------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 3، ص 88-101،2011------

التقدير الطيفي للسلفاسالازين بالاقتران مع بارا- نتروأنيلين المؤزوت التطبيق على بعض المستحضرات الصيدلانية

نسيم ميسر عبد حميد
قسم الكيمياء
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 14/ 2 / 2011 ؛ تاريخ القبول 16 / 5 / 2011)

الملخص

تم تطوير طريقة طيفية سهلة لتقدير السلفاسالازين، تعتمد الطريقة على اقتران سلفاسالازين مع الكاشف بارا - نتروانيلين المؤزوت في وسط قاعدي لتكوين صبغة ازوية ذات لون اصفر - برتقالي، أعطت أعلى امتصاص عند الطول الموجي 452 نانوميتر، وأمكن تطبيق قانون بير في حدود تركيز من 5 إلى 700 مايكروغرام سلفاسالازين في حجم نهائي 25 مل، (0.2 الى 28 جزء / المليون) وكانت قيمة معامل الامتصاص المولاري 2.88×10^4 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة ساندل 0.0138 مايكروغرام. سم$^{-2}$ والخطأ النسبي من 0.99 إلى 1.0 % والانحراف القياسي النسبي 0.03 ± إلى 1.09 ± % وقد تم تطبيق الطريقة لتقدير السلفاسالازين في المستحضرات الصيدلانية (حبوب).

Spectrophotometric Determination of Sulfasalazine by Coupling with Diazotized p-Nitroaniline - Application to Pharmaceutical Formulations

Nassim M. Hameed
Department of Chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

A simple spectrophotometric method for the determination of sulfasalazine has been developed. The method is based on the coupling reaction of sulfasalazine in basic medium with diazotized p-nitroaniline, to form a yellow – orange water soluble azo dye that shows

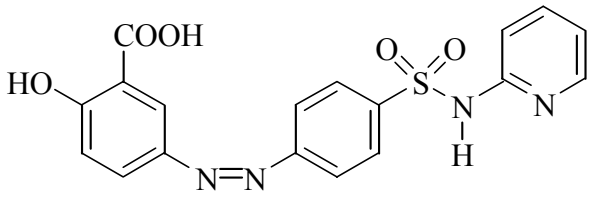
maximum absorption at 452 nm. Beer's law is obeyed over the concentration range 5-700 µg of sulfasalazine in a final volume of 25 ml, i.e, (0.2-28 ppm) with a molar absorptivity of 2.88×10^4 $1.mol^{-1}.cm^{-1}$ and Sandell's sensitivity index of 0.0138 µg. cm^{-2}, a relative error of 0.99 to 1.0 % and a relative standard deviation of ±0.03 to ±1.09% depending on the concentration level. The proposed method has been applied to assay of sulfasalazine in pharmaceutical formulations (tablets).

المقدمة

يعد السلفاسالازين من السلفوناميدات غير الذائبة في الماء (British Pharmacopia , 2002)، والمشتق من الـ mesalazine (5-amino salicylic acid) والاسم الشائع له Azulifidine في الولايات المتحدة و Salazopyrin في اوربا (Mcgirt *et al.*, 2006). وله عدة أسماء علمية منها :

5- ([p-(2-Pytidy sulfamoyl) phenyl] azo) salicylic acid أو Salicylazo Sulphapyridine أو
2- hydroxyl -5-[[4-[[pyridine-2- y1]amino] sulphonyl Phenyl] azo] benzoic acid

ويمتلك الصيغة الكيميائية المذكورة أدناه [British Pharmacopia, 1998] :



$C_{18}H_{14}N_4O_5S$
$M.wt=398.4\ g.mol^{-1}$

وله عمر نصف في البلازما من 5 إلى 10 ساعات تقريباً. وهو عبارة عن مسحوق بلوري اصفر اللون لا يذوب في الماء وضعيف الذوبان في الكحول ويذوب في القواعد القوية المخففة (Cantarini *et al.*, 2007).

يصنف السلفاسالازين من السلفوناميدات المضادة للالتهابات، إذ يستخدم في معالجة بعض الالتهابات منها التهاب القولون القرحي والتهاب المفاصل الروماتويدي (Rossum *et al.*, 1998).

