CC BY

College of Basic Education Research Journal

www.berj.mosuljournals.com

Method Determination of Folic Acid in Pharmaceuticals Preparations and Food Samples.

Muthanna B. Abdullah Al-hadeedy

Ministry of Education, Nineveh Education Directorate, Mosul District Education Department, Mosul, Iraq.

Article Information

Article history:

Received: January 4,2023

Reviewer: February 12,2023

Accepted: February 12,2023

Available online

Keywords:

Method Determination, Folic acid, Pharmaceuticals preparations, Food samples.

Correspondence:

muthana.esp94@student.uomosul.edu.iq

Abstract

The contains an introduction about folic acid (Pteroyl-L-Glutamic acid), as it is one of vitamin B group and plys amajor role in the vital functions of the metabolism cells, such as DNA replication, The aocesses of repairing and synthesis of nucleotides and amino acid, And composition of red blood cells in the bone marrow the rapeutically folic acid provents the probability of birth defects and improves the performace of the memory. It also helps in heart diseases treatinent by controlling homocystine levels in blood. The shortage of folic acid affects the stability of DNA and may lead to increasing the risk of colon and rectal concer infection and defects in the neural tube.

The deals with apresentation of the methods thatare used for estimating folic acid in pharmaceutical and foods products. They includes spectroscopic electronic and chromatographic methods. As for the spectroscopic methods, They based on using multiple reagents for the estimation under suitable conditions, Through applyin either oxidative coupling organic reactions by interacting with the following systems (Phenothiazine-sodium metapyriodate in acidic media, Ortho-aminophynol-potassium iodate in acidic media, Phenoxazine-sodium metapyriodate in acidic media), or using diazotizition coupling reactions for the direct determination of folic acid through its during his diazotizition and coupling, or resorcinol reagent to form an azo dye product or indirect during diazotizition the fission of the reductive folic acid (Para – amino benzoyl glutamic acid) and its coupling with reagents imino di benzyl and 3-amino phenol detectors, And the two azo dyes at 580 and 460 nm respectively. Moreover the voltammetric technique has been used with its various types (Differential pulse, Circular, Extraction adsorption) in developing sensitive and rapid methods inorde to estimate folic acid in differeu samples. Also methods were described by high-performance liquid chromatography technique (HPLC) to analyze folic acid in different samples (Fruit juice, Vegetables, Wheat flour and pharmaceutical products). Of course we relied on many sources related to the subject of the research and we chose aspecial list of all the sources that were taken with in the scope of the study.

ISSN: 1992 – 7452

طرائق تقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية والعينات الغذائية.

مثنى بشير عبدالله الحديدي

وزارة التربية, مديرية تربية نينوى, قسم تربية قضاء الموصل, الموصل, العراق

الخلاصة

مقدمة عن حامض الفوليك (بتيرويل-L- حامض الكلوتاميك)، إذ يُعد من مجموعة فيتامين B ويلعب دوراً رئيسياً في الوظائف الحيوية لأيض الخلايا مثل استنساخ DNA وعمليات الاصلاح وتخليق النيوكليوتيدات والحوامض الامينية وتكوين خلايا الدم الحمر في نخاع العظم، وعلاجياً يمنع حامض الفوليك احتمال الاصابة بالعيوب الولادية ويحسن عمل الذاكرة، كما يساعد في معالجة امراض القلب من خلال السيطرة على مستويات homocysteine في الدم. وان نقص وعدم تناول حامض الفوليك يؤثر على ثبات DNA وربما يؤدي الى زيادة خطورة الاصابة بسرطان القولون والمستقيم وحدوث خلل في الانبوب العصبي.

عرض الطرائق المستخدمة في تقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية والاغذية، تمثلت بالطرائق الطيفية والكهربائية والكروماتوغرافية، إذ اعتمدت الطرائق الطيفية في التقدير على استخدام كواشف متعددة تحت ظروف مناسبة وذلك من خلال تطبيق إما تفاعلات الاقتران التأكسدي العضوي وذلك بتفاعله مع الانظمة الاتية :- (فينوثيازي- ميتابيريودات الصوديوم في وسط حامضي, اورثو- امينوفينول- يودات البوتاسيوم في وسط حامضي, الفينوكسازين- ميتابيريودات الصوديوم في وسط حامضي), أو استخدام تفاعلات الازوتة والاقتران في التقدير المباشر لحامض الفوليك من خلال ازوتته واقترانه مع كاشف الريسورسينول لتكوين صبغة الازو أو بصورة غير مباشرة من خلال ازوتة ناتج انشطار حامض الفوليك الاختزالي (بارا- امينوبنزويل حامض الكلوتاميك) واقترانه مع الكواشف ايمينو ثنائي البنزايل و 3- امينوفينول وقياس صبغتي الازو عند 580 و 460 نانوميتر على التوالي .

