

تقدير الدواء هيدروكلوريد البروميثازين في المستحضر الصيدلاني فينيرجان (Phenergan) بطريقه الأطياف الجزيئية وباستعمال فلز الحديد.

د. عماد طارق حنون عباس¹ محمد محمود عبدالله²

1- كلية العلوم ، جامعة تكريت ، العراق

2- الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية ، سامراء ، العراق

المخلص :

يتضمن البحث استحداث طريقة تحليلية جديدة في تقدير المركب الدوائي هيدروكلويد بروميثازين في بعض المستحضرات الصيدلانية بطريقة الأطياف الجزيئية :

Determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical preparation fanarkan by using molecular spectrum and iron metal

Dr.Imad Tarek Hanoon¹

Mohammed Mahmood Abdallah²

1- College of Science , Tikrit University , Iraq

2- S.D.I ,Samarra , Iraq

Received (November 2014) , Accepted (June 2015).

Abstract :

This research is included development method of determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical preparation fanarkan by using molecular spectrum and iron metal.

تعيين الدواء PRZH على هيا معقد هياة PRZH-Fe(II) وباستخدام مطيافية UV Visible

• تم تقدير المعقد PRZH Fe(II) بعد دراسة الظروف العملية الفضلى: الرقم الهيدروجيني (pH=2.1) وتركيز الايون Fe (II) (50 ميكروغرام .مل-¹) ونسبة الطور المائي الى العضوي(3:5) وزمن التفاعل (4-5) دقائق لاكمال التفاعل قبل عملية الاستخلاص ،اما افضل زمن للاستخلاص فهو دقيقه واحدة لاستخلاص المعقد الكلايبي.ان عملية الاستخلاص لمرة واحد كانت كافية لاستخلاص المعقد. وجد ان Benzyl alcohol هو افضل مذيب لاستخلاص معقد PRZH-Fe(II) بدون تداخلات منشأ. وتم التقدير عند الطول الموجي ($\lambda_{max}=475nm$) وتمت معرفه نسبة الاتحاد المولية بين الدواء والحديد وهي(1:1) .

الهدف من البحث :

تعيين بعض المخليبات بشك غير مباشر باستغلال الفلز الذي لها القابلية على تكوين معقد مخلي فلزي تحت ظروف تجريبية محدودة او تكوين معقد عضوي معدني Organometallic Compounds . استعمل هذا التفاعل لاستحداث طرائق تحليلية سريعة وحساسة وحدود كشفية واطنة لتقدير المركبات الدوائية باستخدام الاطياف الجزيئية.

المقدمه:

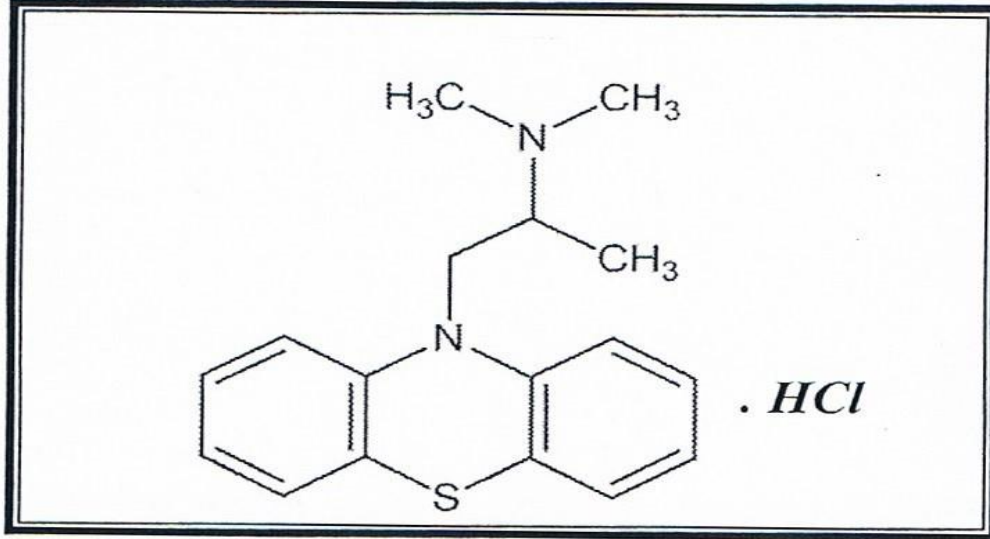
هيدروكلوريد البروميثازين

Promethazine Hydrochloride (1).(2).(3)(4)

يعد هيدوركلوريد البروميثازين من المشتقات المهمة للفينوثايزين الذي يستخدم بصورة رئيسة كمضاد للحساسية (Antihistaminic-HI receptor) كمضاد للتقيؤ (Anti-emrtic)

الاسم العلمي :

(2RS)0N,N-dimethy 1-1-(10H-phenothiazin-10-yl) dpropan-2-amine hydrochloride



(Injections Solution) او تحاميل (Suppositories) (5)

الصيغة الجزيئية	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S.HCl
الوزن الذري	320.9 gm/mol
درجة الانصهار	222 C°
الحامضية	4.0 – 5.0
عمر النصف	6-12 hours

التقنيات المستخدمة في تقدير العقار

قام الباحث Koupparis وجماعته (5) بتقدير بعض المشتقات الفينوثايزين بطريقة حقن الجريان الاوتوماتيكي وباستعمال بيركلورات الحديد يضح 20 مايكروليتر من محلول الفينوثايزين بسرعة 2.4 مل دقيقة-1 مع المؤكسد $2.75Mm$ ----- [Fe(ClO₄)⁻³] 10M HClO₄ والماء كمحلول ناقل وكانت الدقة أفضل من 1 % وعدد النماذج المقاسة كانت 120 نموذجاً في الساعة الواحدة .