تم تقدير السلفاسالازين بالعديد من الطرائق التحليلية فقد قدر في السوائل البايولوجية باستخدام تقنية كروماتوغرافي السائل عالي الأداء (HPLC) و كانت الطريقة ذات انتقائية وحساسية عالية بالاضافة الى كونها سريعة وبلغ المدى الخطي من 0.5 إلى 25 مايكروغرام /مل مع انحراف قياسي نسبي من 1 إلى 7.9% واستخدم الطول الموجي 254 نانوميتر في التقدير (Chungi *et al.*, 1998) وقدر في بلازما الدم

باستخدام تقنية الـ HPLC- ESI-MS/MS ، إذ كانت حدود الكميات المقدرة من0.5 إلى 2.0 نانوغرام/ مل ونسبة الاستعادة بين 83 و 119% وقد تـم تطبيـق الطريقـة بنجـاح فـي مستحـضراته الـصيدلانية (Patel *et al.*, 2010).

وصفت العديد من الطرائق الطيفية لتقدير السلفاسالازين ومن هذه الطرائق تقـدير الـسلفاسالازين بالاعتماد على تفاعل مجموعة الفينول الموجودة فـي الـدواء مـع الكاشـف (Fast red B salt) بوجـود هيدروكسيد الصوديوم وقيس الامتصاص عند (460) نانوميتر ووجد ان الطريقة تتبع قانون بير ضمن مدى تركيز من2.5 إلى 13.75 مايكرغرام / مل وقيمة معامل الامتصاص المولاري 2.961×10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$ وطبقت الطريقة بنجاح في تقدير السلفاسالازين في المستحضرات الـصيدلانية [Khier *et al.*, 2008]. كما وتم تقديره طيفيا في مستحضراته الصيدلانية وذلك باستخدام تفاعلات انتقال الشحنة ما بين السلفاسالازين (SS) بوصفه مانحا للالكترونات وبعض المستقبلات مثل :

2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone[(SS)(DDQ)],p-chloranil [(SS) (CHL)] , Picric acid [(SS)(PA)], and Iodine$[(SS)_2I]^+.I^-_3$

فـي مـحاليل الـكلوروفورم أو الـميثانول إذ وجـد أن نـسبة الاتـحاد للـمعقدات الـناتجة هـو 1:1 (Refat *et al.*, 2010). كما استخدمت طريقة طيفية سهلة وحساسة لتقدير السلفاسالازين فـي مستحـضراته الصيدلانية تعتمد الـطريقة على تكوين نواتج ملونة مع الكواشف الكروموجينية وقـيس الامتـصاص عنـد الطول الـموجي (552) نانوميتر وكانت حدود الكميات المقدرة حوالي من 0.25 إلى 12 مايكروغرام / مل ونـسبة الاستعادة 102% (Bugge *et al.*, 2007).

وقدر السلفاسالازين أيضا باستخدام مطيافية FT-Raman (Watts *et al.*, 1999) وكـذلك باسـتخدام طيف الأشعة تحت الحمراء (Jacobsson *et al.*, 1995). كذلك تم تقدير السلفاسالازين باستخدام الطرائـق البولوغرافية (Nygard *et al.*, 1988).

تم في هذا البحث تطوير طريقة طيفية جديدة وبسيطة لتقدير السلفاسالازين وذلك من خلال اقترانه مـع الكاشف بارا – نتروانيلين المؤزوت في وسط قاعدي لاعطاء صبغة ازوية مستقرة لها اقصى امتصاص عند الطول الموجي 452 نانوميتر.

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة :

تمت القياسات الطيفية بواسطة جهاز المطياف الضوئي ذي الحزمة الواحدة نـوع (CECIL-CE1021 digital single beam spectrophotometer) والمطياف الضوئي ذي الحزمتين من نوع Shimadzu UV-160A وباستخدام خلايا زجاج ذات عرض 1سم وقيست الدالة الحامضية باستخدام جهاز الدالـة الحامـضية PW9421pH meter PHILIPS مزود بقطب من نوع CE1 PHILIPS.

المحاليل والمواد الكيمياوية المستخدمة :

كانت المواد الكيميائية جميعا على درجة عالية من النقاوة.

- **محاول السلفاسالازين 100 مايكروغرام .جمل $^{-1}$:**

يحضر بإذابة 0.01غم من السلفاسالازين النقـي في 0.5 مل من محلـول هيدروكسيـد الصوديـوم (1 عياري) وأكمل الحجم بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة (100) مل ويحفظ هذا المحاول في قنينة ذات لون داكن ويكون هذا المحاول مستقراً لمدة (10) ايام على الأكثر.

