



## تشکیل کمپلکس داکسی سایکلین-پالادیم: تعیین پارامترهای ترمودینامیکی به کمک برنامه KINFIT و تعیین مقدار دارو

مونا مسعودی، آذر باقری قمی\*

گروه شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۶/۱۱/۰۹، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۷/۰۲/۱۲، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۷/۰۳/۱۸

### چکیده

تشکیل کمپلکس بین یون  $Pd^{+2}$  و داکسی سایکلین در DMF با استفاده از روش طیف سنجی مرئی-فرابنفش در دماهای (۱۵، ۲۵، ۳۵ و  $45 \pm 0.1$ ) درجه سانتی گراد مطالعه شده است. روند تشکیل کمپلکس از لحاظ pH، دما و زمان، بهینه سازی شد. نسبت استوکیومتری (یون فلز / لیگاند) ۱:۱ به دست آمد. ثابت تشکیل کمپلکس و پارامترهای ترمودینامیکی به وسیله اطلاعات مربوط به روش نسبت مولی با کمک برنامه KINFIT بدست آورده شده است. همچنین از تشکیل کمپلکس فوق برای تعیین مقدار دارو و تعیین پارامترهای نوری استفاده شد.

واژه های کلیدی: داکسی سایکلین، پالادیم، KINFIT، طیف سنجی مرئی-فرابنفش.

### ۱. مقدمه

کمپلکس های فلزی نقش اساسی در کشاورزی، شیمی دارویی و صنعت دارند. آنها برای درمان بیماری های مختلف مثل سرطان، دیابت، بیماری های التهابی و قلب و عروق استفاده می شوند [۱-۳]. اتصال یون های فلزی به داروها تاثیر قابل توجهی بر روی بازدهی آنها دارد و بر فعالیت آنها تاثیر می گذارند. گزارش شده است که بسیاری کمپلکس های فلزی آنتی بیوتیک ها و تراسایکلین ها از خود آنتی بیوتیک فعالیت بیشتری دارند. تراسایکلین ها، عوامل متوقف کننده رشد باکتری با طیف وسیع هستند. این ترکیبات، داروی جایگزین پنی سیلین جی برای درمان سیفلیس و پیشگیری از سوزاک و سیفلیس می باشند. در تحقیقات مختلف تراسایکلین

\*عهده دار مکاتبات: آذر باقری قمی

نشانی: گروه شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: azar.bagheri@iauctb.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۲۲۲۳۸۲۲۳

ها تشکیل کمپلکس‌های مختلف با فلزات (Pd (II)، Cu (II)، Ni (II)، Co (II)، Mn (II)، Fe (II)، VO (IV) و غیره داده اند [۴-۶]. روش‌های مختلف برای تعیین داروها از جمله اسپکتروفوتومتری UV-Visible، فلوریمتری، روش الکتروشیمیایی کروماتوگرافی مایع گزارش شده است [۷-۱۸]. ساختار داکسی سایکلین به دلیل وجود بسیاری از سایت‌های احتمالی اتصال به فلز، پیچیده است. به دلیل اهمیت بیولوژیکی، برهم کنش آنها با منیزیم و کلسیم و برخی فلزات واسطه به طور گسترده مطالعه شده است. مطالعه در مورد کمپلکس‌های فلز-دارو دانش ما را در مورد تهیه داروهای با کارایی بیشتر، عمیق تر می‌کند. بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، کمپلکس داکسی سایکلین با یون فلزی پالادیم، برای تعیین ثابت تشکیل کمپلکس، K با کمک برنامه KINFIT [۱۹] مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از یک روش اسپکتروفوتومتری حساس برای تعیین داکسی سایکلین استفاده شد. این روش بر اساس تشکیل کمپلکس داکسی سایکلین-پالادیم بود. در این تحقیق تعیین مقدار دارو با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری بر اساس تشکیل کمپلکس رنگی بین ماده موثره و فرم دارویی داکسی سایکلین با پالادیم (II) کلرید انجام شده است.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱. مواد مورد استفاده

