

## دراسة تحليلية لتحديد الافلوكساسين بحالته النقية و في مستحضراته الصيدلانية باستخدام الكاشف 2-امينو-6-نترو بنزو ثيازول بالطريقة الطيفية الضوئية

الدكتور مالك عقدة\*

الدكتور شهيد مصطفى\*\*

محمد شريتح\*\*\*

(تاريخ الإيداع 31 / 7 / 2016. قُبِلَ للنشر في 24 / 10 / 2016)

### □ ملخص □

طُورت طريقة طيفية سريعة ، اقتصادية و سهلة التطبيق، دقيقة و حساسه لتحديد الافلوكساسين (OFX) في حالته النقية وفي مستحضراته الصيدلانية باستخدام كاشف 2-امينو-6-نترو بنزو ثيازول (ANB). تعتمد هذه الطريقة على تشكيل معقد أصفر برتقالي اللون عند  $pH = 5.2$ ، و درجة الحرارة  $80 \pm 5$  °C خلال زمن قدره خمس دقائق. يمتلك المعقد المتشكل قمة امتصاص أعظمية عند طول الموجة 440nm . كانت العلاقة ما بين الامتصاصية وتركيز (OFX) طردية خطية وتحقق قانون ببير ضمن مجال التراكيز  $1.80-86.72 \mu g/mL$ ، و بانحراف معياري نسبي مؤوي لم يتجاوز  $\pm 2.54\%$  مع معامل ترابط 0.999، وبلغ معامل الامتصاص الجزيئي  $(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$   $3.952 \times 10^3$ . استخدمت هذه الطريقة بنجاح في تحديد الافلوكساسين بشكله النقي وفي المستحضرات الصيدلانية وتم التحقق من صحة النتائج إحصائياً ، ودلت النتائج على أن الطريقة المطورة ذات دقة وحساسية عاليتين.

الكلمات المفتاحية: تحديد الافلوكساسين ، تشكيل معقد، تحليل طيفي ضوئي .

\* أستاذ - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

\*\* أستاذ - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

\*\*\* طالب دراسات عليا (دكتوراه) - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

## Analytic Study for the Determination of Ofloxacin in Pure and Pharmaceutical Formulation using Reagent 2-amino-6-nitrobenzothiazole by Visible Spectrophotometric Method

Dr. Malek M S Okdeh\*  
Dr. Chahid Moustapha\*\*  
Mohammad Shraitah\*\*\*

(Received 31 / 7 / 2016. Accepted 24 / 10 / 2016)

### □ ABSTRACT □

A Simple, accurate and highly sensitive spectrophotometric method have been developed for the rapid determination of Ofloxacin (OFX) in pure form and pharmaceutical formulations. The visible spectrophotometric method was based on the formation of a Orange Yellow colored complex between the (OFX) and 2-amino-6-nitrobenzothiazole (ANB) at pH 5.2 and  $80 \pm 5$  °C in 5 min., and  $\lambda_{\max}$  at 440 nm. The effects of analytical parameters on the reported system were investigated. Beer's law was obeyed in the concentration range of 1.80-86.72  $\mu\text{g/mL}$ , with a percentage relative standard deviation not exceed  $\pm 2.54$  and the molar absorptivity coefficients was  $3.952 \times 10^3$  (L/mol.cm). Interferences of the other ingredients and excipients were not observed, the results showed that the developed method with the accuracy and sensitivity highs.

**Keywords :** Determination Ofloxacin, Complex formation, Spectrophotometry.

---

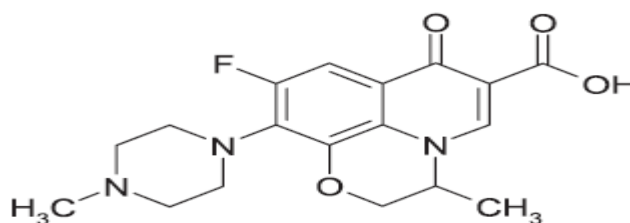
\* Professor, Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Tishreen University , Lattakia, Syria

\*\* Professor, Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Tishreen University , Lattakia, Syria

\*\*\* Postgraduate Student, Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.

**مقدمة:**

يتصف الافلوكساسين بأنه مضاد حيوي واسع الطيف، ينتمي الى زمرة الفلوروكينولون الجيل الثاني، يعرف اسمه التجاري Floxin. يستخدم كمضاد للجراثيم وفي علاج أنواع معينة من الالتهابات البكتيرية، و يعتقد أنه يعمل على تثبيط إنزيم الحمض الريبيّ النُّويّ المنزوع الأوكسجين DNA جيراز (اللازم لتكرار الحمض النووي) وبالتالي يمنع تخليقه [1,2,3,4] و هو مسحوق بلوري أبيض عديم الرائحة، يذوب في الماء و DMSO و لدرجة ضعيفة في الميثانول و في كلوريد الميثيلين، صيغته الكيميائية المجملة  $C_{18}H_{20}F_1N_3O_4$  ووزنه الجزيئي (361,368 g/mol) أما صيغته المفصلة فهي:



وتسميته النظامية هي:

9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyridol[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic.

تُشرت العديد من الدراسات المتعلقة بتحديد OFX في كل من حالته النقية و في مستحضراته الصيدلانية السائلة فُحِّد بالطريقة الكهربية الشعيرية [5,6,7] ، و قام سرفيدا و اخرون على تحديده بطريقة HPLC [8,9,10] ، في حين طبق باتال و زملائه طريقة التحليل الطيفي لتحديد الاوفلوكساسين وذلك بالاعتماد على تشكيل معقد وردي اللون بين (OFX) و حمض الستريك مع بلا ماء حمض الخل، يمتلك قمة امتصاص أعظمية عند طول الموجة 552nm [11]. و طبق عيسى هذه الطريقة، لتحديد (OFX) باستخدام الكواشف برومو فينول (BPB) و برومو ثايمول (BTB) و البروموكريزول الأرجواني (BCP) [12] و ايضاً قام ساستري بتحديد استخدام الكواشف Tropaeolin 000 و Supracene Violet 3B و Ce(IV)-MBTH [13,14]، كما قام هوسكير و زملائه بتطبيق الطريقة الطيفية باستخدام الكاشف N- bromosuccinimide [15] ، في حين قام براشينث و رفاقه بتحديد وفق الطريقة الطيفية باستخدام الكواشف ابروكروم الأسود والبرتقالي و 3 - ميثيل - 2- بينثوزولانون هيدرازون (MBTH) [16]، واستخدمت طريقة التحليل الطيفي المتزامن لتحديد الافلوكساسين في المستحضرات الصيدلانية [17-22]

**أهمية البحث وأهدافه:**

هدفت هذه الدراسة إلى تحديد الافلوكساسين في حالته النقية وفي مستحضراته الصيدلانية بطريقة طيفية جديدة سهلة وسريعة عن طريق تشكيل معقد بين الافلوكساسين (OFX) و الكاشف 2-امينو-6- نثرو بنزوثيرازول (ANB)، وهو كاشف عضوي لم يستخدم من قبل في تحديد الافلوكساسين، ثم قياس امتصاصية المعقد الملون في المجال الطيفي المرئي. تتميز هذه الطريقة بأنها سهلة وبسيطة وذات دقة وحساسية جيدتين ويمكن تطبيقها بدون أية تداخلات مع السواغات الداخلة في تركيب المستحضرات الصيدلانية.

**طرائق البحث ومواده :****1-الأجهزة:**

أُستخدِمت في هذا البحث الأجهزة التالية: جهاز تحليل طيفي UV-Vis -Spectrophotometer كوري الصنع نموذج (SP3000 OpTMA) ثنائي الحزمة مزود بحاسوب وطابعة، يعمل هذا الجهاز ضمن مجال 190-1100 nm، ومزود بحجيرات من الكوارتز بعرض 10mm - ميزان تحليلي من شركة Sartorius الألمانية نموذج 2474 حساسيته 0.1 mg - مقياس pH رقمي إنتاج شركة Sartorius نموذج PB-11 مزود بمسرى زجاجي جمعي مع مجس حراري - ماصات آلية متغيرة الحجم ذات ساعات 10µL و 1000µL و 5000µL من شركة Ependorf و ماصات ودوارق زجاجية حجمية.