- **محاول حامض الهيدروكلوريك (1 عياري) :**

حضر هذا المحاول بتخفيف مناسب للحامض المركز عالي النقاوة.

- **محاول نتريت الصوديوم (1%) :**

حضر هذا المحاول باذابة 1غم من نتريت الصوديوم بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مللتر قي قنينة حجمية يحفظ هذا المحاول في قنينة داكنة ويكون مستقرا لمدة اسبوعين.

- **محاول بارا– نترو انيلين المؤزوت (5 ملي مولار) :**

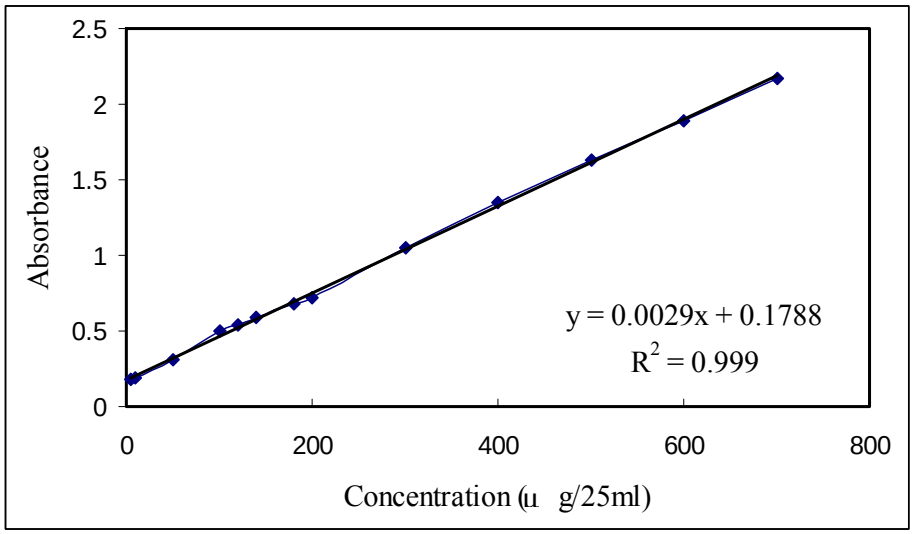
حضر هذا المحاول باذابة (0.1727) غم من المركب النقي في (50) مل ماء مقطر بعد ذلك يـضاف (20) مل من حامض الهيدروكلوريك (1 عياري) مع التسخين وثم ينقل المحاول الى قنينة حـ ـجمية سـعة (250) مل. يبرد المحاول إلى درجة حرارية من 0 إلى 5°م في الثلج. ويضاف 8.65 مـل مـن محلـول نتريت الصوديوم 1% مع الرج لمدة (10) دقائق ويكمل الحجم بالماء المقطر البارد، ويحفظ المحلـول فـي قنينة ذات لون داكن في الثلاجة ويكون المحاول مستقراً على الأكثر لمدة شهر واحد (Othman, 2001).

محاول هيدروكسيد الصوديوم (2 عياري) :

يتم تحضير هذا المحاول باجراء تخفيف للقنينة الحجمية البلاستيكية المركزة بالماء المقطر الـى (500) مل باستخدام قنينة حجمية ويحفظ في قنينة بلاستيكية.

- **طريقة العمل المعتمدة والمنحني القياسي :**

اعتماداً على الظروف المثلى التي تم التوصيل إليها تمت إضافة حجوم متزايدة من 0.05 الى 7.0 مـل من محلول السلفاسالازين بتركيز (100جزء /مليون)، إلى مجموعة من القناني الحجمية سعة 25 مللتـر ثـم إضافة 4 مللتر من بارا – نتروانيلين المؤزوت ثم 3 مللتر من هيدروكسيد الصوديوم (2 عياري) ثم يكمـل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة. وتم قياس شدة الامتصاص لها مقابل المحلول الـصوري عنـد طـول موجي (452) نانوميتر وبرسم قيم الامتصاص مقابل التركيز تم الحصول على المنحنـي القياسـي لتقـدير السلفاسالازين الشكل (1) والذي يكون موافقاً لقانون بير في مدى التركيز من 5 الى 700 مايكروغرام /25 مل أي (0.2-28) جزء /مليون، وهناك انحراف سالب في التراكيز الأعلى من 700 مايكروغرام /25 مل.