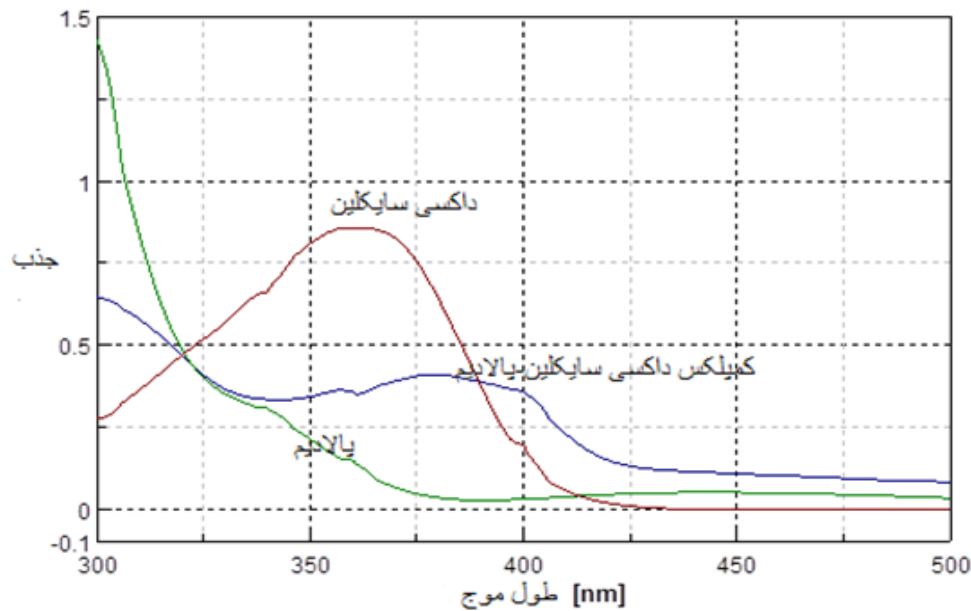
تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از جمله پالادیم (II) کلراید، سدیم استات، اسید استیک، داکسی سایکلین و... دارای خلوص تجزیه ایی بوده و از شرکت مرک تهیه شده است.

### ۲-۲. تهیه محلول‌ها

برای تهیه محلول پالادیم (II) کلراید، ۰/۰۲۵ گرم از پالادیم (II) کلراید را به دقت وزن کرده و در بالن ۵۰ میلی لیتری ریخته با استفاده از اولتراسونیک این مقدار را در ۲۰-۳۰ mL DMF حل کرده و به حجم می‌رسانیم تا محلولی به غلظت  $3 \times 10^{-4}$  M حاصل شود. برای تهیه بافرها از سدیم استات ۲M و اسید استیک ۲M و دستگاه pH متر استفاده شد. همچنین محلول ۰/۲٪ وزنی-حجمی سدیم لوریل سولفات در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

## ۳. نتایج و بحث

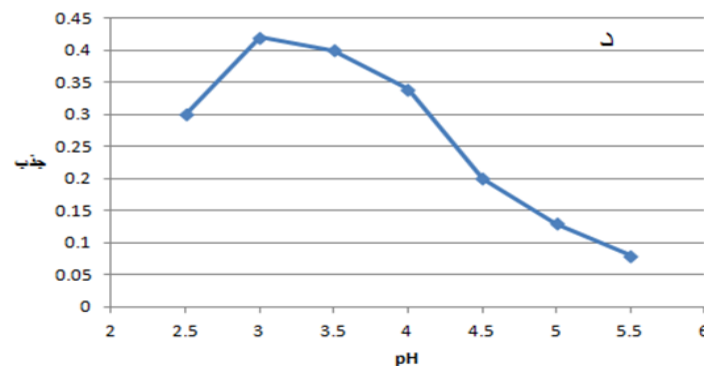
کوئوردینه شدن فلز به مولکول‌های فعال بیولوژیکی می‌تواند به عنوان طرحی برای افزایش فعالیت آنها مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، مطالعه ثابت‌های پایداری کمپلکس‌های فلزی داکسی سایکلین بسیار مهم است. در این تحقیق، واکنش داکسی سایکلین با کلرید پالادیم (II) در دماهای (۱۵، ۲۵، ۳۵ و  $45 \pm 0/1$ ) درجه سانتی‌گراد مورد بررسی واقع شده است. این کمپلکس DOXY-Pd، در ناحیه ۳۷۹ جذب دارد (شکل ۱). شکل گیری پایدار کمپلکس‌ها به طور عمده به شرایط واکنش بستگی دارد. برای ارزیابی ثابت‌های تشکیل کمپلکس‌ها، از برنامه KINFIT استفاده شده است.