**2- المواد والمذيبات المستخدمة:**

تتصف جميع المواد المستخدمة في هذا البحث بأنها من النوع التحليلي عالي النقاوة، تم الحصول على الافلوكساسين من شركة افنتس للصناعات الدوائية، الهند.

**3-تحضير المحاليل العيارية الرئيسية:****1-3-المحاليل المنظمة:**

حُضرت المحاليل المنظمة الآتية تبعاً للمراجع [ 23,24,25]:

**مُنظّم البريتون:** يحضر محلول مُنظّم بريتنوني بتركيز 0.2M وذلك بإذابة 12.37gr من حمض البور في ماء ثنائي التقطير، و يضاف إليه 13.72ml من حمض الفوسفور المركز و 11.44ml من حمض الخل و إتمام الحجم بماء ثنائي التقطير في دورق عياري سعة 1 لتر. حُضرت من المحلول السابق نفسه سلسلة من محاليل بريتنون المنظمة تتراوح قيمة pH الوسط فيها ما بين ( 2.0-12.0 ) عبر أخذ 50ml من محلول مُنظّم بريتنوني و إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم ذي التركيز 0.2M حتى الوصول إلى قيمة pH المطلوبة وذلك في دورق حجمي سعة 100ml، و يكمل الحجم حتى اشارة التدرج بماء ثنائي التقطير.

**مُنظّم السترات:** يحضر محلول مُنظّم السترات بتركيز 0.2M وذلك بإذابة 42.03gr من حمض السيتريك في ماء ثنائي التقطير في دورق سعة 1 لتر. يؤخذ من هذا المحلول 50ml في دورق سعة 100ml، و تُضبط قيمة PH المحددة بهيدروكسيد الصوديوم 5M، ثم يُكمل الحجم حتى اشارة التدرج بماء ثنائي التقطير.

**مُنظّم البورات:** حُضرت محاليل عدة من مُنظّم البورات وذلك بإضافة الكمية المناسبة من محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيزه 0.1M إلى 50ml من مزيج يحتوي على حمض البور و كلوريد البوتاسيوم تركيز كل منهما 0.1M، ثم مدد المحلول حتى 100ml بالماء ثنائي التقطير.

**مُنظّم النشادري:** حُضرت محاليل عدة من مُنظّم النشادري، في دورق سعة 100ml وذلك بإضافة الكمية اللازمة من محلول هيدروكسيد الأمونيوم 0.1M إلى 25ml من محلول كلوريد الأمونيوم تركيزه 0.1M، ثم أكمل الحجم حتى اشارة التدرج بماء ثنائي التقطير.

**3-2-محلول الافلوكساسين العياري:**

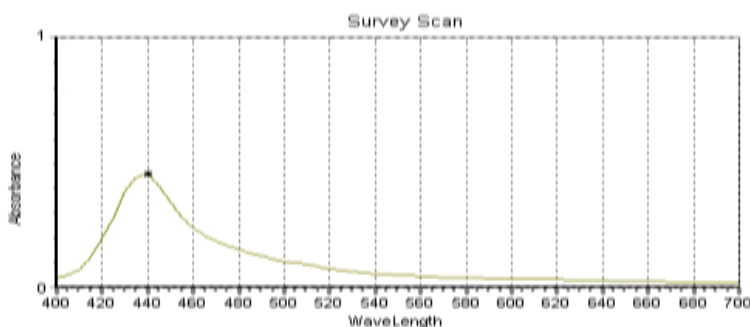
حُضر محلول عياري بتركيز ( $1.10^{-3}M$ ) وذلك عن طريق اذابه 36.13 mg من مادة الافلوكساسين النقية في كمية من DMSO، ثم يُكمل الحجم بالمذيب المستخدم حتى اشارة التدرج في دورق حجمي سعة 100ml .

**3-3-3- محلول الكاشف 2-امينو-6- نثرو بنزو ثيازول:**

حضر محلول عياري للكاشف (ANB) بتركيز ( $1.10^{-3}M$ ) عن طريق إذابة وزن مناسب للكاشف في DMSO ثم يُكمل الحجم بالمذيب المستخدم حتى إشارة التدرج في دورق حجمي سعة 100ml.

**النتائج والمناقشة:**

يشكل الأفلوكساسين (OFX) مع الكاشف (ANB) معقداً ثابتاً يمتلك قمة امتصاص عظمى عند  $\lambda_{max} = 440nm$  مقارنة بمحلول الكاشف الذي يمتلك امتصاصية مهملة علمياً كما هو موضح في الشكل (1).



شكل (1): طيف الامتصاص لمعقد (OFX-ANB) من أجل تركيز  $43.36\mu g/ml$  للأفلوكساسين مقابل المحلول المقارن (الشاهد)

يُحضر المحلول المقارن أي محلول الكاشف وفق طريقة التحضير نفسها المتبعة للمعقد المدروس عدا المركب الدوائي علماً أن التمديد يتم بالمذيب (DMSO) المستخدم.

درست العوامل و الشروط المثلى اللازمة في تشكل معقد بين الأفلوكساسين و كاشف ANB و ذلك بتغيير إحدى القرائن في كل مرة وتثبيت القرائن الأخرى، و لتحقيق ذلك أُجريت الدراسات الآتية:

**1-دراسة تأثير كل من درجة الحرارة و زمن التسخين في تشكيل المعقد (OFX-ANB):**

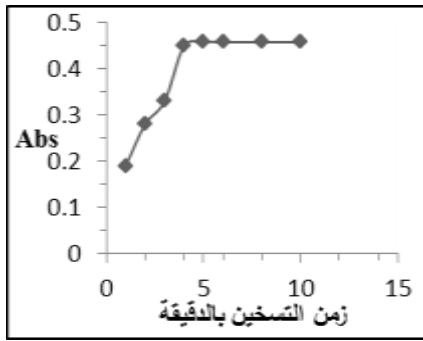
تم تحديد درجة الحرارة المثلى لتشكيل المعقد، حيث لُحظ أن التعقيد التام للمعقد يتحقق عند الدرجة  $80\pm 5^\circ C$  (الشكل 2). حُضرت لذلك سلسلة دوارق حجمية سعتها 10ml، و نقل إلى كل منها 1.2ml من الأفلوكساسين بتركيز  $10^{-3}M$  و 2.4ml من كاشف 2-امينو-6- نثرو بنزو ثيازول بتركيز  $10^{-3}M$  و بوجود 1ml من محلول المنظم البريتوني عند  $pH=5.2$ . أُكمل الحجم حتى إشارة التدرج بالمذيب المستخدم، ثم سُخن كل محلول من محاليل المعقد المتشكل في حمام مائي عند درجات حرارة مختلفة. قيست امتصاصية المحاليل المسخنة بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره بـ  $(25\pm 2)^\circ C$  بالمقارنة مع محلول الشاهد المحضر بالطريقة نفسها عدا المركب الدوائي OFX عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm.

رُسمت العلاقة ما بين قيم الامتصاصية العظمى للمعقد المتشكل عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm بدلالة درجة الحرارة، وتم الحصول على المنحني الموضح في الشكل (2). يُلاحظ من هذا الشكل أن التسخين لدرجة الحرارة  $80\pm 5^\circ C$  تعطي أفضل امتصاصية و ثبات للمعقد المتشكل OFX-ANB عند طول موجة الامتصاص الأعظمي للمعقد 440nm.