الشكل 1 : المنحني القياسي لتقدير السلفاسالازين باستخدام الكاشف بارا– نتروانيلين المؤزوت .

بلغت قيمة معامل التقدير 0.999 مما يدل على أن المنحني القياسي يمتلك مواصفات خطية جيدة ، وتم حساب الامـتصاصية المولارية فوجد أنها تساوي (2.88×10^4) لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة سـاندل (0.0138) مايكروغرام.سم$^{-2}$ مما يدل على الحساسية العالية للطريقة.

- **تحليل اقراص السلفاسالازين :**

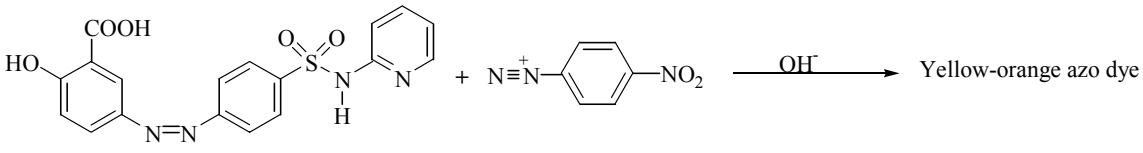
تم وزن محتوى 10 اقراص من السلفاسالازين وبعد سحقها جيـداً وزن مايكـافئ 0.01 غـم مـن السلفاسالازين وثم اذابته بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (2 عياري) ويرشح المحلول ثم يخفف الـى (100) مل بالماء المقطر في قنينة حجمية، ثم اخذت حجوم مختلفة من هذا المحلول ووضعت في قنانٍ حجمية سـعة (25) مل واضيفت لها الحجوم المثالية من كاشف بارا – نتروانيلين المؤزوت والقاعدة وأكمل الحجم بالمـاء

المقطر الى حد العلامة وتم ايجاد تركيز الـسلفاسالازين للقـرص الواحـد باسـتخدام المنحنـي القياسـي السلفاسالازين النقي.

النتائج والمناقشة

مبدأ الطريقة :

يتفاعل السلفاسالازين مع البارا – نتروانيلين المؤزوت في وسط قاعدي لإعطـاء صـبغة ذات لـون اصفر – برتقالي :



دراسة الظروف المثلى للتفاعل :

تمت دراسة الظروف التي تؤثر في امتصاص الصبغة المتكونة وعلى التباين اللوني للحصول علـى افـضل ظروف وتم استخدام 1.0 مللتر من محلول السلفاسالازين بتركيز 100 جزء/ مليون في حجم نهائي 25 مللتر للتجارب اللاحقة .

تأثير كمية البارا– نتروانيلين المؤزوت :

تم استخدام الكاشف المؤزوت بارا – نتروانيلين الأقوى الكتروفيلياً وذلك لوجود مجموعة النايترو القويـة الساحبة للالكترونات بالاضافة الى ان الصبغات الناتجة تكون ذات لون غامق (وجـود مجموعـة النـايترو الرنينية)، كما ان الكاشف البارا – نتروانيلين المؤزوت يعطي تفاعلاً اقترانياً أكثر حساسية مع الـ ـمكونات الاروماتية، اللون الاصفر الـشاحب (الـفاتح) للـكاشف يـعطي قيـماً أوطـأ للـ ـمحلول الـ ـصوري (Dongre *et al.*, 2008)، (Rahim *et al.*, 1986).

الجدول 1: تأثير كمية الكاشف المؤزوت بارا – نتروانيلين.

ml of (5mM) diazotized reagent	Absorbance/µg of sulfasalazine					r^2
	50	100	150	200	250	
2	0.291	0.429	0.567	0.723	0.878	0.999507
3	0.461	0.548	0.710	0.851	0.992	0.996533
4	0.310	0.480	0.609	0.780	0.910	0.999559
5	0.335	0.501	0.601	0.780	0.930	0.99721

من الجدول أعلاه يتبين انه يفضل استخدام (4) مل من الكاشف المؤزوت بارا–نتروانيلين لانه أعطى أعلى امتصاص وأعلى قيمة لـ r^2 .

تأثير كمية القاعدة :

تمت دراسة تأثير كميات مختلفة من انواع عديدة من القواعد على شدة لون الصبغة المتكونة والنتائج موضحة في جدول (2) .