اما Srivastava و اخرون (6) بتقدير مشتقات الفينوثايزين لونياً في وسط حامض الكبريتيك 5 مولاري ليعطي لون احمر المقاس عند الطول الموجي 490 نانوميتر وكانت مدى قيم معامل الامتصاص المولاري 1.07×10^5 - 3.19×10^4 والخطية ما بين 1-5 جزء في المليون والخطا بحدود $1 \pm$ % .

وقام Szabolcs (7) بتقدير مشتقات الفينوثايزين أذ اعتمدت الطريقة على تكوين معقدات انتقال الشحنة مع iodine ثم استخلاص المعقد الناتج بالكلورفورم واعطت قمم امتصاص عند الطولين الموجيين 362,292 نانوميتر

وكذلك قام الباحث Kojlo وأخر (8) بتقدير مشتقات الفينوثازين بطريقة حقن الجريان باستعمال المؤكسد ($K_3Fe(CN)_6$) وكان المدى التراكيز ضمن $1-25Mg.Ml^{-1}$

ثم استطاع Kojlo وجماعته (9) بتقدير مشتقات الفينوثازين وباستخدام ثنائي اوكسيد المنغنيز MnO_2 وكانت للتركيز بحدود $5-50 mg .ml^{-1}$

استطاع Seetharamappa وآخرون (10) تعيين بعض مشتقات الفينوثازين بطريقة طيفية بسيطة وقليلة الكلفة باستخلاص المعقد المتكون مع الكلوروفينول الاحمر في وسط حامضي بالكلورفورم واعطي قمة الامتصاص عند الطول الموجي 405 نانوميتر . ودرس تأثير المضافات وبينت النتائج عدم وجود تداخل بينها وبين طريقة التقدير . وطبقت الطريقة على اربعة من المشتقات بنجاح في عيناتها النقية واشكالها الصيدلانية .

قام Mohamed (11) بتقدير بعض مشتقات الفينوثايزينية بالطريقة اللونية باستعمال Diphenylamine بوجود كل من N-Bromosuccinimid وحامض الكبريتيك اذ تكونت بهذا الطريقة ثلاثة معقدات ملونة اعطت مديين الطول الموجي الاول عند مدى 396-392 نانوميتر بمعامل امتصاص مولاري عال والثاني عند مدى الطول الموجي 770-780 نانوميتر بمعامل مولاري واطي وكانت استقرارية بحدود ساعة واحدة ، وتم تقدير 11 مشتقاً .

تمكن كل من Ramappa ,Revanasiddappa (12) تقدير بعض مشتقات الفينوثايزينية بالطريقة الطيفية عن طريق تكوين معقد لون احمر عند تفاعلها مع حامض الايوديك (1% Iodic acid) وباستعمال حامض الكبريتيك او الفسفوريك عاملاً مساعداً اذ يتضمن التفاعل أكسد المشتق الفيرثايزيني وتكوين الجذور الحرة الموجبة واعطيت هذه الطريقة نتائج جيدة مقارنة مع الطريقة القياسية الاخرى.

قام Youssef وآخرون (13) بتقدير مشتقات الفينوثايزين لونياً باستعمال المورفين morpholine ويوديد اليوتاسيوم الايودي iodine-potassium iodide اذ اعتمدت الطريقة على التفاعل العقار اللاسفلوكسيدي unsulphoxidized مع الموفلين واليوديد (KI) ليعطي ناتج ازرق يقاس عند الطولين الموجي 620-640 نانوميتر واللون مستقر لمدة 10 ساعات وتم قياس البروميثازين في أدرار الانسات تداخل مع المركب البايولوجية او مع سلفوكسيد البروميثازين (الايض الرئيسي للعقار).

عين Ramappa وآخرون (14) الفينو تايزين باستعمال حامض التنستوفوسفوريك بمعاملة مشتقات الفينوثايزين مع محلول 10% tungstophosphoric acid ذاتات (PH 1.5) وبعد 15 دقيقة قيست الامتصاصية عند الاطوال الموجية 525-540 نانوميتر وكانت مديات التركيز 1.8-42 جزء من المليون .

الاجهزة المستخدمة :

1-مطافية الاشعة فوق البنفسجية -المرئية

Shimadzu UV –Visible spectrophotometer UV-160A Japan

pH Meter jenway 3020 Germany 2-مقياس الرقم الهيدروجيني

Sartorius B1 210 Japan 3-ميزان حساس من نوع

المواد الكيميائية:

الجدول (1) المواد الكيميائية المستخدمة

الجهة المصنعة	النقاوة	الوزن الجزيئي	الصيغة الجزيئية	اسم المادة	ت
---------------	---------	---------------	-----------------	------------	---

1.	Promethzine hydrochloride (PRZH)	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S.HCl	320.9	(99-101) %	SDI
2-	Ferric acetate (II)	Fe(CH ₃ COO)	220.9	Purum	Fluka
3-	Hydrochloric acid	HCl	36.4-35.4 %	AnalaR	BDH
4-	Benzylalcohol	C ₆ H ₅ CH ₂ OH	109.13	AnalaR	BDH
5-	Cesium Iodide	CsI	-----	AnalaR	BDH

المحاليل المستخدمة :

ان الكواشف والمواد التي استخدمت في هذه الدراسة نقاوة عالية حسب الجدول(1-1).