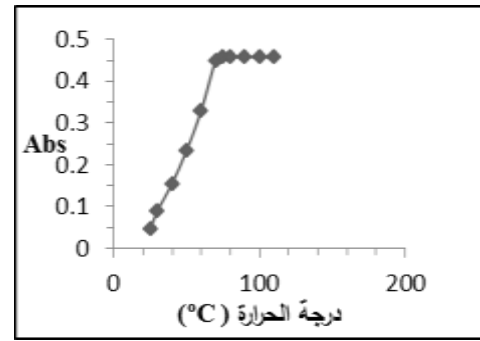
دُرس تأثير زمن التسخين عند درجة الحرارة  $80^{\circ}\text{C}$  في امتصاصية المعقد OFX-ANB، حُضرت لذلك سلسلة محاليل عيارية للمعقد وفق الطريقة السابقة نفسها، ثم تُثبتت درجة حرارتها عند درجة الحرارة  $80^{\circ}\text{C}$  بوساطة حمام مائي و عُرضت لأزمنة تسخين مختلفة عند درجة الحرارة المذكورة. قيست الامتصاصية للمحاليل المسخنة بأزمنة مختلفة بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره بـ  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$  بالمقارنة مع محلول الشاهد المحضر بالطريقة نفسها عدا المركب الدوائي OFX عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440\text{ nm}$ .

رُسمت العلاقة ما بين قيم الامتصاصية العظمى للمعقد المتشكل عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440\text{ nm}$  بدلالة زمن التسخين، وتم الحصول على المنحني الموضح في الشكل (3).

يُلاحظ من هذا الشكل أن التسخين لمدة 5 دقائق يعطي أفضل امتصاصية و ثبات للمعقد المتشكل OFX-ANB عند طول موجة الامتصاص الأعظمية للمعقد  $440\text{ nm}$ .



شكل (3): تأثير زمن التسخين عند درجة الحرارة  $80^{\circ}\text{C}$  في امتصاصية المعقد عند  $\lambda_{\text{max}}=440\text{nm}$  من أجل تركيز ثابت من الأوفلوكساسين  $43.36\mu\text{g/ml}$

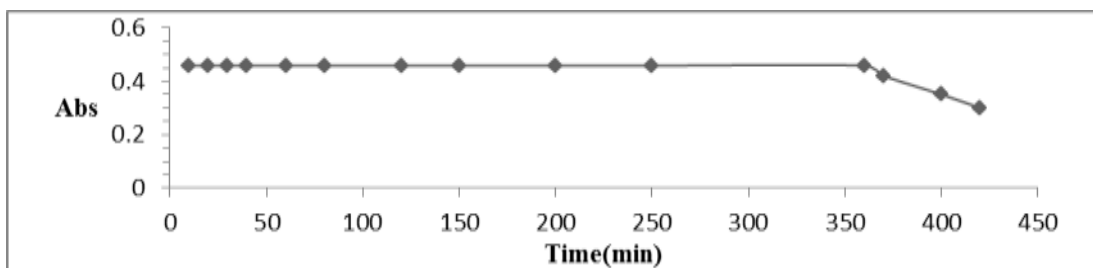


شكل (2): تأثير درجة الحرارة في امتصاصية المعقد عند  $\lambda_{\text{max}}=440\text{nm}$  من أجل تركيز ثابت من الأوفلوكساسين  $43.36\mu\text{g/ml}$

## 2- دراسة تأثير الزمن في ثباتية المعقد (OFX-ANB):

دُرس تأثير الزمن في ثباتية المعقد حيث أخذ دورق حجمي سعة  $10\text{ ml}$ ، نُقل إليه  $1.2\text{ mL}$  من محلول الافلوكساسين بتركيز  $10^{-3}\text{ M}$  و  $2.4\text{ mL}$  من محلول كاشف (ANB) ذي تركيز  $10^{-3}\text{ M}$  و إضافة حجم ثابت مقداره  $1\text{ ml}$  من محلول المُنظم البريتوني تركيزه  $0.2\text{ M}$  عند  $\text{pH}=5.2$  وأكمل الحجم حتى إشارة التدرج بالمذيب المستخدم، سُخن المحلول لمدة خمس دقائق عند درجة الحرارة  $80^{\circ}\text{C}$  حتى ثبات المعقد المتشكل (OFX-ANB)، قيست امتصاصية محلول المعقد عند أزمنة مختلفة بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره بـ  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$  عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440\text{ nm}$ .

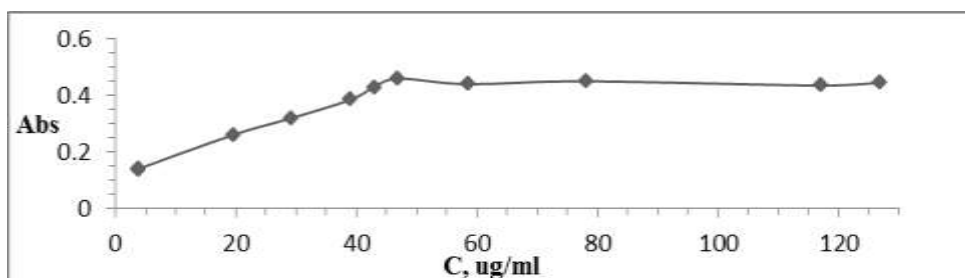
رُسمت العلاقة ما بين قيم الامتصاصية العظمى للمعقد المتشكل عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440\text{ nm}$  بدلالة الزمن، وتم الحصول على المنحني الموضح في الشكل (4)، الذي يبين ان زمن ثبات المعقد هو 6 ساعة عند درجة حرارة المختبر المقدره بـ  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ .



شكل (4): تأثير الزمن في ثباتية المعقد OFX-ANB عند  $\lambda_{max} = 440nm$  من أجل تركيز ثابت من الافلوكساسين  $43.36\mu g/ml$

### 3- دراسة تأثير تركيز الكاشف:

دُرِس تأثير تغير تركيز الكاشف (ANB) في امتصاصية المعقد المتشكل، بثبات حجم و قيمة pH محلول المُنظَّم البريتوني و بوجود تركيز وحجم ثابت من المادة الدوائية (OFX) ضمن مجال لتركيز الكاشف تراوح ما بين  $(3.9-126.75 \mu g/ml)$ ، حيث أُخذت سلسلة دوارق معايرة بسعة 10mL يحتوي كل منها على  $43.36\mu g/ml$  من OFX و 1ml من محلول المُنظَّم البريتوني ذي قيمة  $pH=5.2$  و تراكيز مختلفة متزايدة من الكاشف (ANB) ثم أُعمل الحجم بالمذيب المستخدم حتى إشارة التدرج. سُخنت المحاليل لدرجة الحرارة  $80^\circ C$  لمدة خمس دقائق. قيسَت بعدها امتصاصية المحاليل بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره بـ  $(25 \pm 2)^\circ C$  عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440nm$ ، ثم رُسمت العلاقة بين تغيرات امتصاصية المعقد المتشكل بدلالة تغير تركيز الكاشف (ANB). يُلاحظ من الشكل (5) أن تركيز  $46.80\mu g/ml$  من تركيز الكاشف هو التركيز الأمثل لأعلى قيمة امتصاص .