شکل ۱. طیف‌های اسپکتروفتومتری UV-Vis داکسی سایکلین، پالادیم و کمپلکس آنها

### ۳-۱. بررسی اثر pH

برای تعیین pH بهینه، محلولهایی با غلظت  $10^{-4}$  مولار از دارو و غلظت  $3 \times 10^{-4}$  مولار از فلز با pH های مختلف در بالن ۱۰ ml تهیه و با DMF به حجم رسانده شد و پس از اعمال حرارت، جذب آنها را در  $\lambda_{max}$  اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود ماکزیمم جذب در  $pH=3$  رخ می دهد.

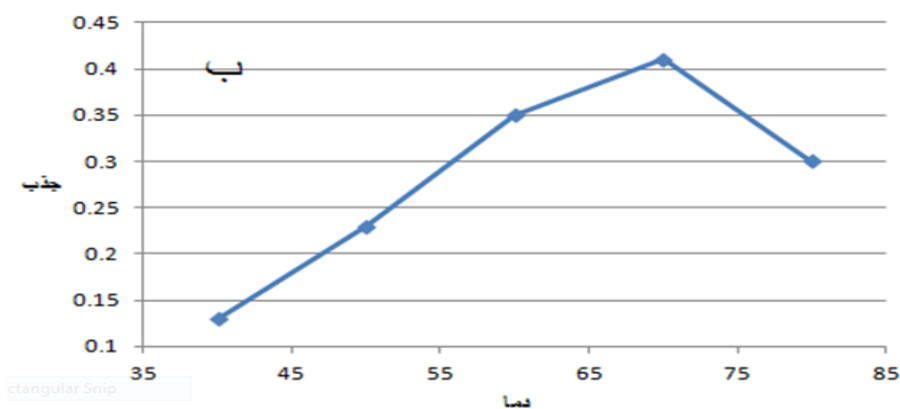


شکل ۲. اثر عوامل مختلف در تشکیل کمپلکس پالادیم-داکسی سایکلین

### ۳-۲. بررسی اثر دما

۳ ml از ماده اولیه داکسی سایکلین  $10^{-4}$  مولار را در بالن ۲۵ ml ریخته ۳ ml از محلول  $3 \times 10^{-4}$  M پالادیم II کلراید را به آن اضافه می کنیم. ۴ ml بافر با  $pH=3$  و ۱ ml از SLS را به آن می افزاییم. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه

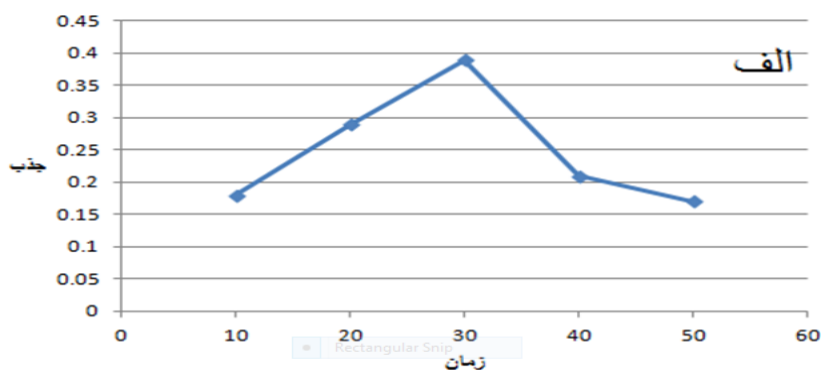
سانتیگراد قرار می دهیم. تغییر رنگ مشاهده می شود. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis  $\lambda_{max}$  کمپلکس را در ۳۷۹ nm مشاهده می کنیم. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود دمای بهینه  $70^{\circ}\text{C}$  است.