استخدمت كلمة ماء لتعبير عن الماء اللابوني للذابة وتحضير المحاليل وتخفيفها في الشطف النهائي للادوات الزجاجية وغيرها .

1-1-1 المحاليل القياسية:

1- محلول مائي قياسي للحديد 1000 جزء من المليون :حضر بإذابة (0.3112) غم من Fe (CH₃COO)₂ في 5مل من (3 عياري) حامض الهيدوركلوريك ثم خفف بالماء في دورق حجمي سعة 100 مل.

1-1-1-1 المحاليل القياسية المخففة :

1- حضرت محاليل مائية قياسية مخففة نوات تركيز 200 جزء من مليون بتخفيف 20مل من المحلول الام (1000 جزء من المليون) لعنصر Fe في الماء في دورق حجمي سعة 100 مل على التوالي.

2- حضرت محاليل مائية قياسية مخففة نوات تركيز 100 جزء من مليون بتخفيف 10مل من المحلول الام (1000 جزء من المليون) لعنصر Fe في الماء في دورق حجمي سعة 100 مل على التوالي.

3- حضرت محاليل مائية قياسية مخففة نوات تركيز 50 جزء من مليون بتخفيف 25مل من المحلول الام (1000 جزء من المليون) لعنصر Fe في الماء في دورق حجمي سعة 50 مل على التوالي.

2-1-1 تحضير المحاليل القياسية (الام) لل (PRZH) :

محلول قياسي (1000) جزء من المليون (PRZH) :

حضرت بإذابة (0.1000)غم من (PRZH) في الماء وأكملت الحجم في الدورق حجمي سعة 100 مل .

1-2-1 تحضير المحاليل القياسية المخففة من (PRZH) :

1- محلول ذو تركيز (200 جزء من المليون):

نقل 10 مل من المحلول القياسي الام (PRZH) الى دورق حجمي سعة 50 مل ثم خفف بالماء الى العلامة.

2- محلول ذو تركيز (100 جزء من المليون):

نقل 10 مل من المحلول القياسي الام (PRZH) الى دورق حجمي سعة 100 مل ثم خفف بالماء الى العلامة.

3- محلول ذو تركيز (50 جزء من المليون):

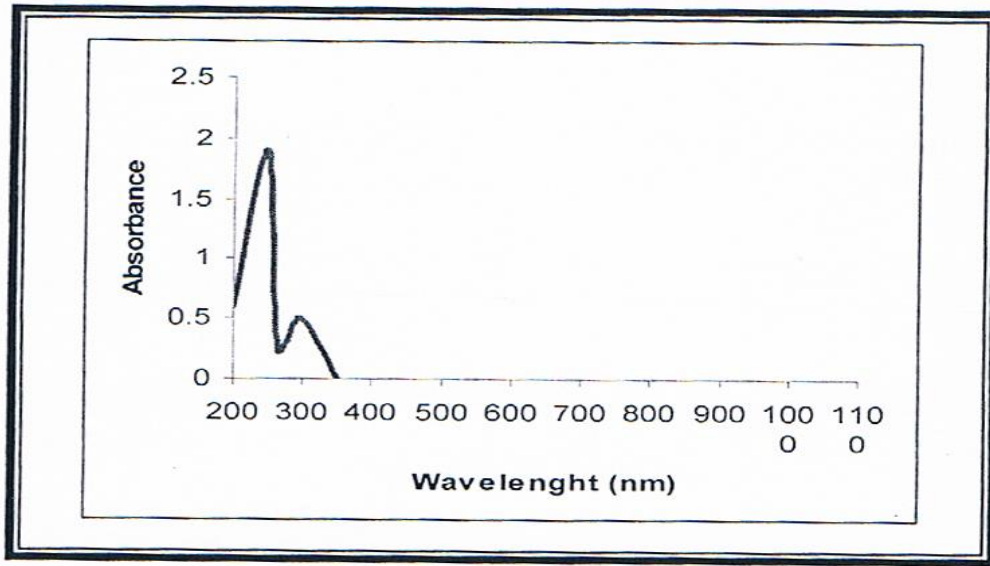
نقل 25 مل من المحلول القياسي ذي التركيز (100 جزء من المليون) الى دورق حجمي سعة 100 مل ثم خفف بالماء الى العلامة

2- استخدام الحديد في التعيين ال (Promethazine) بطريقة استخلاص المعقد -PRZH: :Fe(II)

1-2 استخدام مطافية الامتصاص الجزيئي:

1-1-2 طيف الدواء

تمت دراسة طيف الدواء PRZH ويلحظ من الشكل (1) ان الدواء PRZH قمتي امتصاص عند الطول الموجي (249) نانوميتر. والثانية عند الطول الموجي (297) نانوميتر، مقابل محلول المخلب حيث اخذت 0.25 مل من محلول القياسي (الام) لل PRZH الى دورق حجمي سعة 5 مل وخفف بالماء الى العلامة. رسم طيف الامتصاص لة في مدى (200-1100) نانوميتر مقابل الماء كمحلول خلب كما في الشكل (1).