كما استخدمت تقنية الفولتامتري بانواعه المختلفة (النبضي التفاضلي والدائري والانتزاع الامتزازي) في تطوير طرائق حساسة وسريعة لتقدير حامض الفوليك في عينات مختلفة.

كما وصفت طرائق بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء لتحليل حامض الفوليك في عينات مختلفة (عصائر الفاكهه والخضروات وطحين الحنطة والمستحضرات الصيدلانية).

وبطبيعة الحال فقط كان اعتمادنا على العديد من المصادر ذات الصلة في موضوع البحث وقد اخترنا قائمة خاصة لجميع المصادر المأخوذه ضمن نطاق الدراسة.

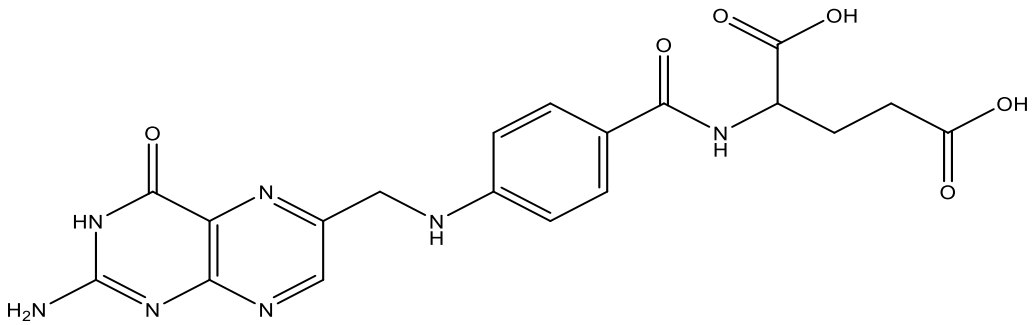
الكلمات المفتاحية: طرائق تقدير وحامض الفوليك والمستحضرات الصيدلانية والعينات الغذائية.

المقدمة

حامض الفوليك واهميته الطبية

حامض الفوليك Folic acid

يعد حامض الفوليك او بتيرويل –L– حامض الكلوتاميك (pteroyl -L- glutamic acid) من مجموعة فيتامين B[1] معروف كذلك بالفيتامين B_9 [2] ويمتلك ألصيغه الكيميائية الاتية[3]:-



(2S)-2-[[4-[[2-Amino-4-oxo-1,4-dihydropteridin-6-yl)methyl]amino]
Benzoyl]amino]pentanedioic acid.
Molar mass 441.4 gm/mol

يستعمل حامض الفوليك من قبل الجسم لإنتاج خلايا الدم الحمراء في نخاع العظم حيث يعتبر هذا الفيتامين المعقد ضروري لتأييض البروتين والدهون بشكل صحيح ويساعد على صيانة المنطقة الهضمية والجلد والشعر والنظام العصبي والعضلات وغيرها من الانسجة المختلفة الموجودة في الجسم. ويلعب حامض الفوليك بوصفه فيتامين دوراً رئيسياً في الوظائف الحيوية لأيض الخلايا مثل استنساخ الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (DNA) وعمليات الإصلاح وتخليق النيوكليوتيدات والفيتامينات والحوامض الأمينية ويساعد ايضاً على استنساخ الحامض النووي الرايبوزي (RNA) ويعتبر الحامض النووي (RNA)،(DNA) ضروري خلال فترات النمو السريع مثل الحمل والمراهقة والطفولة. وكذلك يساعد حامض الفوليك على توزيع الحديد بشكل صحيح في الجسم ويعتبر من الفيتامينات الذائبة في الماء فأن الفائض منه يخرج مع البول لذلك يعتبر فيتامين أمن غير ضار[4] ويمكن أن يختزل حامض الفوليك في جسم الإنسان إلى المرافق الأنزيمي حامض تتراهايدروفوليك (THFA) او حامض الفوليك رباعي الهيدروجين ويشارك (THFA) في نقل الوحدات التي تحوي ذرة كاربون واحدة مثل (CH_3 ،CH_2OH،CHO،CH_2،CH=NH) وهو بهذا يشبه فيتامين B_{12} , ويعمل ايضاً على أكسدة او اختزال المجموعات المحتوية على ذرة كاربون واحدة [5]. ولقد أشير إلى ان الفولات قد يساعد في الوقاية من السرطان, كما يشارك في التجميع وعمل الحامض النووي, ونقص الفولات قد يؤدي إلى الأضرار التي لحقت الحامض النووي وبالتالي يمكن ان يؤدي إلى الأصابة بالسرطان. اقترحت بعض الدراسات السريرية ان اخذ مستويات جيدة من حامض الفوليك قد يكون مرتبطاً بخفض احتمالات الإصابة