شکل ۳. اثر عوامل مختلف در تشکیل کمپلکس پالادیم-داکسی سایکلین

### ۳-۳. بررسی اثر زمان

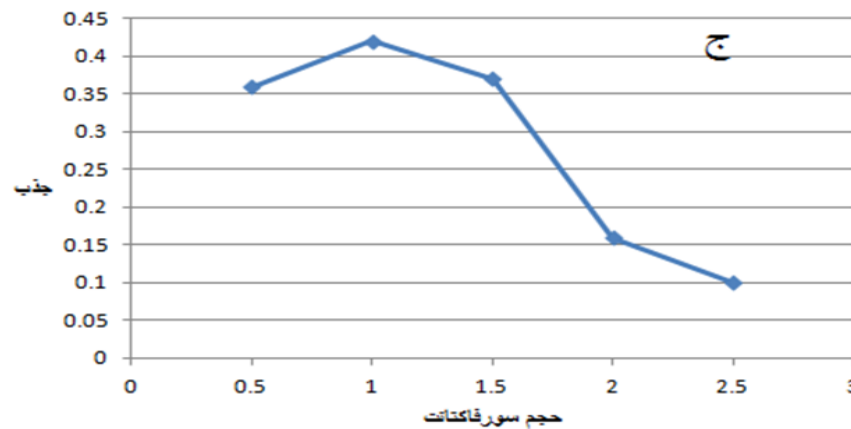
۳ ml از ماده اولیه داکسی سایکلین  $10^{-4}$  مولار را در بالن ۲۵ ml ریخته ۳ ml از محلول  $3 \times 10^{-4}$  M پالادیم II کلراید را اضافه می کنیم. ۴ ml بافر با pH=۳ و ۱ ml از SLS را اضافه می کنیم. به مدت ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ دقیقه در دمای بهینه ( $70^{\circ}\text{C}$ ) قرار می دهیم. تغییر رنگ مشاهده می شود. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis  $\lambda_{max}$  کمپلکس را در ۳۷۹ nm مشاهده می کنیم زمان بهینه ۳۰ دقیقه است. (شکل ۴)



شکل ۴. اثر عوامل مختلف در تشکیل کمپلکس پالادیم-داکسی سایکلین

### ۳-۴. بررسی اثر حجم سورفکتانت

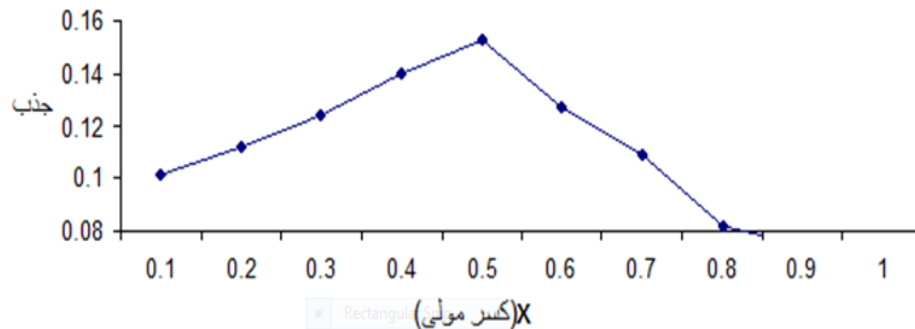
در چند بالن ۱۰ میلی لیتری ۰/۵ میلی لیتر بافر با pH=۳ و ۲ میلی لیتر دارو و ۲ میلی لیتر فلز ریخته و حجم های مختلفی از SLS اضافه می کنیم. سپس محلول ها را حرارت داده و مقدار جذب را در طول موج ۳۷۹ نانومتر می خوانیم. بیشترین مقدار کمپلکس با میزان ۱ میلی لیتر SLS تشکیل می شود (شکل ۵).



شکل ۵. اثر عوامل مختلف در تشکیل کمپلکس پالادیم-داکسی سایکلین

### ۳-۵. روش جاب برای تعیین استوکیومتری کمپلکس داکسی سایکلین-پالادیم

۱۱ بالن ۱۰ ml آماده کرده و شماره گذاری می کنیم. مقادیری از بافر با pH بهینه شده (pH=۳)، یک میلی لیتر SLS، داکسی سایکلین و پالادیم کلراید هر دو با غلظت  $2 \times 10^{-4}$  مولار را با نسبت های مختلف مخلوط کرده به طوری که نسبت مولی لیگاند به نسبت مولی (لیگاند + فلز) از ۰ تا ۱ تغییر کند. و جذب را در  $\lambda_{max}$  اندازه می گیریم (شکل ۶).