الجدول 2: يوضح تاثير كمية القواعد المختلفة.

Base soln. used (2N)	Absorbance/ml of base used				
	1	2	3	4	5
NaOH	0.484	0.501	0.519	0.512	0.510
KOH	0.488	0.490	0.510	0.508	0.510
Na_2CO_3	0.390	0.421	0.432	0.428	0.422
$NaHCO_3$	0.201	0.214	Turbid	Turbid	Turbid

يتبين من الجدول (2) أن استخدام (3) مل من محلول (2 عياري) هيدروكسيد الصوديوم تعطي أعلى امتصاص للصبغة الناتجة لذلك تم استخدام هذا الحجم في التجارب اللاحقة.

تأثير عوامل الشد السطحي :

تمت دراسة تاثير بعض المواد الفعالة سطحياً (الموجبة والسالبة والمتعادلة) على صفات الصبغة الناتجة والموضحة في جدول (3) وذلك بإضافة (3) مل من كل مادة فعالة سطحيا وبتسلسلات مختلفة.

الجدول 3 : يوضح تأثير عوامل الشد السطحي.

Surfactant soln. used M	Absorbance/order of addition		
	I	II	III
CTAB, 1×10^{-3}	0.439	0.450	0.461
SDS, 1×10^{-3}	0.501	0.508	0.515
CPC, 1×10^{-3}	0.483	0.494	0.493

A= Without surfacant = 0.519
I = Sulfasalazine (S) + Surfactant (C) + Diazotized reagent (R) + NaOH (B)
II = S + R + C + B
III = S + R + B + C

يتبين من نتائج الجدول (3) أن إضافة عوامل الشد السطحي لاتحسن من صفات الصبغة الناتجة لذلك استبعد إضافته في التجارب اللاحقة.

تأثير تسلسل الإضافة :

تمت دراسة تأثير تسلسل الإضافة لمكونات التفاعل على امتصاص الصبغة الناتجة كما هو موضح في الجدول (4).

الجدول 4 : يوضح تأثير تسلسل الإضافة.

Order	I	II	III
Absorbance	0.519	0.488	0.503

I= Sulfasalazine (S) + Diazotized p-nitroaniline (R) + NaOH (B)
II= S + B + R
III= R + B + S

من النتائج في الجدول (4) نلاحظ ان التسلسل (I) المتبع في طريقة العمل هو المفضل إذ أعطى أعلى قيمـة للامتصاص لذلك استخدم في التجارب اللاحقة.

استقرارية التفاعل:

تم تتبع استقرارية التفاعل من خلال قياس امتصاص المحلول الملون بعد فترات زمنية مختلفة والنتائج موضحة في الجدول (5).

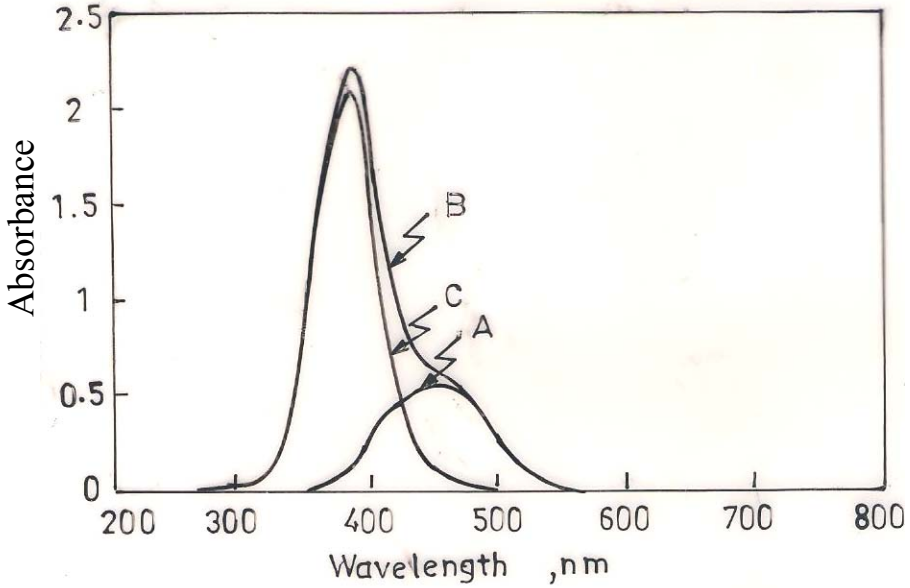
الجدول 5 : تأثير الزمن على الامتصاص.