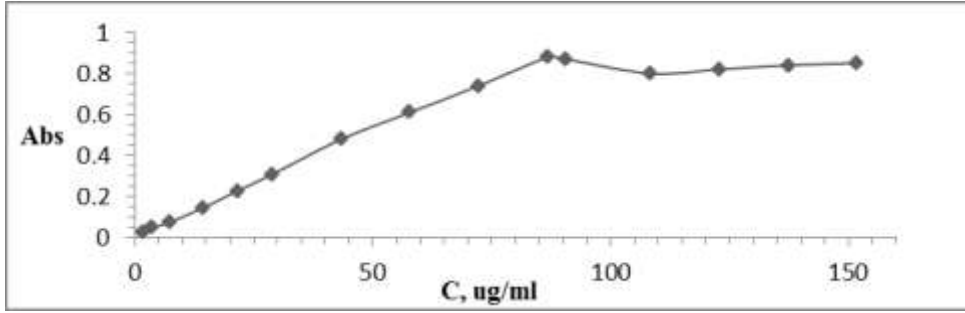


شكل (5): تأثير تركيز الكاشف في امتصاصية المعقد OFX-ANB عند  $\lambda_{max} = 440nm$

من أجل تركيز ثابت من الافلوكساسين  $43.36\mu g/ml$

### 4- دراسة تأثير تركيز المادة الدوائية:

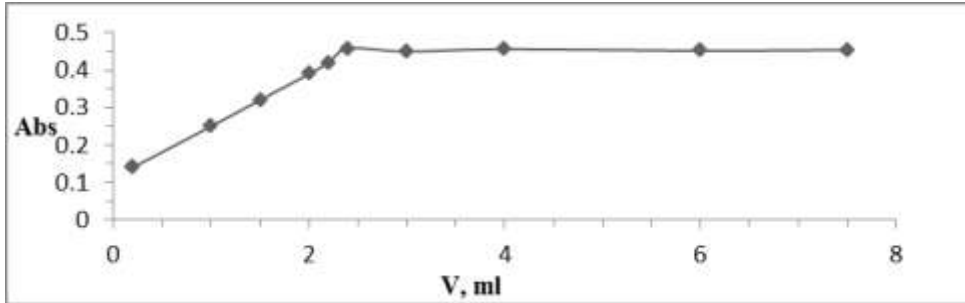
دُرِس تأثير تغير تركيز المادة الدوائية (OFX) في امتصاصية المعقد المتشكل، بثبات حجم و قيمة pH محلول المُنظَّم البريتوني و بوجود تركيز وحجم ثابت من الكاشف (ANB) ضمن مجال لتركيز المادة الدوائية  $(1.8-151.77 \mu g/ml)$ ، حيث أُخذت سلسلة دوارق معايرة بسعة 10mL يحتوي كل منها على  $46.8\mu g/ml$  من (ANB) و 1ml من محلول مُنظَّم البريتوني ذي قيمة  $pH=5.2$  و تراكيز مختلفة متزايدة من المادة الدوائية (OFX) ثم أُعمل الحجم بالمذيب المستخدم حتى إشارة التدرج. سُخنت المحاليل لدرجة الحرارة  $80^\circ C$  لمدة خمس دقائق. قيسَت بعدها امتصاصية المحاليل بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره بـ  $(25 \pm 2)^\circ C$  عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440nm$ ، ثم رُسمت العلاقة بين تغيرات امتصاصية المعقد المتشكل بدلالة تغير تركيز (OFX). يُلاحظ من الشكل (6) أن تركيز  $86.72\mu g/ml$  من تركيز (OFX) هو التركيز الأمثل لأعلى قيمة امتصاص .



شكل (6): تأثير تركيز الافلوكساسين في امتصاصية المعقد OFX-ANB عند  $\lambda_{max} = 440nm$  من أجل تركيز ثابت من الكاشف (ANB)  $46.80\mu g/ml$

### 5- دراسة حجم الكاشف الانسب:

أُجريت دراسة تأثير حجم الكاشف المضاف في امتصاصية المعقد (OFX-ANB) حيث أُخذت سلسلة دوارق معايرة بسعة 10mL، يحتوي كل منها على حجم ثابت من محلول الافلوكساسين مقداره 1.2ml بتركيز  $10^{-3}M$  و 1ml من محلول مُنظم ذي قيمة pH=5.2 و حجوم مختلفة و متزايدة من محلول كاشف (ANB) بتركيز  $10^{-3}M$  ضمن مجال (0.2-7.5ml)، ثم أُثمل الحجم بالمذيب المستخدم حتى إشارة التدرج. سُخنت المحاليل لدرجة الحرارة  $80^\circ C$  لمدة خمس دقائق. قيس بعدها امتصاصية المحاليل بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره ب  $(25 \pm 2)^\circ C$  عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm، ثم رُسمت العلاقة بين تغيرات امتصاصية المعقد المتشكل بدلالة تغير حجم الكاشف المضاف. يُلاحظ من الشكل (7) أن حجم 2.4mL من محلول الكاشف هو الحجم الأمثل لأعلى قيمة امتصاص.



شكل (7): تأثير حجم محلول الكاشف في امتصاصية المعقد OFX-ANB عند  $\lambda_{max} = 440nm$  من أجل تركيز ثابت من الافلوكساسين  $43.36\mu g/ml$

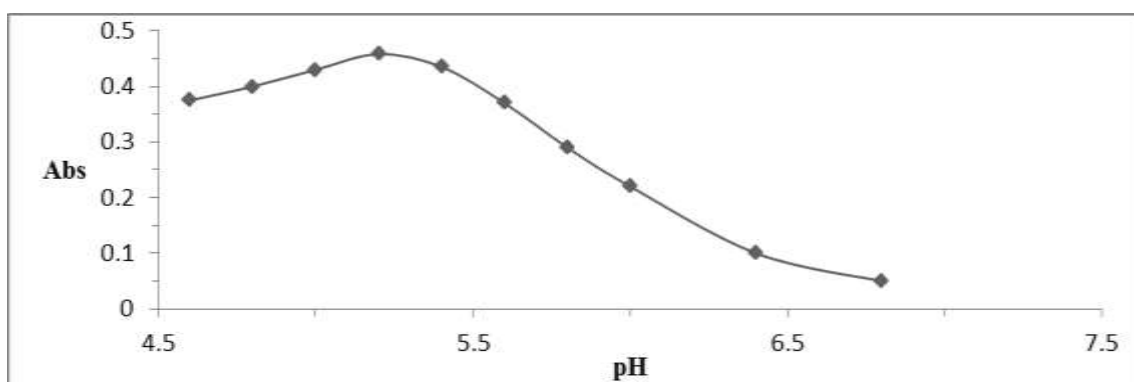
### 6- تأثير pH المحلول المنظم :

دُرس تأثير بعض المحاليل المنظمة (مُنظم برييتوني ، مُنظم السترات ، مُنظم البورات و مُنظم النشادري) في تشكيل معقد (OFX-ANB). لُحظ أن هذه المحاليل المنظمة أعطت نتائج متقاربة من حيث طول موجة الامتصاص الأعظمي و قيمة الامتصاصية عندها و ثبات المعقد، لكن محلول المُنظم البريتوني كان الأفضل بين تلك المحاليل المنظمة المستخدمة، لأنه أعطى أفضل امتصاصيات عند طول موجة الامتصاص الأعظمية للمعقد، لذلك حُضرت سلسلة من المحاليل المنظمة من مُنظم برييتوني ضمن مجال قيم تراوح ما بين (pH=4.6-7) رُسمت طيروف الامتصاص المرئي للمعادن المتشكلة بين (OFX-ANB) بوجود تركيز ثابت من الافلوكساسين  $43.36\mu g/ml$  بأخذ



1.2ml من محلول الدواء  $10^{-3}M$  وإضافة حجم ثابت من محلول الكاشف (ANB) قدره 2.4ml بتركيز  $10^{-3}M$ ، وإضافة حجم ثابت مقداره 1ml من محلول المُنظم البريتوني تركيزه 0.1M، ثم إكمال الحجم بالمذيب المستخدم حتى إشارة التدرج، و التسخين لدرجة الحرارة  $80^{\circ}C$  لمدة خمس دقائق. أُحظ تشكل معقد أصفر برتقالي اللون له قمة امتصاص أعظمية عند 440nm، لذا قيس امتصاصية المعقد الملون المتشكل في كل محلول بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره  $(25 \pm 2)^{\circ}C$  مقابل محلول الشاهد المحضر بالطريقة نفسها والخالي من المركب الدوائي (ANB).

رُسمت العلاقة بين تغيرات الامتصاصية للمعقد المتشكل عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm لكل معقد بدلالة قيمة pH المحلول المُنظم، تبين أن القيمة المثالية هي عند (pH=5.2) من أجل أفضل قيمة امتصاص أعظمي للمعقد (OFX-ANB) كما هو موضح في الشكل (8).