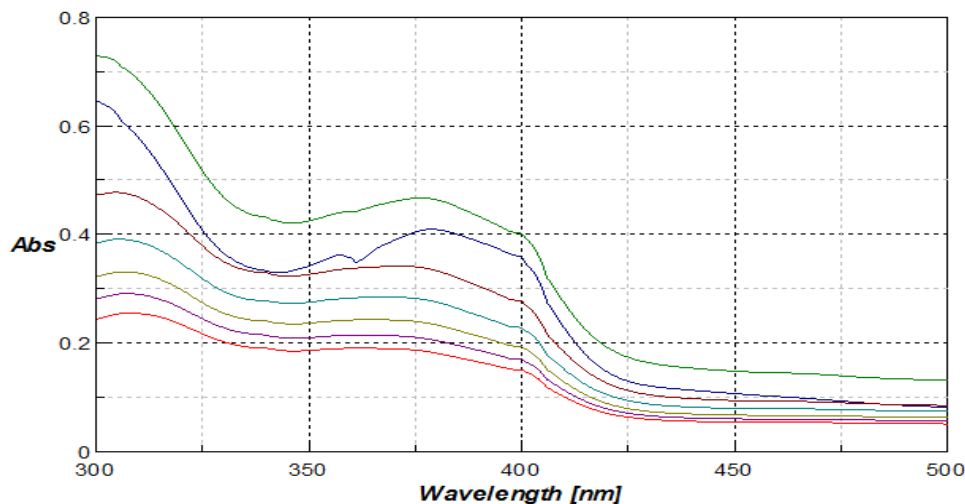
شکل ۶. منحنی روش جاب برای تعیین نسبت دارو به فلز

### ۳-۶. روش نسبت مولی برای تعیین استوکیومتری کمپلکس داکسی سایکلین-پالادیم

۱۴ بالن ۱۰ ml آماده کرده و شماره گذاری می کنیم. ۴ میلی لیتر از بافر با pH بهینه شده (pH=۳) را به همراه یک میلی لیتر SLS در لوله ها ریخته، ۴ میلی لیتر از دارو با غلظت  $10^{-4}$  مولار اضافه می کنیم و مقادیر مختلفی از پالادیم با غلظت  $2 \times 10^{-3}$  مولار را به محلول اضافه می کنیم به طوری که نسبت مولی فلز به لیگاند تغییر کند. پس از حرارت دادن تا دمای مشخص، محلول را به حجم می رسانیم و سپس جذب را در  $\lambda_{max}$  در مقابل شاهد اندازه می گیریم. برای تعیین ثابت های ترمودینامیکی این کار را در چهار دمای ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ انجام می دهیم.

### ۳-۷. تعیین رنج خطی داروی داکسی سایکلین

حجم های مختلفی از دارو با غلظت  $10^{-3} M$  را برداشته و در چند بالن ۱۰ میلی لیتری می ریزیم. ۲/۵ میلی لیتر از فلز با غلظت  $M$   $3 \times 10^{-3}$  و ۴ میلی لیتر از بافر با pH بهینه شده و یک میلی لیتر SLS به آن اضافه می کنیم. بعد از حرارت دادن، جذب را در  $\lambda_{max}$  اندازه گیری می کنیم (شکل ۷ و جدول ۱).



شکل ۷. طیفهای اسپکتروفتومتری UV-Vis کمپلکس ها با مقادیر مختلف داکسی سایکلین و پالادیم ثابت برای تعیین رنج خطی ( $28-4 \mu g/ml$ )

جدول ۱. پارامترهای نوری کمپلکس داکسی سایکلین-پالادیم

پارامتر	
۳۷۹nm	$\lambda_{max}$ (nm)
۴-۲۸	محدوده خطی قانون بیر ( $\mu g/ml$ )
$2/56 \times 10^4$	جذب مولی ( $L/mol.cm$ )
$5/6 \times 10^{-2}$	حد تشخیص ( $\mu g/ml$ )
۰/۱۷	حد اندازه گیری کمی ( $\mu g/ml$ )

معادله رگرسیون

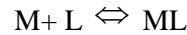
۰/۰۵	شیب
۰/۰۹۲۹	عرض از مبدا
۰/۹۹۸	ضریب همبستگی ( $R^2$ )

### ۳-۸. ثابت تشکیل کمپلکس تترااسایکلین-پالادیم

ثابت تشکیل کمپلکس از داده های نسبت جذب مولی و استفاده از غیر خطی کمترین مربع منحنی برنامه KINFIT مورد بررسی قرار گرفت. این برنامه به روش حداقل مربعات نوشته شده بر اساس الگوریتم نیوتن - راپسن که در آن با تغییرات متوالی مقادیر تخمینی اولیه و نهایی جذبها و ثابت تشکیل کمپلکس بهترین انطباق بین منحنی های نتایج محاسبه ای و تجربی و نسبت به کسر

مولی برای ترکیب مورد نظر محاسبه می شود. با حصول بهترین انطباق دو منحنی در نهایت ثابت تشکیل کمپلکس بدست می آید. اساس کار این برنامه بر پایه تطابق داده های محاسبه ای و تجربی است.