بسرطان البلعوم والمعدة وسرطان المبيض والثدي والبنكرياس. وأشار فريق البحث إلى ان دراسات سابقة أظهرت ان مرضى تم تشخيص إصابتهم بسرطان في الرأس أو العنق او ابيضاض الحنجرة كانت معدلات الفولات في دمهم اقل من العادي[4].

اكثر الناس لايتناولون الكمية الضرورية والكافية من حامض الفوليك وبالتالي يؤدي هذا النقص من حامض الفوليك إلى خلل في عملية تكوين خلايا الدم الحمراء وحدوث فقر الدم (أنيميا) من النوع كبير الخلية قليلة الصبغة [2,1]. وهذا النقص يعاني منه الأشخاص الذين يستعملون حبوب منع الحمل او مصابي سوء الامتصاص او امراض الكبد ومدمنوا الخمور[4]. ويؤثر نقص حامض الفوليك على ثبات DNA من خلال حدوث تغير في عملية مثيلة DNA وتدعى هذه الحالة بنقص المثيلة. ويؤدي نقص حامض الفوليك إلى حدوث السرطان من خلال التأثير على عملية التعبير الجيني (protoncogen expression) ويمكن للجذور الحرة ان تؤدي إلى تلف DNA, إذ لابد من وجود كمية كافية من مضادات الأكسدة لكي تكون الخلايا طبيعية. ويمتلك حامض الفوليك خصائص مضادة للأكسدة تقوم بحماية التركيب الجيني من خلال تثبيط مهاجمة الجذور الحرة ل DNA [7,6]. والنقص ايضاً وجد عموماً في المسنيين الذين يعانون من فقدان السمع, وان مفعول حامض الفوليك يمكن ان يتأثر ببعض الأدوية مثل معدلات الحموضة والأدوية المضادة للسرطان, وان نقص حامض الفوليك يزيد من فرص إنجاب طفل (داون) يتميز بكبر حجم الرأس والتخلف العقلي تحدث هذه الظاهرة في الأمهات الآتي تعاني من نقص حامض الفوليك لعدم تناول الأغذية المحتوية على هذا الحامض وبالتالي ادى إلى زيادة نسبة الخلل في الانقسام الكروموسومي, الأمر الذي ادى إلى زيادة فرص إنجاب طفل داون[4].

استعمالاته العلاجية

حامض الفوليك يستعمل لمعالجة الحالات التالية:-

1:- منع عيوب الولادة :- لقد ثبت عملياً وبشكل قاطع وفي اكثر من بحث طبي ان المرأة التي تأخذ حامض الفوليك قبل الحمل يقلل احتمال إصابة اجنتها بتشوهات الحبل الشوكي (كالظهر المشقوق وغياب الدماغ) بنسبة (5-70%) . وكذلك الأصابة بالتشوهات الخلقية للجنين في الاعضاء الاخرى مثل تشوهات القلب والكلى والشفاه والحلق المشقوق وعيوب الانبوب العصبي, ولغرض تخفيض او منع احتمال الأصابة بالعيوب الولادية يجب على الأم ان تأخذ حامض الفوليك قبل الحمل بما لايقل على شهر واحد يومياً إلى نهاية الشهر الأول من الحمل ويفضل الاستمرار إلى نهاية الشهر الثالث للحمل للاحتياط[9,8].