µg of Sulfasalazine	**Absorbance / min. standing time**						
	0	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**
20	0.220	0.222	0.224	0.224	0.224	0.224	0.224
100	0.514	0.518	0.518	0.519	0.519	0.519	0.519
200	0.801	0.803	0.804	0.804	0.804	0.806	0.806
300	1.050	1.051	1.052	1.052	1.052	1.052	1.052

ومن نتائج الجدول (5) يتبين ان الصبغة الملونة تتكون مباشرة بصورة تامة وتبقى مستقرة لمدة سـاعة واحدة على الاقل.

طيف الامتصاص النهائي :

عند إضافة كاشف البارا – نتروانيلين المؤزوت الى المحلول الحاوي على السلفاسالازين تحت الظـروف المثلى تجريبياً، تتكون صبغة ازوية ملونة ذات لون اصفر – برتقالي وتعطي اعلى امتصاص عنـد الطـول الموجي (452) نانوميتر مقارنة بالمحلول الصوري الذي يعطي امتصاصا ضعيفا عند الطول الموجي اعلاه.



الشكل 2 : طيف الامتصاص النهائي للصبغة الناتجة.

A= امتصاص المحلول الناتج ضد المحلول الصوري.

B= امتصاص المحلول الناتج ضد الماء المقطر.

C= امتصاص المحلول الصوري ضد الماء المقطر.

الدقة والتوافقية :

أمكن معرفة الدقة والتوافقية للمنحني القياسي بتطبيق طريقة العمل المعتمدة في إيجاد المنحني القياسي لثلاثة تراكيز مختلفة (600,400,100) مايكروغرام من السلفاسالازين (لكل منهما 5 قراءات) وكما موضـح في الجدول (6)، الذي يعكس المواصفات التحليلية الجيدة للطريقة المستخدمة في التقدير.

الجدول 6: التوافقية والدقة للطريقة.

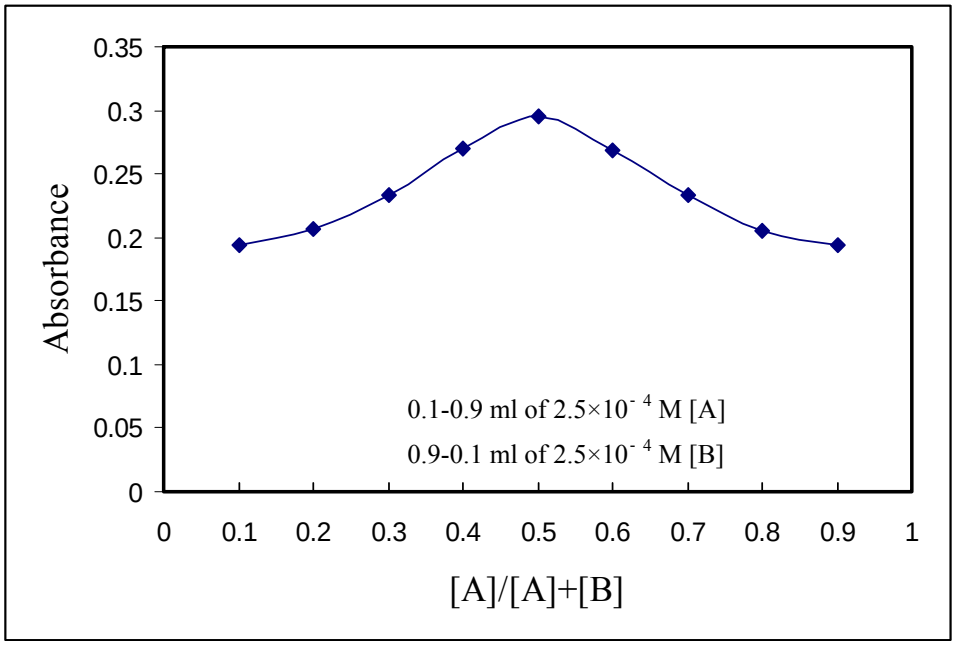
Amount of sulfasalazine taken µg/25ml	Amount of sulfasalazine found µg/25ml	Relative *error, %	Relative standard *deviation, %
100	100.1	-0.07	±1.09
400	399.2	0.05	±0.03
600	598.2	-0.05	±0.03

* معدل خمس قراءات .