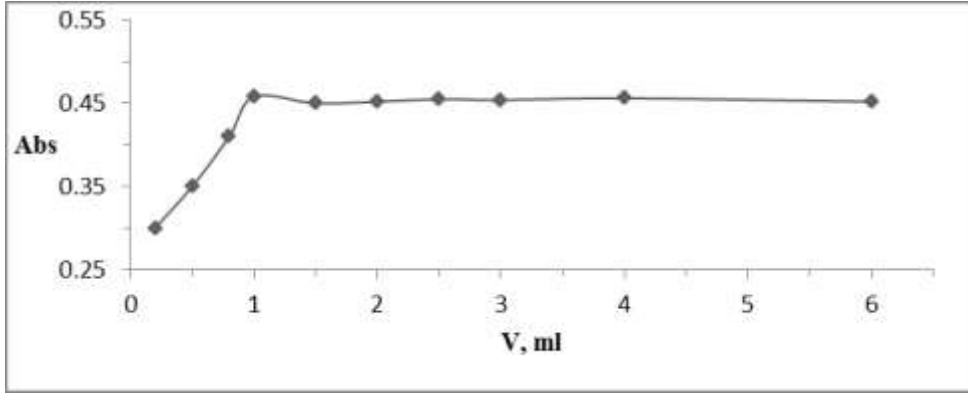


شكل (8): تأثير pH الوسط في امتصاصية المعقد OFX-ANB عند  $\lambda_{max} = 440nm$  من أجل تركيز ثابت من الافلوكساسين  $43.36\mu g/ml$

#### 7- تأثير حجم المحلول المُنظم:

دُرُس تأثير الحجم المضاف من محلول المُنظم البريتوني عند pH=5.2 ضمن مجال (0.2-6.0ml) في امتصاصية المعقد (OFX-ANB)، حُضرت سلسلة محاليل عيارية في دوارق حجمية سعتها 10ml، وُضع في كل منها حجم ثابت من محلول الافلوكساسين مقداره 1.2ml بتركيز  $10^{-3}M$  و حجم ثابت مقداره 2.4ml من محلول الكاشف ANB بتركيز  $10^{-3}M$  و حجوم متغيرة من محلول المُنظم البريتوني عند pH=5.2، ثم أُكمل الحجم حتى إشارة التدرج بالمذيب المستخدم، و سُخن لدرجة الحرارة  $80^{\circ}C$  لمدة خمس دقائق، قيس امتصاصية محاليل المعقد المتشكل بعد تبريدها إلى درجة حرارة المختبر و المقدره بـ  $(25 \pm 2)^{\circ}C$  عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm.

رُسمت العلاقة ما بين قيم الامتصاصية العظمى للمعقد المتشكل بدلالة حجم المحلول المُنظم المضاف عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm، فتم الحصول على المنحني الموضح في الشكل (9). تبين أنه عند إضافة حجم من المحلول المُنظم مقداره 1ml يتم الحصول على امتصاصية عظمى بالنسبة للمعقد (OFX-ANB) عند الحجم المذكور.



شكل (9): تأثير حجم المحلول المُنظم البريتوني (pH=5.2) في امتصاصية المعقد OFX-ANB عند

$\lambda_{max} = 440nm$  من أجل تركيز ثابت من الافلوكساسين  $43.36\mu g/ml$

بناءً على النتائج السابقة لُخصت الشروط المثلى اللازمة لتشكيل معقد (OFX-ANB) و إجراء قياساته الطيفية

الأخرى في الجدول (1) :

جدول (1) الشروط المثلى لتشكيل معقد (OFX-ANB)

محضر وفق طريقة تحضير المحلول المدروس نفسها بتركيز $10^{-3}M$	المحلول المقارن (الشاهد): الكاشف (ANB)
محلول مُنظم بريتوني عند pH=5.2	pH المحلول المُنظم:
86.72ug/ml	تركيز المادة الدوائية OFX:
46.8ug/ml	تركيز الكاشف ANB :
1ml	حجم المحلول المُنظم 0.1 M:
2.4 ml	حجم محلول كاشف ANB :
80 °C لمدة خمس دقائق	درجة الحرارة و مدة التسخين:
DMSO	المذيب المستخدم :
6h	زمن ثبات المعقد في درجة حرارة الغرفة:

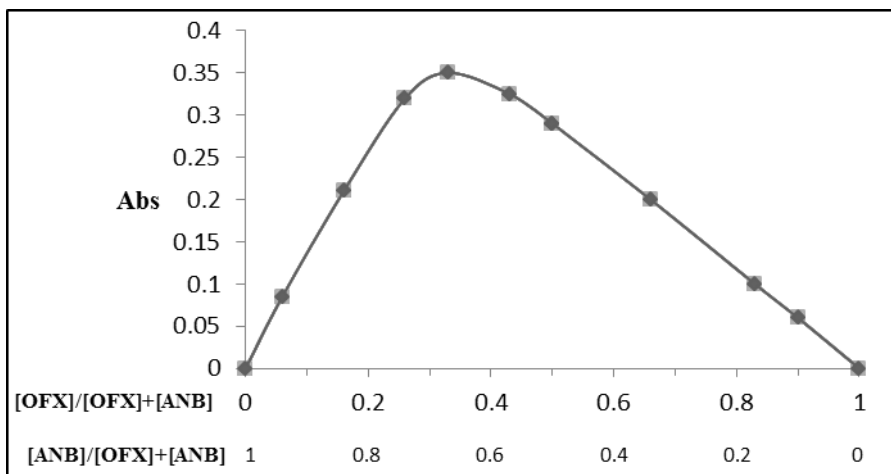
#### 8- تحديد نسبة الارتباط في معقد (OFX-ANB):

حُدثت نسبة الارتباط المثلى بين الافلوكساسين والكاشف في المعقد الملون المتشكل باستخدام طريقتي التغير المستمر [26] والنسبة الجزيئية [27] حيث تُبنت الشروط المثلى المعتمدة سابقاً في تشكيل المعقد المدروس، وفيما يلي وصف لكل طريقة على حده بالتفصيل:

#### 8-1- طريقة التغير المستمر:

تعتمد هذه الطريقة على تحضير سلسلة من محاليل المعقد (OFX-ANB) وفق الشروط المثلى التي تم التوصل إليها مع تغيير تركيز الافلوكساسين و تركيز الكاشف، بحيث يبقى مجموع تركيزيهما في كل المحاليل ثابتاً و يساوي  $300\mu M$ ، ثم حُدثت قيم الامتصاصية العظمى لكل محلول عند  $440nm$ ، و رسمت تغيرات الامتصاصية

لمحاليل المعقدات المتشكلة بدلالة الكسر المولي  $[OFX]/[OFX]+[ANB]$  أو  $[ANB]/[OFX]+[ANB]$ ، حُدِّت نسبة تشكل المعقد من نقطة الانعطاف التي توافق الامتصاص الاعظمي كما هو موضح الشكل (10).