شكل (1) طيف الامتصاص الجزيئي للدواء PRZH مقابل الماء كخلب

2-1-2 الظروف العملية الفضلى في تعيين ال (PRZH):

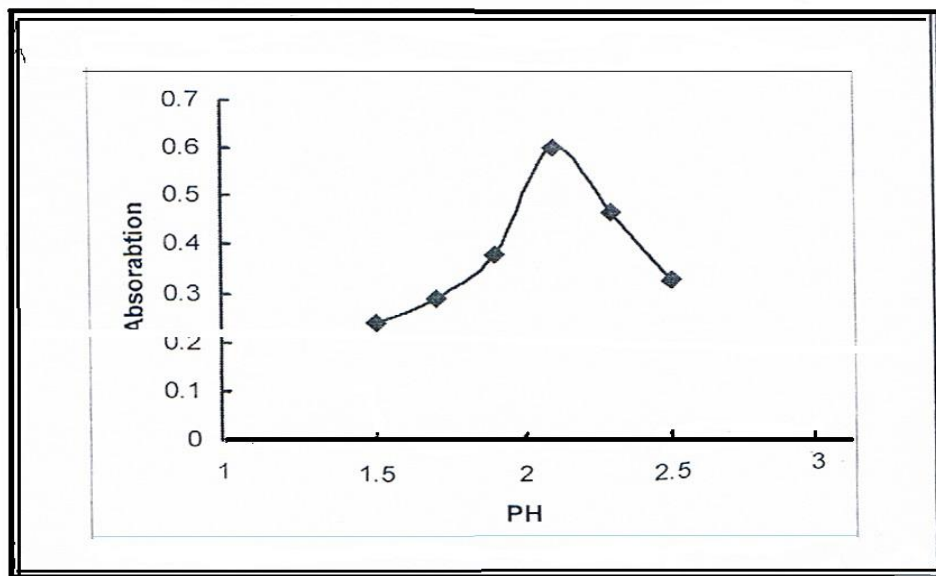
يتطلب استعمال ايون Fe(II) في تعيين ال PRZH دراسة الظروف الفضلى (Optimum Conditions) وضبطها وهي تركيز الايون Fe(II) والرقم الهيدروجيني (PH) ودرجة الحرارة والمذيب العضوي المناسب للاستخلاص الامثل ونسبة الطور المائي الى العضوي وزمن التفاعل وزمن الاستخلاص وعدد مرات الاستخلاص.

وهذه الظروف تم ضبطها وفق الخطوات :

1- الرقم الهيدروجيني pH :

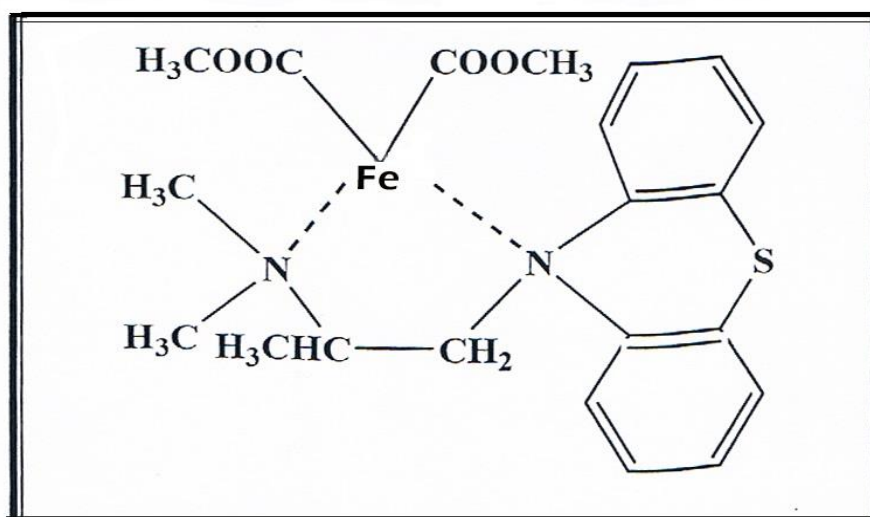
تم تحديد افضل مدى للرقم الهيدروجيني في تكوين المعقد بعد نقل كمية ثابتة من (PRZH) الى دورق حجمي سعة 5مل مع تثبيت الظروف الفضلى الاخرى مع اجراء تغيير الرقم الهيدروجيني (1-7) في كل مرة باضافة قطرات من (0.1 عياري) حامض الهيدروكلوريك او من (0.1 عياري) هيدروكسيد الصوديوم واستخلاص

المعقد المتكون وقياس الممتصية للمعقد الناتج عند الطول الموجي الاعظم للامتصاص. وجد أفضل قيمة للرقم الهيدروجيني pH هي (2.1) أذ سجلت اعلى ممتصية .



الشكل (2) تأثير الرقم الهيدروجيني في امتصاصية المعقد PRZH-Fe(II)

أن تفاعل الحديد (II) مع الدواء يحدث كما في المعادلة رقم (1) إذ ان ذرات (N) الموجتوات ضمن تركيب الدواء تعمل كذرات تناسقية Coordinating Atoms وبين الشكل (1-3) التركيب الكيميائي المقترح لمعقد للحديد مع الدواء