2:- الذاكرة :- اظهرت دراسة طبية حديثة ان حامض الفوليك يحسن من عمل الذاكرة. وكشفت التجربة التي قام بها علماء هولنديون ان تناول 800 مايكروغرام من حامض الفوليك يومياً ولمدة ثلاثة سنوات يحسن من اداء الذاكرة ومن تجديد نشاطها في حين يؤثر نقص الحامض على منطقة (قرن امون)

في الدماغ المسؤولة عن التعامل مع الذكريات. ويتواجد حامض الفوليك من مصادر طبيعية في الحبوب الكاملة وجميع الأوراق الخضراء[4].

3:- الاكتئاب :- يعتبر حامض الفوليك من العناصر الضرورية لسلامة اجهزة الهضم والأعصاب, ولهذا فأن نقصه عن المعدل المطلوب في الجسم يؤدي الى الأصابة بالأنيميا وبالتالي إلى حدوث اكتئاب نفسي, وقد ثبت بالفعل انه يصلح لمعالجة هاتين الحالتين[4].

4:- امراض القلب :- يساعد حامض الفوليك ايضاً على السيطرة على مستويات homocysteine في الدم. حيث ان المستويات العالية ل homocysteine في الدم يمكن ان تؤدي الى الأمراض المختلفة مثل امراض القلب. ووجد ان بعض انواع فيتامينات B ومنها حامض الفوليك تعد اهم اصناف فيتامين B لتخفيض مستويات homocysteine ولقد تم ربط امراض القلب والشرايين التاجية والسكتة الدماغية بنقص حامض الفوليك[4].

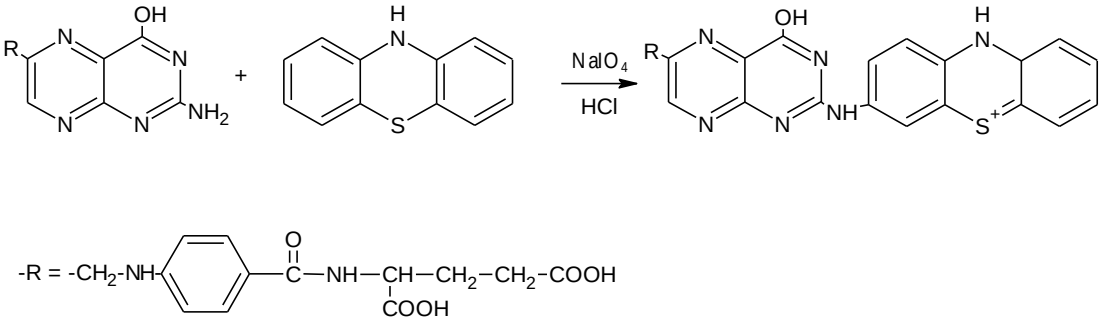
حامض الفوليك في الغذاء

يوجد حامض الفوليك في الخضراوات المورقة مثل السبانخ والخس والفاصوليا والبازلاء المجففة. كما يوجد حامض الفوليك بكثرة في القرنابيط والفراولة والفلفل الرومي بانواعه الخضراء والحمراء والصفراء والخرشوف وبذور عباد الشمس وغيرها من الفواكه والخضراوات والتي تعد مصادر غنية بالفولات. ويحتوي الكبد ايضاً على كميات عالية من الفولات وكذلك خميرة الخبازين[4]. فضلاً عن ذلك يوجد حامض الفوليك في الأسماك واللحوم والدواجن والحبوب والعدس والفول والبندق[7،6].