شكل(10): حساب نسبة الارتباط لمعقد (OFX-ANB) بطريقة التغير المستمر

نستنتج من الشكل أن:

$$[OFX]/[OFX]+[ANB]= 0.33 \quad (1)$$

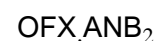
وكذلك:

$$[ANB]/[OFX]+[ANB]=0.66 \quad (2)$$

حُصل من قسمة (1) على (2) على :

$$2[OFX] = [ANB] \quad \text{ومنه} \quad [OFX]/[ANB]= 1/2$$

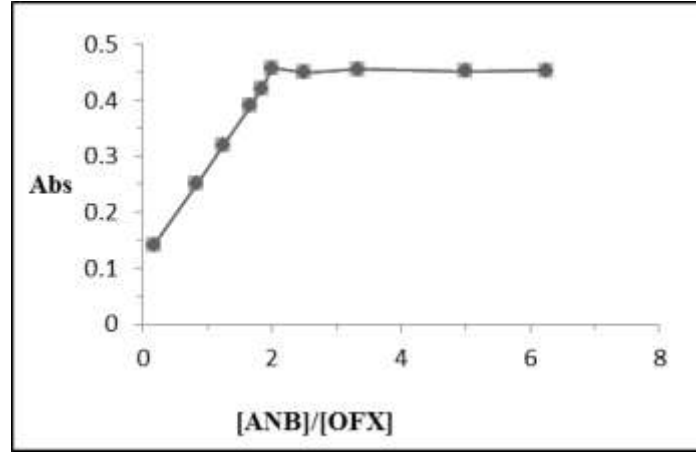
مما يدل على أن نسبة الارتباط هي ( 2:1 ) بين OFX:ANB ومنه نستنتج صيغة المعقد من الشكل



### 2-8- طريقة النسبة الجزيئية :

تعتمد هذه الطريقة على تحضير سلسلة من محاليل المعقد (OFX-ANB) حيث يتغير فيها تركيز الكاشف ضمن مجال  $20-600 \mu\text{M}$  مع إبقاء تركيز الافلوكساسين ثابتاً في كل محلول و يساوي  $43.36 \mu\text{g/ml}$ ، سُجلت قيم الامتصاصية لهذه المحاليل عند طول موجة الامتصاص الأعظمية  $440\text{nm}$  باستخدام محلول مقارن محضر بالطريقة نفسها عدا المركب الدوائي الافلوكساسين. رُسمت بيانياً علاقة الامتصاصية بدلالة النسب الجزيئية  $[ANB]/[OFX]$  للحصول على المنحنى الموضح في الشكل (11).

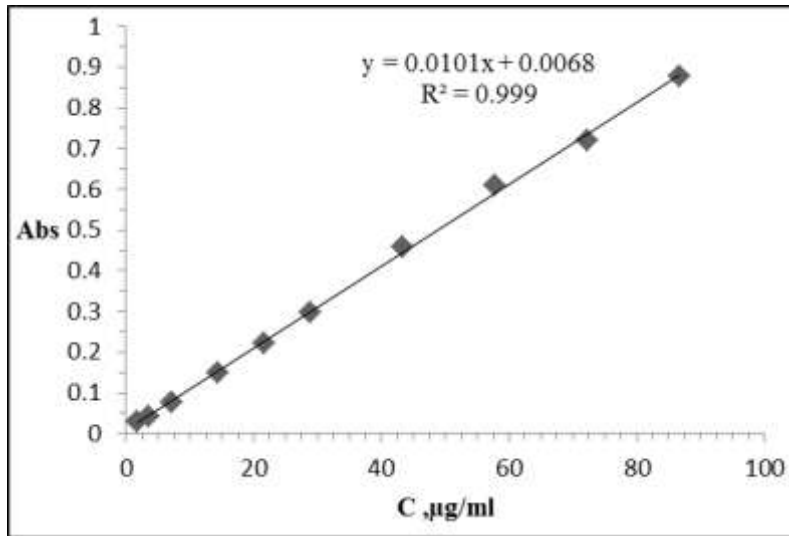
يُلاحظ من الشكل حدوث انكسار عند النسبة الجزيئية 2 مما يشير إلى وجود نسبة ارتباط وحيدة لمعقد (OFX-ANB) المتشكل هي (2:1) و هذا يؤكد ما تم التوصل إليه بتطبيق طريقة التغير المستمر.

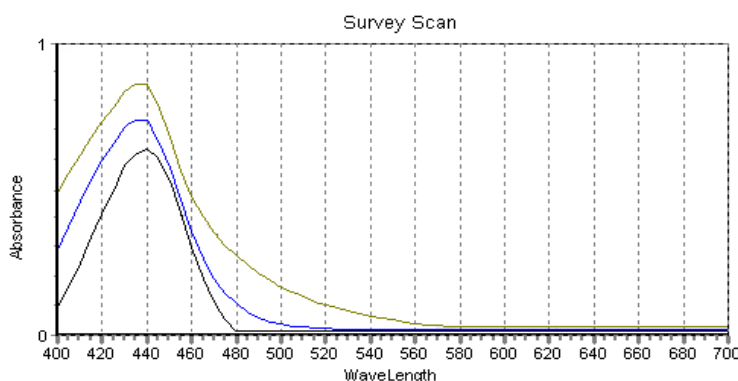


شكل (11): حساب نسبة الارتباط لمعقد (OFX-ANB) بطريقة النسبة الجزيئية

### 9- التحديد الكمي للافلوكساسين مع كاشف ANB:

حُدِّد الأفلوكساسين كميًا بالطريقة الطيفية اللونية ضمن مجال خطي من تراكيزه تحقق قانون بير- لامبرت وفق الشروط المثلى التي تم التوصل إليها لتشكيل المعقد. حُضرت سلسلة محاليل عيارية من المعقد تراوح تركيز الافلوكساسين فيها ضمن المجال  $(1.80-86.72) \mu\text{g/ml}$  بوجود تركيز ثابت من كاشف (ANB) قدره  $46.8 \mu\text{g/ml}$  بعد الأخذ بالحسبان الشروط المثلى الأنفة الذكر لتشكيل المعقد. سُجلت قيم الامتصاصية العظمى للمعقد المدروس عند طول الموجة  $440 \text{nm}$ . رُسمت العلاقة بين امتصاصية المعقد المتشكل و تركيز الافلوكساسين كما في الشكل (12).

شكل (12): المنحني العياري لمعقد الافلوكساسين مع الكاشف (ANB) عند  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{nm}$



شكل (13): المسح الطيفي لمعقد (OFX-ANB) بالتركيز التالية من الأوفلوكساسين :

ترتيبهم من الاسفل إلى الاعلى

86.72 µg/ml - 3 ; 72.27 µg/ml - 2 ; 57.81 µg/ml - 1

حُسبت انطلاقاً من المعطيات المعيارية القيمة الوسطية لمعامل الامتصاص الجزيئي  $\epsilon$  للمعقدات المتشكلة عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm بالاعتماد على قانون بير- لامبرت و حساسية ساندل S و حد الكشف، كما تم تحديد كل من معامل الارتباط  $R^2$  ونقطة تقاطع منحنى المعايرة مع محور الامتصاصية b و الميل m للمعطيات العيارية، كما هو موضح في الجدول (2).

جدول (2): العوامل الكمية للمعقد OFX-ANB

1.80-86.72	مجال قانون بير، µg/ml
$3.952 \times 10^3$	معامل الامتصاص الجزيئي عند طول الموجة الاعظمي $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$
0.091	حساسية ساندل ( $A=0.001$ ) ، $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
440	طول الموجة الاعظمي nm
2.54	الانحراف المعياري النسبي المئوي ( RSD % )
5.2	pH محلول المُنظم البريتوني
1.71	لوغارتم ثابت التشكل بالتغير المستمر
1.94	لوغارتم ثابت التشكل بالنسبة الجزيئية
6	زمن ثبات المعقد، hrs
1:2	نسبة الارتباط OFX-ANB
0.95	حد الكشف (LOD) $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
3.17	حد التحديد الكمي (LOQ) $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
معادلة المنحنى العياري $A = mC + b$	
0.0101	الميل ( m )

0.0068	التقاطع (b)
0.999	معامل الارتباط (R <sup>2</sup> )

حُسبت حساسية ساندل (Sandell Sensitivity) S بوحدة  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  من العلاقة التالية:

$$S = C_{\min} \times F_w \times \ell \times 10^3$$

حيث  $F_w$  وزن الصيغة بوحدة g/mol و  $\ell$  عرض ممر الضوء في خلية القياس بوحدة cm و  $10^3$  معامل

$$C_{\min} = A_{\min} / \varepsilon \times \ell$$

تحويل و  $C_{\min}$  التركيز الجزيئي الأدنى بوحدة mol/L والمعطى بالعلاقة: حيث  $A_{\min}$  أصغر امتصاصية يتمكن الجهاز من قياسها وتساوي 0.001 والموافقة لأصغر تركيز يمكن قياسه من أجل جهاز القياس الطيفي الضوئي المستخدم (Jasco Spectrophotometer V-530).