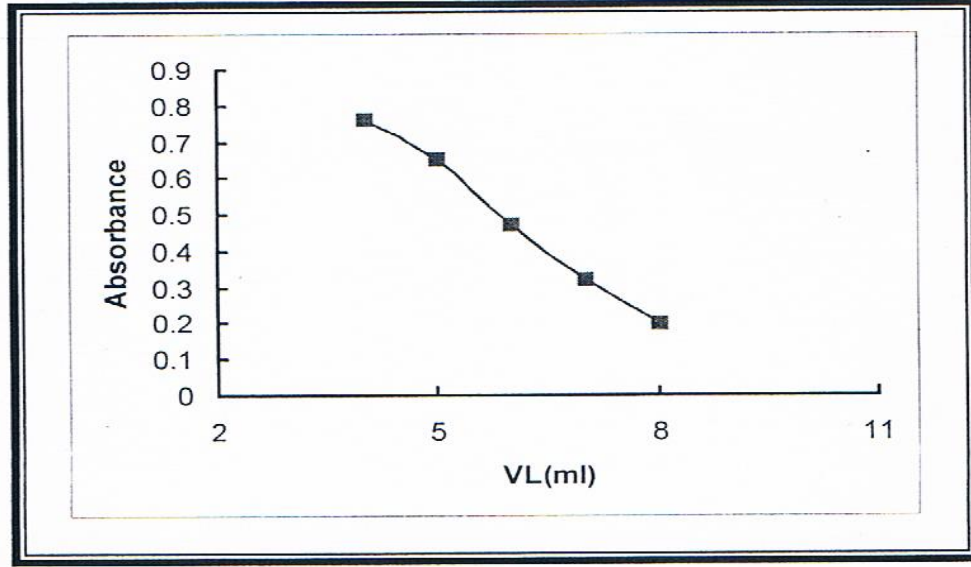
الشكل (3) التركيب الكيميائي المقترح للمعقد PRZH-Fe(II)

3- نسبة الطور :

1- تم تثبيت حجم الطبقة المائية مع الزيادة في حجم العضوية من 3 الى 6 مل مع ثبات الظروف الاخرى في كل مرة.

2- يثبت حجم الطبقة العضوية عند 3 مل الذي (الفقرة 1) الذي اعطي اعلى امتصاصية للمعقد مع ازدياد حجم الطبقة المائية من (4 الى 8 مل) واستخلاص المعقد في كل مرة ، وقياس الممتصية .

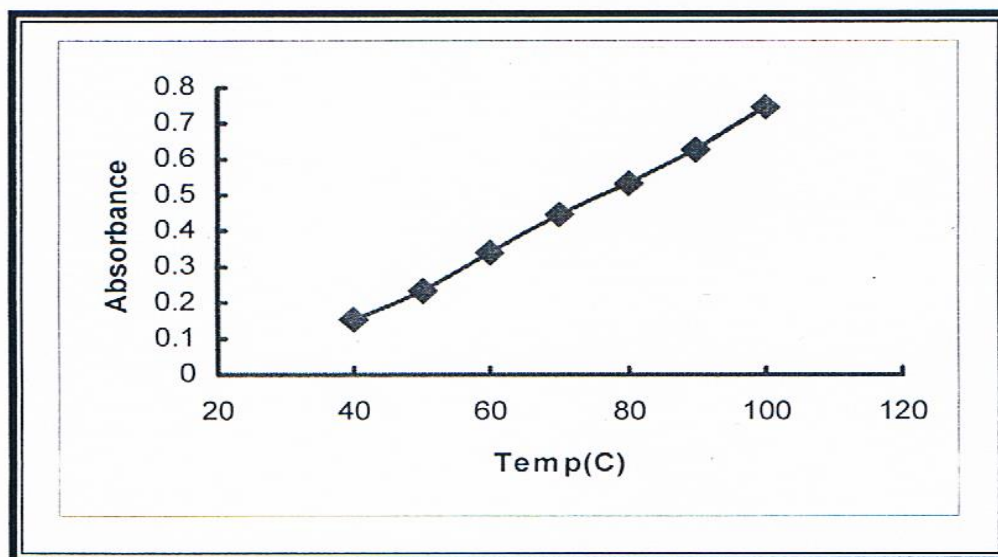
حيث وجدت ان حجم 3 مل من الطبقة العضوية هو حجم كافي للحصول على اعلى امتصاصية للمعقد المتكون، ثم يثبت حجم الطبقة العضوية عند 3 مل مع زيادة حجم الطبقة المائية ، ويلاحظ من الشكل 4 ان قيم الامتصاصية للمعقد المستخلص تبدأ بالانخفاض ، وهذا يشير الى تاثر عملية الاستخلاص بزيادة حجم الطور المائي .



الشكل (4) تاثير نسبة الطور في امتصاصية المعقد PRZH-Fe (II)

4- درجة الحرارة :

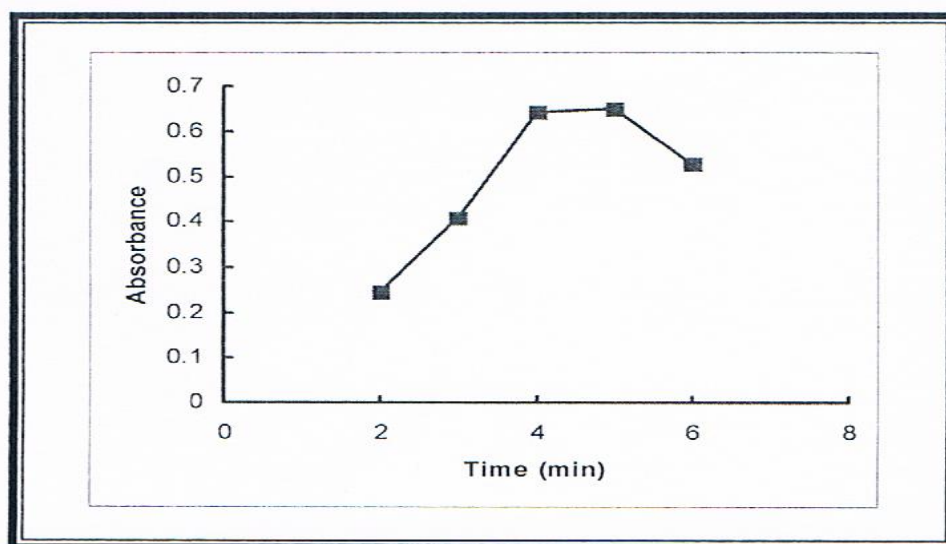
تم تحديد افضل درجة الحرارة يتكون فيها المعقد بعد اخذ كميات متساوي من محلول (PRZH) في ورق حجمي سعة 5 مل وتحديد الظروف الفضلى الاخرى مع تغيير درجة الحرارة التفاعل من (40-100) درجة مئوية ثم يستخلص المعقد في كل مرة وقياس الممتصية الحديد ، حيث وجد ان افضل درجة حرارة لتكوين المعقد PRZH-Fe(II) هي 100 مئوية كما في الشكل (5).