از واکنش داکسی سایکلین با پالادیم با نسبت ۱:۱ ترکیب می شود. موازنه جرم ML (معادله ۱) در برنامه کامپیوتری KINFIT استفاده شده است برای به دست آوردن غلظت لیگاند آزاد [L] معادله (۲) باید حل شود:



$$K = [ML] / [M][L]$$

$$CM = [M] + [ML], \quad CL = [L] + [ML] \quad (1)$$

$$K[L]^2 + (1 + K(CM - CL))[L] - CL = 0 \quad (2)$$

جذب مشاهده شده محلول نیز توسط معادله زیر داده می شود:

$$A_{\text{obs}} = \varepsilon L[L] + \varepsilon ML[ML] \quad (3)$$

که در آن  $\varepsilon$  مقدار جذب مولی گونه مورد نظر است. برای ارزیابی ثابتهای تشکیل از داده های جذب در مقابل نسبت مولی CM / CL، از برنامه KINFIT استفاده شد [۱۷-۱۵].

### ۳-۹. پارامترهای ترمودینامیکی

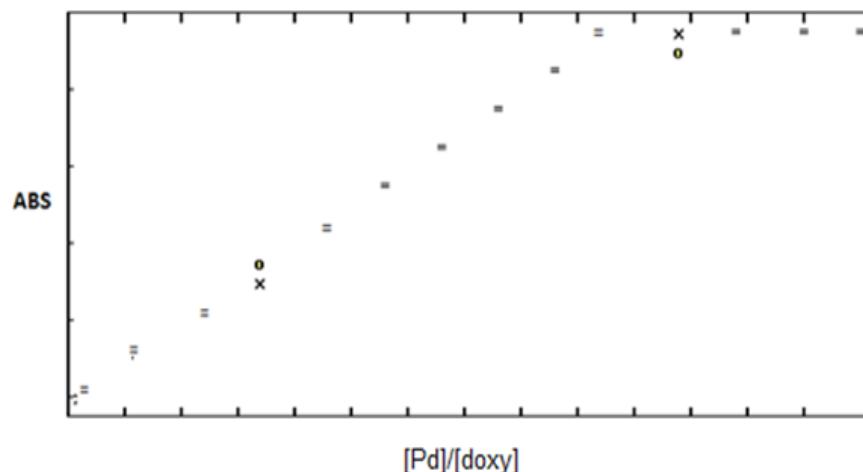
به منظور درک بهتر ترمودینامیک واکنش کمپلکس فلزی داکسی سایکلین، تعیین آنتالپی و آنتروپی مناسب به نظر می رسد. با استفاده از ثابتهای تعادل می توان بر اساس رابطه زیر پارامترهای ترمودینامیکی را به دست آورد:

$$k_f = \exp\left(\frac{-\Delta G^\circ}{RT}\right) = \exp\left(\frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}\right) \quad (4)$$

در تمام موارد، مقدار  $\log K_f$  در مقابل  $1/T$  خطی بوده و مقادیر  $\Delta H^\circ$  و  $\Delta S^\circ$  در آن از شیب و عرض از مبدا، مشخص شده است. پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شده در جدول ۲ گزارش شده اند. مقادیر منفی  $\Delta H^\circ$  و  $\Delta G^\circ$  نشان دهنده برهم کنش قوی بین واکنش دهنده هاست. به جهت بررسی اینکه آیا  $\Delta H^\circ$  یا  $\Delta S^\circ$  کدام پیش برنده واکنش تشکیل کمپلکس است  $\Delta G^\circ / \Delta S^\circ$  و  $\Delta H^\circ / \Delta G^\circ$  محاسبه شده است. نتیجه اینکه  $\Delta H^\circ$  پیش برنده واکنش می باشد.