و  $\varepsilon$  معامل الامتصاص الجزيئي بوحدة  $\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times L$  وبحسب من العلاقة:

$$\varepsilon = A / C \times \ell$$

حُسب من المعطيات العيارية القيمة الوسطية لمعامل الامتصاص الجزيئي  $\varepsilon$  للمعدلات المتشكلة عند طول موجة الامتصاص الأعظمي 440nm .

و حُسب حد الكشف LOD (The detection limit) وهو معامل تحديد نوعي للتعبير عن حساسية الطريقة

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

حيث  $m$  هو ميل المنحني العياري للبلانك اي المحلول المقارن.

حُسب حد التحديد الكمي LOQ (The Qualitative limit) وهو معامل تحديد كمي بوحدة  $\mu\text{g}/\text{mL}$  من

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

حُدثت ثوابت تشكل المعقدات المدروسة باعتماد الطرائق الطيفية الضوئية المستخدمة في تحديد نسبة الارتباط، حيث تُحسب ثوابت التشكل الإجمالية من نتائج تطبيق طريقتي التغير المستمر و النسبة الجزيئية باستخدام العلاقة التالية [28]:

$$\beta = \frac{A / A_{\max}}{(I - A / A_{\max})^{n+1} \times C_L^n \times n^2}$$

حيث أن:  $A$  امتصاصية المعقد المتشكل عند نسبة الارتباط بوجود تركيز ثابت من الكاشف قدره  $C_L$  و

$A_{\max}$  الامتصاصية العظمى للمعقد و  $n$  نسبة الارتباط.

لسهولة التعبير عن ثوابت التشكل تؤخذ القيمة اللوغاريتمية لها أي:

$$p\beta = -\log \beta$$

و لتعيين دقة وصحة الطريقة الطيفية المعتمدة في تحديد المركب الدوائي النقي الافلوكساسين، جرى تحضير سلسلة محاليل عيارية مختلفة التركيز من الافلوكساسين ، وبتطبيق طريقة العمل المقترحة، أُجريت جميع الحسابات [29,30] بعد اعتماد نتائج خمسة تجارب  $n=5$  اي تكرار تحضير كل محلول خمس مرات، حيث حسبنا القيمة

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

والانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% من العلاقة:  $RSD\% = 100 \times SD / \bar{x}$   
 والمردود النسبي المئوي (الاسترجاعية النسبية) R% (Recovery Percent) المتعلق بالتركيز المأخوذ  
 $C_{\text{found}}$  والتركيز المحدد [31]، من العلاقة:  $R\% = 100 \times C_{\text{found}} / C_{\text{taken}}$   
 وحد الثقة (CL) (Confidence Limit) [32] عند درجة الثقة % 95 من العلاقة:  
 $CL = \bar{X} \pm [t \times SD / (n)^{1/2}]$   
 حيث t عامل إحصائي يعتمد على عدد درجات الحرية (n-1) ودرجة الثقة المطلوبة (%) ويساوي إلى  
 2.776 من أجل عدد درجات الحرية n-1=4 ودرجة ثقة مقدارها 95%.  
 كما هو وارد في الجدول (3). تميزت نتائج الطريقة الطيفية المطورة بحساسية ودقة عاليتين وتبين ذلك من  
 قيمة الانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% الذي لم تتجاوز قيمته  $2.54 \pm$  % لأصغر تركيز محدد وبناتج  
 صحيحة ودقيقة من خلال الاسترجاعية النسبية الجيدة.

جدول رقم (3): تقدير دقة و صحة الطريقة الطيفية المقترحة لتحديد OFX باستخدام ANB

التركيز المأخوذ ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	التركيز المحدد* ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	الانحراف المعياري SD	RSD %	خطأ القياس التحليلي $SD(n)^{1/2}$	حد الثقة $\bar{X} \pm [t \times SD / (n)^{1/2}]$	المردود النسبي المئوي R% (الاسترجاعية)
1.80	1.77	0.045	2.54	0.020	$1.77 \pm 0.055$	98.33
3.61	3.58	0.052	1.54	0.023	$3.58 \pm 0.063$	99.16
7.22	7.15	0.103	1.44	0.046	$7.15 \pm 0.127$	99.03
14.45	14.18	0.493	3.47	0.220	$14.18 \pm 0.610$	98.13
21.68	21.81	0.653	2.99	0.292	$21.81 \pm 0.810$	100.59
28.90	28.53	0.731	2.56	0.326	$28.53 \pm 0.904$	98.71
43.36	42.71	0.892	2.08	0.398	$42.71 \pm 1.104$	98.50
57.81	57.59	0.967	1.67	0.432	$57.59 \pm 1.199$	99.61
72.27	71.65	1.38	1.92	0.617	$71.65 \pm 1.712$	99.14
86.72	86.24	1.76	2.04	0.787	$86.24 \pm 2.184$	99.44

\*متوسط خمس تجارب ( كُررت التجربة خمس مرات لكل تركيز اي كُرر تحضير كل محلول من السلسلة  
 العيارية خمس مرات وقيست الامتصاصية لهم عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm ثم حساب التركيز  
 من قانون بير- لامبرت او باسقاط الامتصاصية على المنحني العياري وحساب التركيز المحدد بأخذ المتوسط لهم).

تمت المقارنة بين هذه الطريقة الطيفية الضوئية و الطرائق المرجعية المستخدمة عالمياً كما هو موضح في الجدول (4) حيث لُحظ تقارب نتائج هذه الطريقة مع نتائج الطرائق المرجعية

جدول (4): مقارنة بين دراستنا و الطرائق المرجعية

اسم الكاشف	طول الموجة الأعظمي $\lambda_{max}$ (nm)	الخطية $\mu\text{g/mL}$ $\epsilon = \text{L/mol.cm}$	المرجع
Citric acid–acetic anhydride	552	5–55 $\epsilon = 6.04 \times 10^3$	[11]
a) Bromophenol blue	410	5–25 $\epsilon = 1.04 \times 10^3$	[12]
b) Bromothymol blue	415	2–15 $\epsilon = 2.01 \times 10^3$	
c) Bromocresol purple	410	2–20 $\epsilon = 1.04 \times 10^3$	
a) Tropaeolin 000 (TP 000)	485	2.5–30 $\epsilon = 8.24 \times 10^3$	[13,14]
b) Supracene Violet 3B (SV 3B))	575	2.5–25 $\epsilon = 1.09 \times 10^4$	
erichrome black	512	2.5–20 $\epsilon = 0.0954 \times 10^6$	[16]
erichrome orange	484	5–30 $\epsilon = 0.1004 \times 10^6$	
3–methyl–2–benzothiazolinone hydrazone (MBTH)	620	2.5–25 $\epsilon = 0.1720 \times 10^6$	
2–amino–6–nitrobenzothiazole	440	1.80–86.72 $\epsilon = 3.952 \times 10^3$	دراستنا



## 5- تحديد الافلوكساسين في المستحضرات الصيدلانية باستخدام كاشف (ANB) :

استخدمت الطريقة الطيفية المطورة في هذا البحث لتحديد الافلوكساسين في مستحضراته الصيدلانية (مضغوطات) باستخدام كاشف (ANB)، وأشارت النتائج إلى أن تحديد الافلوكساسين في مستحضراته الصيدلانية لا يتأثر بوجود المواد المساعدة كما هو مبين في الجدول (5).

جدول(5): تحديد كمية الافلوكساسين في المضغوطات

المرئود النسبي R% المئوي (الاسترجاعية)	RSD %	الانحراف المعياري SD	الكمية المحددة <sup>a</sup> mg	التركيز المأخوذ المحدد <sup>a</sup> ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	التركيز المأخوذ ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	كمية الافلوكساسين mg	اسم المستحضر
99.6	2.710	1.35	398.40	49.8	50	400	Azoflox
99.64	0.843	0.84	398.56	99.64	100		

<sup>a</sup> متوسط خمسة قياسات (متوسط خمس تجارب، أي كُرر تحضير المحلول خمس مرات وقيست الامتصاصية للمحليل عند طول موجة الامتصاص الأعظمية 440nm وحساب التركيز المحدد بأخذ المتوسط لهم).