تشير نتائج جدول (6) ان الطريقة ذات دقة وتوافقية جيدة.

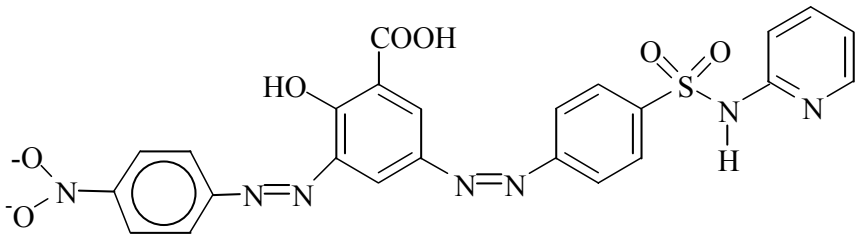
طبيعة الصبغة المتكونة :

تم اعتماد طريقة التغيير المستمر Continuous variations method (Job's method) (خليل، 1994) لمعرفة نسبة تفاعل السلفاسالازين [A] مع الكاشف [B] ، إذ تؤخذ قراءات امتصاص المحاليل التي تحتوي على كميات من السلفاسالازين (0.1-0.9) مل والكاشف (0.9-0.1) مل وبتركيز (2.45×10^{-4}) مولاري لكل منهما وتم قياس الامتصاص وفق الطريقة المعتمدة مقابل المحلول الصوري عند طول موجي (452) نانوميتر ولوحظ أن نسبة اقتران السلفاسالازين مع الكاشف هي نسبة 1:1 كما في الشكل (3).



الشكل 3: منحني التغيير المستمر (طريقة جوب) للصبغة الازوية المتكونة .

استناداً إلى النتائج في الرسم (3) يكون الشكل المقترح للصبغة الازوية المتكونة كـما موضح أدناه:



Yellow - orange azo dye

تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية :

تم تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية للسلفاسالازين (حبوب) والنتـائج موضـحة فـي الجدول (7).

الجدول 7: تطبيق طريقة الازوتة لتقدير السلفاسالازين في مستحضراته الصيدلانية.

Pharmaceutical preparation	Manufacuturing company	µg Sulfasalazine present	µg Sulfasalazine measured	Recovery (%)*
Salazopyrin (500 mg sulfasalazine / Tablets)	Pharmacia AB (Germany)	100	100.1	100.1
		400	399.2	99.8
		600	599.2	99.8
Salazopyrin (500 mg sulfasalazine / Tablets)	P fizer (USA)	100	99.4	99.4
		400	392	98.0
		600	598.2	99.7
Salazopyrin (500 mg sulfasalazine / Tablets)	Eipico (Egypt)	100	100.3	100.3
		400	396	99.0
		600	598.2	99.7

* معدل 5 قراءات.

تشير النتائج إلى الدقة العالية للطريقة في تقدير السلفاسالازين في الأقراص الدوائية.

مقارنة الطريقة

تمت مقارنة بعض من الصفات الضوئية للطريقة المقترحة مع طريقة طيفية حديثة منشورة بالأدبيات والجدول (8) يبين تلك المقارنات:

الجدول 8 : مقارنة طرائق تقدير السلفاسالازين.

Parameter	Present method	*Fast red B salt
Temperature (C°)	At room temp.	- - -
pH	Alkaline medium	Alkaline medium
Development time (min)	Directly	5 min
λ max (nm)	452	460
Reagent used	Diazotized p-nitroaniline	Fast red B salt
Beer's law range (ppm)	0.2-28	2.5-13.75
Molar absorplivity ($1. mol^{-1}.cm^{-1}$)	2.88×10^4	2.69×10^4
Er,%	≤1.0	- -
RSD,%	≤1.09	±0.624
Stability of the color (Minutes)	60	- -
Colour of the dye	Yellow- orange	- -
Application of the method	In pharmaceutical preparations (tablet)	In pharmaceutical preparations (tablet)

*(Khier *et al.*, 2008)

من النتائج المثبتة في الجدول (8) يتضح ان الطريقة المقترحة تمتاز بالحساسية العالية .

