0	0.4 - 8.0
Molar absorptivity ($l.mol^{-1}.cm^{-1}$)	17581	14900
RSD(%)	±0.55 to ±2.10	±1.075 to ±3.47
Relative error(%)	-2.11 to +1.4	+1.37 to +1.65
Sandll`s sensitivity ($\mu g.cm^{-2}$)	0.016	0.018
Colour of the product	Orange	Orange
λ max (nm)	478	485

*Al-Ghabasha *et al.*, 2008

تشير النتائج المثبتة في الجدول (10) إن الطريقتين متماثلتين إلى حد كبير والطريقة المقترحة تمتـاز بأنهـا أكثر حساسية من الطريقة المستخدمة في المقارنة .

الاستنتاج

تم تطبيق تفاعل الاقتران الازوتي في تطوير طريقة طيفية سريعة وحساسة لتقدير النايترازيبـام فـي المحلول المائي، وتعتمد الطريقة على اختزال النايترازيبام ثم ازوتته في الوسط ألحامضي ثـم اقترانـه مـع كاشف الميتا-امينوفينول في الوسط القاعدي لينتج صبغة ازوية ذائبة في الوسط المائي ذات لـون برتقـالي ويقاس أقصى امتصاصية لها عند الطول الموجي 478 نانوميتر وقدرت بهذه الطريقة كميات مايكروغرامية من النايترازيبام تراوحت بين 5 و200 مايكروغرام /25 مللتر.

أشارت النتائج إلى إن الطريقة ذات دقة وتـوافق جـيدتين اذ بلغ الخطأ النسبي بين 2.11- و1.4+% والانحراف القياسي النسبي اقل من 2.10±% . بلغـت قيمـة الامتـصاصية المولاريـة 17581.25 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة ساندل 0.016 مايكروغرام.سم$^{-2}$ مما يشير إلى إن الطريقـة ذات حـساسية عاليـة وطبقت هذه الطريقة بنجاح في تقدير النايترازيبام في الأقراص الدوائية.

المصادر العربية

الغريري، تماضر عباس حمودي (2004). تطوير طرائق طيفية لتقدير الكلوروفينيكول في مستحضرات صيدلانية، رسالة ماجستير، جامعة الموصل، ص 35-38.

المصادر الأجنبية

Al-Ghabsha, T. S.; Azzouz, A., S.; Obed-Aga, A. N. (2008). Spectrophotometric determination of nitrazepam using resorcinol as coupling reagent. *J. Edu. Sci*., **21**(1), 147-162.

Arvind, K.M.; Kamal Akar, D.G. (1985). Polarographic assay of nitrazepam formulations, *Analyst*, **110**, 1105-1109 .

British Pharmacopia on CD-ROM . (2002). General Medical Council , 3rd edn, London.

Baltazar , C. ; Carla, G. (2000) . Study of partition of nitrazepam in bile salt micelles and the role of liecithin, *Pharm. Sci*., **87** (495), 146-151.

Bladyga, J.; Bourne, J.R. (1999). "Turbulent Mixing and Chemical Reactions", John Wiley and Sons, Inc., New York, 644 .

Castro, D.; Cameiro, B.; Guimaes, P. ; Lima, C. (2001). Role of lecithin, *J. Pharm. Biom. Anal.*, **24**, 595-602.

DeBruyne, M. M.; Sinnema, A. ; Verwrij, A. M. (1984). Hydrolysis of clonazepam, flunitrazepam and nitrazepam by hydrochloric acid. Identification of some additionl products., *Forensic Sci. Int.*, **24**, 125-135.

Davidson, A.G. ; Lia, Hw. (1989). Difference spectrophotometric assay of nitrazepam in tablet formulations, *J. Pham Pharmacol*., **41**, 63-65 .

EL- Brashy, A.; Aly, F.A. (2005). Determination of 1,4-benzodiazepines in drug dosage forms by difference spectrophotometry, *Microchim. Acta* , **110**, 55-60.

EL- Mubarak, A. H. (2000). High performance liquid chromatographic separation of some psychotherapeutic benzodiazepines with chemometrical optimiz-ation, King Fahd University of Petroleum and Minerals, pp. 8-13 .

Greenhow , E. J. ; Lodipo, O. (2004). Determination of some 1,4- benzodiazepam and their tablet formulations by a catalymetric thermometric method, *Anal. Chem*., **32**, 485-489.

Hargis, L. G. (1988). "Analytical Chemistry". Prentice- Hall,Inc., New Jersey, 427p.

Inoue, T.; Niwaguchi, T. (1985). Determination of nitrazepam and it`s main metabolites in urine by thin-layer chromatography and direct densitometry , *J. Chromatogr*,**339**, 163-169 .

Kevin, C.H. (2008). Determination of flunitrazepam and Nitrazepam in beverage samples by liquid chromatography with dualelectrode detection using a carbon fiber electrode, *J. Solide State Eectrochemistry Article*, **12** (10), 1317-1324 .

Kevin, C.H.; Gemma, C., S. ; John, P. H., (2006). Voltammetric behavior of nitrazepam and it`s determination in serum using liquid chromatography with redox mode dual electrode detection , *Anal. Chem*., **78** (2), 416-423 .

Kangas, L.; Kanto, J.; Siirtola, T. (1977). Cerebrospinal fluid concentrations of nitrazepam in man, *Acta Pharm. Toxicol*. (Copenh), **41**, 74-79 .

Monzon, L. M. A. ; Yudi, L. M. (2001). Voltammetric analysis of lipophilicity of benzodiazepine derivatives at the water –1,2-dichloroethane interface, *J. Electroonal. Chem*., **495**, 146-151.

Manual, C.; Manuel, S. ; Doloress, P. (1992). Kinetic determination of nitrazepam in tablets, *Anal. Lett*. , **25**, 1261-1274.

Subhi, M. J. (2004). The use of charge transfer complex formation reaction in the spectrophotometric determination of some amines and drug compounds. Ph.D., Thesis, University of Mosul, 48-71.

WWW.wikipedia, The free encyclopedia, (2008) .

Welk, B. (1997). Determination of benzodiazepine – 1,4 derivatives in biological material. Part 1. An attempt to apply high–performance liquid chromatogra-phy (HPLC) in the determination of diazepam and nitrazepam in human serum., *Acta Pol Pharm.*, **53**, 3-6.

Yasui, M.; Kato, A.; Kanemasa, T.; Murata, S.; Nishitomi, K.; Koike, K.; Tai, N.; Shinohara S.; Tokomura, M.; Horiuchi, M.; Abe, K. (2005). Pharma-cological profiles of benzodiazepinergic hypuotics and correlations with receptor subtypes, Wikipedia, the Free Encyclopedia, and references therein.