الشكل (5) تأثير درجة الحرارة في ممتصية المعقد PRZH-Fe(II)

5- زمن التفاعل:

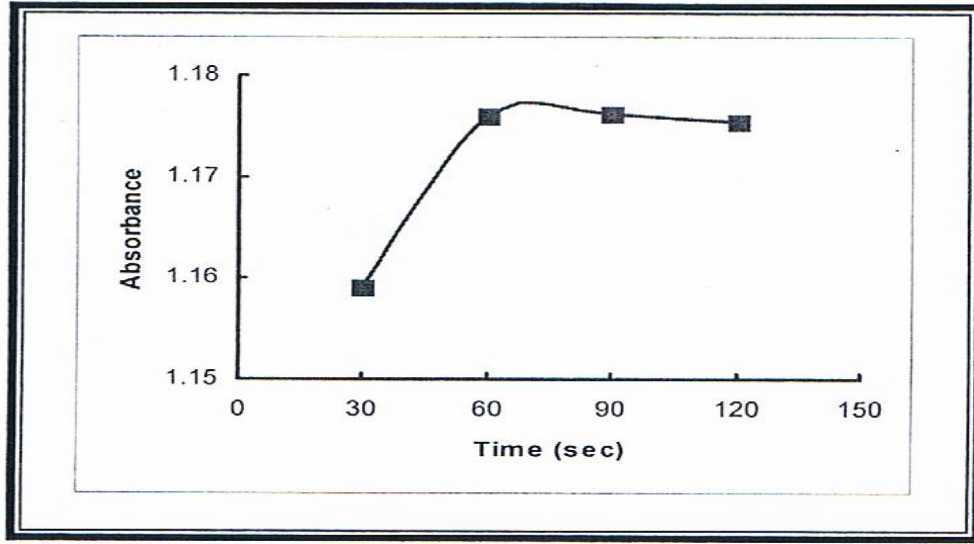
تم تحديد المدة الزمنية المثلى للتفاعل بعد وضع محلول كميات متساوية من محلول (PRZH) في دورق حجمي سعة 5 مل وتحديد الظروف المثلى الأخرى مع تغيير المدة الزمنية للتسخين قبل إجراء عملية الاستخلاص من (2 إلى 6 دقيقة) ثم يستخلص المعقد وتقاس الممتصية للمعقد عند الطول الموجي لأعظم امتصاص في كل مرة، كما ان بين الشكل (6) تأثير زمن التفاعل قبل إجراء عملية الاستخلاص ويلحظ من خلال قراءة الممتصية للمعقد المستخلص ان (4-5) دقيقة كافية للحصول على أعلى ممتصية، او قد ينخفض قليلاً بسبب تحلل جزء من المعقد مع زيادة بقاء مدة أطول في الطبقة العضوية.



الشكل (6) تأثير زمن التفاعل في تكوين المعقد PRZH-Fe(II)

6- زمن الاستخلاص:

تم تحديد زمن الاستخلاص للمعد المتكون بعد ان اخذت كميات متساوية من ال (PRZH) في قمع الفصل في كل مرة مع تثبيت الظروف الفضلى الاخرى وتغيير زمن رج الطورين من (في قمع الفصل في كل مرة تثبيت الظروف المثلى الاخرى وتغيير زمن رج الطورين من (30 ثانية الى 120 ثانية) وقياس الممتصية . من خلال ملاحظة منحنى استخلاص المعد الكلابي من الطور المائي الى الطور العضوي مع الزمن ، الشكل (7) نجد ان تزداد بازدياد زمن الرج حتى تصل الى زمن يظهر خلاله مستوى افقي يدل على استقرارية قيم الممتصية بمرور الزمن ،لذا تم اختيار دقيقة واحدة كافضل مدة للرج واستكمال عملية الاستخلاص للمعد المتكون



الشكل (7) تأثير زمن الاستخلاص في امتصاصية المعد PRZH-Fe(II)

7- كفاءة الاستخلاص :

تم تحديد هذا العامل بعد بزل الطبقة العضوية في المرحلة الاولى تماما ثم سحب الطبقة المائية الى قمع الفصل اخر نظيف وجاف يتبعها اضافة حجم مساوي لة من المذيب العضوي وتطبيق الظروف المثلى وقياس ممتصية المعد المتكون في الطبقة العضوية الثانية .