الاستنتاج

تم تطبيق تفاعل الأقتران الازوي في تطوير طريقة طيفية سريعة وحساسة لتقدير الـسلفاسالازين فـي المحاليل المائية. وتعتمد الطريقة على إقتران السلفاسالازين في الوسط القاعـدي مـع بـارا – نتـروأنيلين المؤزوت لينتج صبغة ازوية ذائبة في الوسط المائي ذات لون اصفر – برتقالي يمكن متابعتها طيفيـاً، وتـم تطبيق الطريقة بنجاح في تقدير المركب قيد الدراسة في المستحضر الصيدلاني(الحبوب) مـن دون عمليـة فصل مسبق للمكونة المراد تقديرها.

المصادر العربية

خليل ، نبيل فاضل (1994) . "الكيمياء التحليلية لطلبة الزراعة والغابات". دار الكتـب للطباعـة والنـشر، جامعة الموصل، العراق، ص341.

المصادر الأجنبية

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

British Pharmacopia on CD-ROM, (1998), 2nd edn., The Stationary office, London.

Bugge, C. J. ; Gautam, S. R; Parke, L. E. ; Mason, J. T.; Gorcia, D.B. (2007) . A new sensitive and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfasalazine in pharmaceutical formulations. *Micro. chim. Acta*, **163**, 313-320.

Cantarini, L.; Tinazzi, I.; Biasi, D.; Fioravanti, A.; Galeazzi, M. (2007). Sulfasalazine induced immune thrombocytopenia, postgraduate. *Med. J*., **83**, 980-985.

Chungi, V.S.; Ekhil, G. S.R.; Shargel, S. (1998). A simple and rapid liquid chromatographic method for determination of sulfasalazine in biological fluids. *J. Pharm. Sci*., **78**, 235-238.

Donger, V. G.; Karmuse, P.P.; Pilla, P. R.; Kumar, A. (2008). Characterization of sulfasalazine interference in the measurement of conjugated bilirubin by the ektachem slide method. *Clin. Chem*., **35**, 1760-1765.

Jacobsson, S.P. ; Carlsson, M.; Nilsson, G. (1995). Quantitative determination of sulfasalazine by near-infrared spectroscopy reflectance mode with a fiber-optic probe. *J. Pharm. Biomed. Anal*., **13**, 415-417.

Khier, A. A.; Elhenawee, M. M. ; Elmasry, M.S. (2008). Spectrophotometric method for the determination of some drugs using fast red B Salt. *Coden Ecjhao*., **5** (S2), 1087-1097.

Mcgirt, L. Y.; Gober, L. M.; Sarbjit, M. D.; Saini , S.S.; Beck, L. A. (2006). Successful treatment of racalcitrant chronic idiopathic urticaria with sulfasalazine . *Arch. Dermatol.*, **142**, 1337-1342.

Nygard, B.; Olofsson, J. ; Sandberg, M. (1988). Determination of salicylazosulphapyrdine by polarography. *Acta. Pharm. Suec*., **3**(5), 343-352.

Othman, N.S. (2001). A continued Investigation of Spectrophotometric Diazometry, Ph. D., Thesis, Mosul University. p. 22

Patel, K.M.; Patel, C. N.; Panigrahi, B.; Parikh, A. B. Patel, H.N. (2010). Development and validation of a HPLC-ESI-MS/MS method for the determination of sulfasalazine in human plasma. *J. Young Pharm*., **3**, 284-288.

Rahim, S.A.; Ismail, N. D.; Bashir, W. A. (1986). Spectrophotometric Determination of anilie in aqueous solution by azo-dye formation with diazotized p-nitroaniline. *Mikrochim. Acta*,**111**,417-423.

Refat, M. S. ; El-Korash, S. A.; El-Deen, I. M.; El-Sayed, S. M. (2010) . Experimental and Spectroscopic Studies of Charge Transfer Reaction Between Sulfasalzine Antibiotic Drug with Different Types of Acceptors. *John Wily and Sons*. 178.

Rossum, V. M.; Mogadam, M.; Kaufmon, D. W. (1998). sulfasalazine in the treatment of juvenile chronic arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Arth. Rheum*. **41**, 808-816.

Watts , P.J.; Tudor, A.; Church, S.J .; Hendra, P. J.; Turner, P. Melia, C.D.; Davies, M. C. (1999). Fourier transform- Raman spectroscopy for the qualitative and quantitative of sulfasalazine containing polymeric microspheres. *Pharm Res*., **10**, 1323-1328.