## الاستنتاجات والتوصيات:

اقترحت هذه الدراسة طريقة طيفية لونية جديدة باستخدام كاشف (ANB) لتحديد الافلوكساسين في حالته النقية وفي مستحضراته الصيدلانية، امتازت هذه الطريقة بأنها سهلة التطبيق وسريعة النتائج وذات تكلفة منخفضة، كما امتازت هذه الطريقة بحساسيتها، إذ بلغ أصغر تركيز تم تحديده  $1.80 \mu\text{g}/\text{ml}$  بانحراف معياري نسبي لا يتجاوز  $\pm 2.54\%$  ويمكن استخدامها في التحليل الروتيني للمستحضرات الصيدلانية للافلوكساسين في مختبرات مراقبة الجودة.

## المراجع:

1. O'NEIL, M. J. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. 14<sup>nd</sup> ed. Merck Research Laboratories, Division of Merck and Co., Inc. Whitehouse station, New Jersey, 2006, 1170.
2. SWEETMAN, S. C, Martindale. *The complete drug reference*. 35<sup>nd</sup> ed., Pharmaceutical Press, London, 2007, 277.
3. POPA, D. OPREAN, R. CUREA, E. PREDA, N. *TLC-UV densitometric and GC-MSD methods for simultaneous quantification of morphine and codeine in poppy capsules*. J Pharm Biomed Anal New York, Vol.18, N<sup>o</sup>.4, 1998, 645-650.
4. MORIYA, F. CHAN, K. HASHIMOTO, Y. *Concentrations of morphine and codeine in urine of heroin abusers*. Legal Med Tokyo, Vol.1, N<sup>o</sup>.3, 1999, 140-144.
5. ABDALLA, A. E; BAHRUDDIN, S; ABDUSSALAM, S. M. I; MUHAMMAD, I. S; HASSAN, Y. A. *Determination of ofloxacin enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis*. J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., Vol.31, 2008, 348-360.

6. SUN, S. W; WU, A. L. *Determination of fluoroquinolone antibacterials in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, Vol.22, 1999, 281-296.
7. SEE, K. L; ELBASHIR, A. A; SAAD, B. *Simultaneous determination of ofloxacin and ornidazole in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. Biomed. Chromatogr.* Vol. 23, 2009, 1283-1290.
8. SRIVIDYA, P; CARDOZA, R. M; AMIN, P. D. *Stability indicating HPTLC method of ofloxacin. Indian Drugs.* Vol.40, 2003, 41-43.
9. PURANIK, M; BHAWSAR, DV; RATHI, P; YEOLE, P. G. *Simultaneous determination of ofloxacin and ornidazole in solid dosage form by RP-HPLC and HPTLC techniques. Indian J Pharm Sci;* Vol.72, N<sup>o</sup>. 4, 2010, 513-17.
10. ZHANG, H; REN, Y; BAO, X. *Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal.* Vol. 49, 2009, 367-374.
11. PATEL, P.U; SUHAGIA, B. N; PATEL, M. M; PATEL, G.C; PATEL, G. N. *Spectrophotometric determination of ofloxacin with citric acid-acetic anhydride. Ind. Pharm.*, Vol.6, 2007, 59-61.
12. ISSA, Y. M; ABDEL-GAWAD, F. M; ABOU TABLE, M. A; HUSSEIN, H. M. *Spectrophotometric determination of ofloxacin and lomefloxacin hydrochloride with some sulphonthalien dyes. Anal. Lett.*, Vol.30, 1997, 2071.
13. SASTRY, C. S. P; RAMA RAO, K. SIVA PRASAD, D. *Extractive spectrophotometric determination of some fluoroquinoline derivatives in pure and dosage forms. Talanta*, Vol.42, 1995 , 311-316.
14. SASTRY, C. S. P; RAMA RAO, K ; SIVA PRASAD, D. *Spectrophotometric determination of enrofloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. Indian Drugs*, Vol.32, 1995, 172-175.
15. VINAY, K. B; REVANASIDDAPPA, H. D; DEVI, O. Z; RAMESH, P. J; BASAVAIHAH, K. *Rapid titrimetric and spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceuticals using N-bromosuccinimide. Journal of Pharmaceutical Sciences Brazilian.* vol. 47, NO. 2, 2011,252-260 .
16. PRASHANTHI, S; RAMASUBHA, R. K; SATNAM, K. G. B; TULJA, RAHI. G. *Spectrophotometric Methods for the Determination of Ofloxacin Hydrochloride in Pure and Pharmaceutical Formulations International. Journal of PharmTech Research.* Vol.2, NO.4, 2010, 2461-2466.
17. SHERJE, A. P; TAWADE, A. P; VYAS, M. *Simultaneous Spectrophotometric Determination of Satranidazole and Ofloxacin in Combined Dosage Form. International Journal of PharmTech Research.* Vol.2, NO.1, 2010, 511-514.
18. FEGADE, J. D; MEHTA, H. P; CHAUDHARI, R. Y; PATIL, V. R. *Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Ofloxacin and Ketorolac Tromethamine in Ophthalmic Dosage Form. International Journal of ChemTech Research.* Vol.1, NO.2, 2009, 189-194.
19. SHAH, M. N; PATEL, H. U; PATEL, C. N. *Development and Validation of Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Cefpodoxime Proxetil and Ofloxacin in Tablets. International Journal of Pharmaceutical sciences and Research.* Vol. 3, NO.2, 2012, 551-555.
20. EBRAHEEM, S. A; ELBASHIR, A. A; *Spectrophotometric Method for the Determination Of Ofloxacin and Levofloxacin in Pharmaceutical Formulations. Scholarly Research Journal & American Academic.* Vol. 4, NO. 2, 2012.

21. DUBE, A; PILLAI, S; SAHU, S; KESKAR, N. *Spectrophotometric estimation of cefixime and ofloxacin from tablet dosage form*. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES . Vol. 2, NO. 3,2011,632-629 .
22. PATEL, S. A. *Development and Validation of First Order Derivative Spectrophotometric method for simultaneous estimation of Ofloxacin and Cefpodoxime Proxetil in tablet dosage form*. Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research Publications. Vol.1, NO.2 ,2011,108-112.
23. ANGELA, G; LONG, M. S. *The united stale Pharmacopeia*, 2007, USP 30-NF 25 page 2269.
24. MARTINDALE. *The complete Drug Reference*, 33rd ed., pharmaceutical press. Taunton, Massachusetts, USA,2002, 1.P 1000-1001.
25. HELY, DAVID . *The psychopharmacologists*.1. London; Chapman and Hall. 1996, ISBN 978-1-86036-008-4.
26. YOE, H; JONES, L. *Colorimetric Determination of Fe with disodium 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate*.JOURNAL OF Journal of Industrial & Engineering Chemistry, Vol. 16,N<sup>o</sup>. 3, 1944, 14–19.
27. WARREN, C; COOPER, R. *the Identification of Complex ions in Solution by Spectrophotometric measurements*; Journal of the American Chemical Society, Vol.63, NO. 2, 1941, 437-442.
28. HARVEY, A. E; MANINNG, D. L. *Spectrophotometric Method of Establishing Empirical Formulas Colored Complexes in Solution*, J. Anm. Chem. Soc, 1950, 72-4488.
29. CHRISTIAN G. D. *Analytical Chemistry*, 3rd ed., John Wiley & sons, inc., New York, 1980.
30. HOLSCHER H. H. *Simplified Statistical Analysis: Handbook of Methods, Examples and Tables*. 1st ed., Massachusetts, Cahners Books, 1999, 234.
31. JOHN, M. *The Statistical Analysis of experimental Data* (1964) p106-107.
32. MILLER, J. C. and MILLER, J . N. *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd ed., Ellis Horwood, New York 1993.