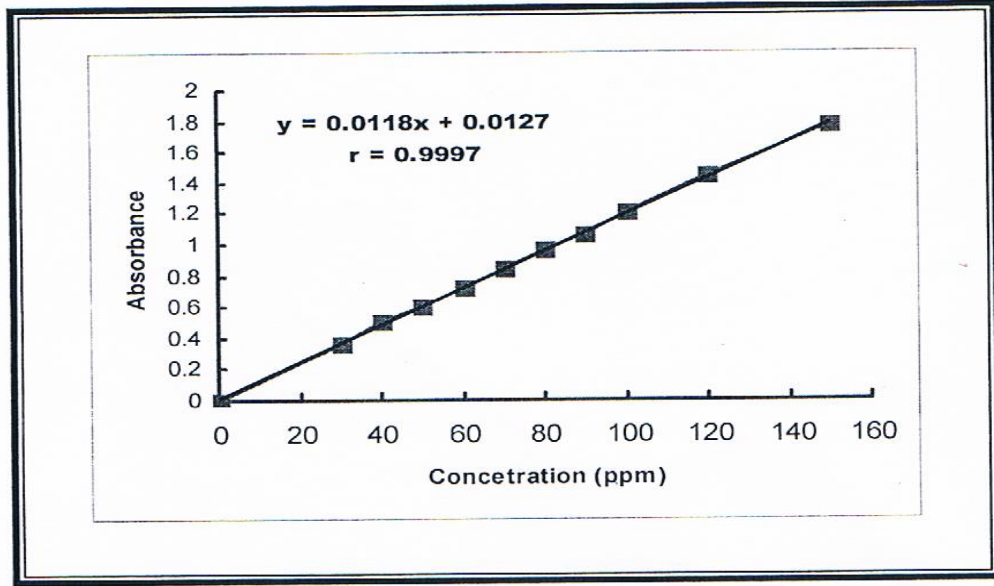
8- المذيبات العضوية المستخدمة في استخلاص المعد:

لقد تمت دراسة المذيبات العضوية المستخدمة في استخلاص المعد المتكون مثل 1-2 ثاني كلوروايثان، البنزين، الهكسان الحلقي، الهكسان، بنزل الكحول، الكلوروفورم، رباعي كلوريد الكربون ، اوكتانول، تولوين، مثل ايزوبيوتيل كيتون، زايلين، اسيتيل اسيتون، وغيرها من المذيبات ، بعد ملاحظة كفاءة هذه المذيبات في استخلاص المعد المتكون وتحديد المناسب منها.

1-2-3 تحضير منحنى المعايرة بتعين (PRZH) بهيئة PRZH – Fe(II) :

نقلت حجوم تراوحت بين (0.15-0.75) مل من (PRZH) ذي التركيز (1000) جزء من المليون الى دورق حجمي سعة 5مل ثم اضيف الى كل منها 0.25 مل من المحلول القياسي من الحديد ذي التركيز (1000) جزء من المليون عند الظروف العملية المثلى . اكمل الحجم الى 5 مل واستخلص المعد ب 3 مل من Benzyl.alcohol قيس الامتصاصية عند الطول الموجي الاعظم امتصاصية (472) نانوميتر ورسم منحنى المعايرة مقابل تركيز (PRZH) . من خلال الشكل (8) يبين ان منحنى المعايرة المباشرة لتعيين الدواء على هيئة PRZH-Fe(II) ، اذ وجد ان اقصى تركيز يطيع قانون بير لامبر يصل الى (150 مايكروغرام.ما⁻¹) ثم يبدأ المنحنى بالانحراف تجاة احدائي التركيز وقد يعزى سبب ذلك الى التاثر بين جزيئات المعد بعضها مع بعض او

مع المذيب ، او قد تعود الى عوامل الية او تكون بعض البوليمرات عند زيادة تركيز الدواء التي تعطي بالنتيجة امتصاصية واطنة تسبب انحراف هذه المنحنيات .



الشكل (8) منحنى المعايرة المباشرة لتعدين PRZH مع ايون الحديد

4-2-1-1 تعين دواء PRZH في المستحضر الصيدلاني Phenergan طيفيا على هيئة PRZH-Fe(II)

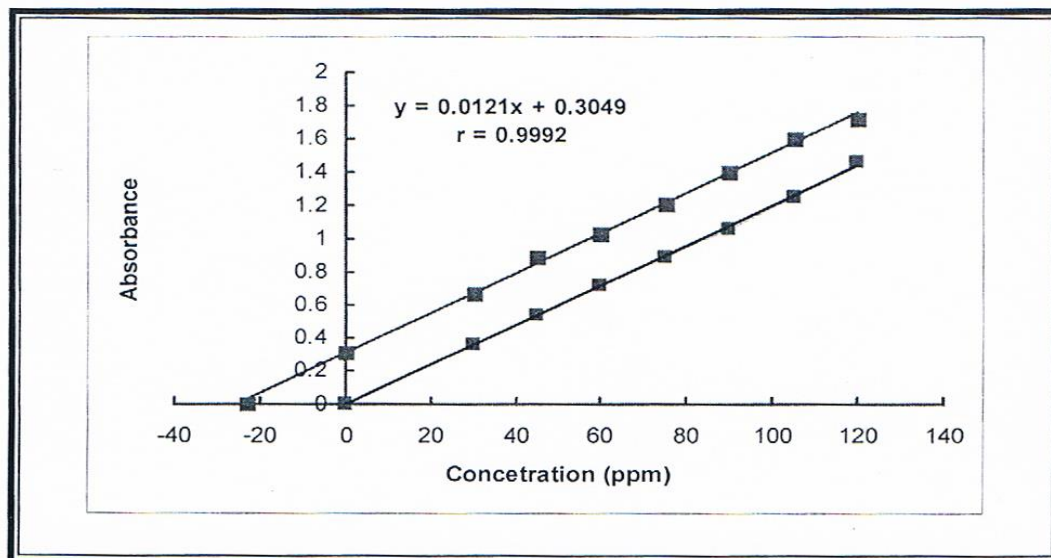
1- الطريقة المباشرة :