جدول ۲. ثابتهای تشکیل، انرژی آزاد گیبس و آنتروپی کمپلکس در دماهای مختلف

$\Delta H^\circ / \Delta G^\circ$	$T\Delta S^\circ / \Delta G^\circ$	$\Delta H^\circ, \text{J/mol}$	$\Delta S^\circ, \text{J/mol.k}$	$-\Delta G^\circ, \text{J/mol}$	logk	دما (°C)
۰/۶۴۳	۰/۳۵۷	-۱۷۷۳۲/۶۱	۳۴/۲	۲۷۵۸۲/۲۱	۵/۰۰۸۴	۱۵
۰/۶۱	۰/۳۹	-۱۷۷۳۱/۲۱	۳۸/۴۵	۲۹۱۸۹/۳۱	۵/۱۲۲۳۷	۲۵
۰/۵۶	۰/۴۳	-۱۷۷۳۲/۳۹	۴۴/۸۲	۳۱۵۳۶/۹۵	۵/۳۸۲۱	۳۵
۰/۵۱	۰/۴۹	-۱۷۷۳/۹۵	۵۳/۱۵	۳۴۶۳۲/۶۵	۵/۶۹۵۴	۴۵



شکل ۵: خروجی برنامه kinfilt نسبت جذب به  $[Pd] / [doxy]$  در ۲۵ درجه سانتیگراد: (x) نقطه تجربی، (o) نقطه محاسبه شده، (=) نقاط تجربی و محاسبه شده مشابه هستند.

#### ۴. نتیجه گیری

ساختار داکسی سایکلین به دلیل وجود بسیاری از سایت های احتمالی اتصال به فلز، پیچیده است. به دلیل اهمیت بیولوژیکی، برهم کنش آنها با منیزیم و کلسیم و برخی فلزات واسطه به طور گسترده مطالعه شده است. در این مطالعه ما موفق شدیم با استفاده از یک برنامه کامپیوتری ثابتهای پایداری کمپلکس داکسی سایکلین - پالادیم را در دماهای مختلف در شرایط بهینه پیدا کنیم و سپس ثابتهای ترمودینامیکی را تعیین نماییم. برای تعیین پارامترهای ترمودینامیکی، محلولهای داکسی سایکلین و پالادیم کلرید به طور جداگانه آماده و سپس، با استفاده از روش نسبت مولی، کمپلکسها با نسبتهای مختلف CM / CL تهیه شدند. (مقادیر مختلف فلز به مقدار ثابت محلول دارو). جذب محلولها در ۴ دما در طول موج ماکزیمم اندازه گیری شد. مشاهده می شود که با افزایش دما انرژی آزاد گیبس منفی تر می شود و نشان می دهد واکنش خود بخودی انجام می شود. مقادیر  $\Delta H$  نشان می دهد که واکنش ماهیت اندوترمیک دارد و اثر دما را روی تشکیل کمپلکس توضیح می دهد. هر چقدر دما افزایش یابد واکنش بیشتر از طریق افزایش آنتروپی پیش می رود. با افزایش آنتروپی بی نظمی بیشتر می شود و پایداری کمپلکس افزایش می یابد. همچنین در قسمت دیگر کار، از یک روش سریع، دقیق و ساده برای تعیین مقدار دارو استفاده شده است. از آنجایی که روشهایی نظیر HPLC روشهایی وقت گیر و پرهزینه برای تعیین مقدار دارو می باشند، روش به کار گرفته شده نسبت به روشهای پرهزینه و پیچیده ای که در آنالیز دارو انجام می گیرد، مفیدتر و مقرون به صرفه تر است. ضریب جذب مولی بالا (از مرتبه  $10^4$ ) برای روش ذکر شده نشان دهنده حساسیت بالای این روش می باشد. حد تشخیص پایین و حد اندازه گیری پایین آنها در تعیین کمی بسیار مطلوب است. همچنین انحراف استاندارد نسبی کم این روش نشان دهنده تکرار پذیری روش مذکور است.

#### ۵. مراجع

[1] Harbarth, S., Albrich, W., Goldmann, D.A. and Huebner, J., Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help?. *The Lancet infectious diseases*, 1(4) (2001) 251-261.