تم طحن (20 حبة) من عبة الدواء معدل وزن الحبة (0.2361 غم) بصور جيدة بوساطة هاون عقيقي ، ثم اذيب (0.2361 غم) من المسحوق الناتج في الماء ورشح ثم خفف الراشح في دورق حجمي سعة 100 مل بالماء الى العلامة ومن الاخير نقلت حجوم تراوحت بين (0.4-2.1) مل الى دورق حجمي سعة 5 مل ، اضيف الى كل منها (0.25 مل) من المحلول القياسي للحديد (1000 جزء من المليون) ثم صببت الظروف المثلى وبعدها استخلص المعقد ب (3 مل) من Benzyl alcohol ثم قيست الممتصيات عند الطول الموجي (472) نانوميتر ، واستخرجت التركيز المقابلة من منحنى المباشر .

2- طريقة اضافات القياس:

تم تحضير محلول المستحضر الصيدلاني (Phenergan) كما في الطريقة الموصوفة في الفقرة 4-2-1 ت1) نفل حجم 0.6 مل الى كل من دوارق حجمية سعة 5 مل على التوالي (0.6, 0.525, 0.45, 0.375, 0.3,) من المحلول القياسي للدواء ذي التركيز (1000 جزء في المليون) وقد اتبعت الخطوات نفسها في الفقرة (3-2-1) لتعيين الدواء وبعدها استخلص المعقد ب 3 مل من Benzyl alcohol ثم قيست الممتصيات عند الطول الموجي الاعظم ورسم منحنى المعايرة ، باضافات القياس وحسب تركيز الدواء في عينة المستحضر

ومن خلال الشكل (3-13) اختيار اسلوبين للتعين ، الاول وهو اسلوب المباشر والمتضمن قياس الامتصاصية للمحلول المستخلص للمعقد المتكون لعدة تراكيز واستخراج التركيز من منحنى المعايرة المباشرة ، اما الاسلوب تآثاني وهو اسلوب التعيين باستخدام طريقة اضافات القياسات ، اذ جرى القياس عند الطول الموجي ($\lambda_{max}=472nm$) كما في الشكل (9)



الشكل (9) تعين PRZH في المستحضر الصيدلاني Phenergan وبطريقة اضافات القياس.

الاستنتاجات :

اظهرت الدراسة التي اجريت لتقدير العقار Proomethazine Hydrochloride (PRZH0) باستخدام تقنية ultraviolet تفوقا ملحوظا على الكثير من الطرائق الاخرى من حيث الدقة والحساسية وسرعة التحليل.

اظهرت النتائج التحليلية للطريقة الطيفية الجزيئية للعقار PRZH تفوقا على الطرق المطروحة من حيث الحساسية والخطية وسرعة التحليل.

References

1-Kirk-Othmer

(1984), 'Encyclopedia of chemical Technology "3rd ed, Wilwy-Interscience publication, John Wiley and Sons, V.10 P930 .

2-Asplund K .Hagg E, and Lindqvist.M (1982), Phenothiazinedrugs and pituitary tumours (letter) .Ann Intern Med, 96:533.

3-Internatinal poregramme on Chemical Ssfety (IPCS) Cited in an internet review.

4-S.Dollbery, H. Hurvitz, & E. Kerem (1989), Hallucinations and hyperthermia after promethazine ingestion .Acta paediatr Scand 78:131-132.

5-M.A.Koupparis (1986), A. Barcuchova, Analyst (London), 1119(3), 313-318, 1986. [Anal. Abstr. 48, 10E61.

6-M.K.Srivastava, D.Singh S.Ahmad, I.C (1887), Shukla, Acta Cienc. Indica (Ser) Chem., 11c(4), 225-228, 1985 [Anal. Abstr., 49, 9E45.

7-W.Szabolcs (1980), Actapharm. Hung., 50(3), 130-136, 1980 [Anal. Abstr. 39, 5E4.

8-A.Kojlo, H.Puzanowska-Tarasiewicz, J.M.Calatayud (1993), Anal Lett., 26, 593-604.

- 9-A.Kojlo,J.M.Calatayud (1995),Talanta,42,909-913.
- 10- J.Seetharamappa,B.K.Shubha, P.Nagaraja,Indian (1996), Journal of pharmaceutical Sciences,58(6),258-61.
- 11- A.Mohamed (1997),Talanta,44(7),1173.
- 12- H.D.Revanasiddasppa and P.G. Ramappa (1996),Talanta,43(1),1291.
- 13- A.F.Youssef. S.R.EL-Shabouri,F.A.Mohamed,A.M.I.Rageh (1987),J.Assoc.Off. Anal.Chem., 69(3), 53-518, 1986.[Anal.Abstrl.49,2E33.
- 14-P.G.Ramappa, H.S.Gowda,A.N.Nayak, Microchem (1984), J.,28(4),586-594,1983.[Anal.Abstr.,46,8E47.