- [2] Mitscher, L.A., Pillai, S.P., Gentry, E.J. and Shankel, D.M., 1999. Multiple drug resistance. *Medicinal research reviews*, 19(6) (1999) 477-496.
- [3] Berber, I., Cokmus, C. and Atalan, E., 2003. Comparison of Staphylococcus spp. cellular and extracellular proteins by SDS-PAGE. *Mikrobiologiya*, 72(1) (2003) 54-59.
- [4] Desiraju, G.R., Luss, H.R. and Smith, D.L., Resonance interactions in metal chelates of o-hydroxyazo compounds. Crystal growth, structure, and spectra of 1-(2-pyridylazo)-2-naphtholatochlorocopper (II). *Journal of the American Chemical Society*, 100(20) (1978) 6375-6382.
- [5] Fenton, D.E., Tate, J.R., Casellato, U., Tamburini, S., Vigato, P.A. and Vidali, M., Metal complexes of some tetraketones and their schiff bases. *Inorganica chimica acta*, 83(1) (1984) 23-31.
- [6] Mikulski, C.M., Fleming, J., Fleming, D. and Karayannis, N.M., Chelates of tetracycline with first row transition metal perchlorates. *Inorganica chimica acta*, 144(1) (1988) 9-16.
- [7] Bagheri, A., Thermodynamic Studies of Metal Complexes of Tetracycline and its Application in Drug Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(11) (2015) 765-769.
- [8] Karimi-Maleh, H., Shojaei, A.F., Tabatabaeian, K., Karimi, F., Shakeri, S. and Moradi, R., Simultaneous determination of 6-mercaptopruine, 6-thioguanine and dasatinib as three important anticancer drugs using nanostructure voltammetric sensor employing Pt/MWCNTs and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluoro phosphate. *Biosensors and Bioelectronics*, 86 (2016) 879-884.
- [9] Poiger, H. and Schlatter, C., Fluorimetric determination of tetracyclines in biological materials. *Analyst*, 101(1207) (1976) 808-814.
- [10] Gong, Z. and Zhang, Z., Determination of tetracyclines with a modified  $\beta$ -cyclodextrin based fluorosensor. *Analytica chimica acta*, 351(1-3) (1997) 205-210.
- [11] Qi, L., Duan, L.M., Sun, X.H., Zhang, J. and Zhang, Z.Q., Simultaneous determination of three banned psychiatric drugs in pig feed and tissue using solid-phase reactor on-line oxidizing and HPLC-fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 29(10) (2015) 1535-1540.
- [12] Regos, A., Zuk, G. and Lukasiak, J.D., Fluorimetric determination of tetracycline hydrochloride. *Sci. Pharm*, 46 (1978) 249-254.
- [13] Zare, F., Ghaedi, M. and Daneshfar, A., Ionic-liquid-based surfactant-emulsified microextraction procedure accelerated by ultrasound radiation followed by high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of antidepressant and antipsychotic drugs. *Journal of separation science*, 38(5) (2015) 844-851.
- [14] Ghandour, M.A. and Ali, A.M., Adsorptive stripping voltammetric determination of tetracycline and oxytetracycline. *Analytical letters*, 24(12) (1991) 2171-2186.
- [15] Couto, C.M., Lima, J.L., Conceicao, M., Montenegro, B.S.M. and Reis, S., Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline determination by flow injection potentiometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 18(4-5) (1998) 527-533.
- [16] Chaves, S.C., Aguiar, P.N., Torres, L.M., Gil, E.S., Luz, R.C., Damos, F.S., Munoz, R.A., Richter, E.M. and dos Santos, W.T., Simultaneous determination of caffeine, ibuprofen, and paracetamol by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection on boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis*, 27(12) (2015) 2785-2791.
- [17] Liawruangrath, S., Liawruangrath, B., Watanesk, S. and Ruengsitagoon, W., Flow injection spectrophotometric determination of tetracycline in a pharmaceutical preparation by complexation with aluminium (III). *Analytical sciences*, 22(1) (2006) 15-19.
- [18] Anderson, J.F.F., Gerlin, M.C.G., Sversut, R.A., Oliveira, L.C.S., Singh, A.K., Amaral, M.S. and Kassab, N.M., Development and validation of an isocratic HPLC method for simultaneous determination of quaternary mixtures of antihypertensive drugs in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*, 29(1) (2017) 95-110.
- [19] Carlin, R.T. and Wilkes, J.S., Complexation of Cp<sub>2</sub>MCl<sub>2</sub> in a chloroaluminate molten salt: relevance to homogeneous Ziegler-Natta catalysis. *Journal of molecular catalysis*, 63(2) (1990) 125-129.