طرائق تقدير حامض الفوليك

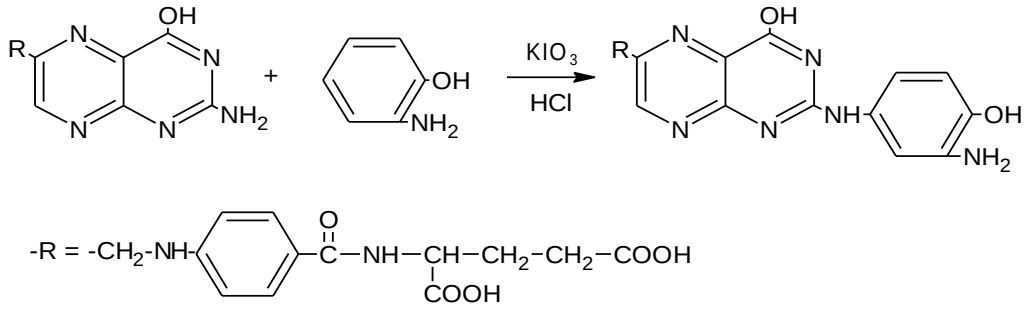
الطرائق الطيفية

قدر حامض الفوليك طيفياً بشكله النقي والتطبيق على الأقراص الدوائية من خلال تفاعل الاقتران التأكسدي مع كاشف الفينوثيازين بوجود ميتابيريودات الصوديوم في وسط حامضي المخطط ١، إذ قيس امتصاص الناتج الأخضر عند 600 نانوميتر بامتصاصية مولارية 1.37 x 10^4 لتر. مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ضمن مدى التركيز 1–24 مايكروغرام/ مللتر[10].



المخطط ١ : الاقتران التأكسدي لحامض الفوليك مع الفينوثيازين بوجود ميتابيريودات الصوديوم.

كما أمكن استخدام نظام الاقتران التأكسدي المكون من اورثو–امينوفينول ويودات البوتاسيوم في التقدير الطيفي لكميات مايكروغرامية 2–40 مايكروغرام/مللتر من حامض الفوليك بقياس الناتج الاحمر المتكون في الوسط الحامضي عند الطول الموجي 530 نانوميتر بامتصاصية مولارية 3.90 x 10^3 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$. المخطط ٢ وطبقت الطريقة على الأقراص الدوائية الحاوية على حامض الفوليك[11].

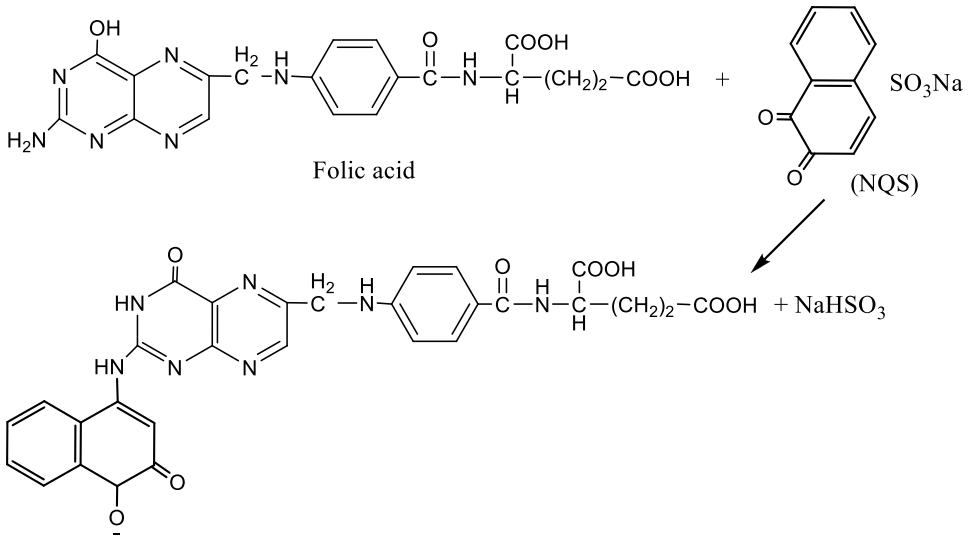


المخطط ٢ : الاقتران التأكسدي لحامض الفوليك مع اورثو–امينوفينول بوجود يودات البوتاسيوم.

تم حديثاً استخدام تفاعل الاقتران التأكسدي العضوي في تطوير طريقة طيفية يسيره وسريعة وحساسة لتقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية وذلك اعتماداً على مفاعلة المركب الدوائي مع كاشف الاقتران الجديد الفينوكسازين بوجود ميتابيريودات الصوديوم في الوسط الحامضي ليعطي ناتج ذي لون ارجواني يقاس اقصى امتصاصه عند الطول الموجي 545 نانوميتر. إذ امكن تقدير المركب الدوائي ضمن مديات التراكيز 0.4–19.5 مايكروغرام/مللتر بامتصاصية مولارية 1.43 x 10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$, وكانت الطريقة ذات دقه وتوافق جيدين اذ بلغ معدل نسبة الاسترجاع 101.02% وانحراف

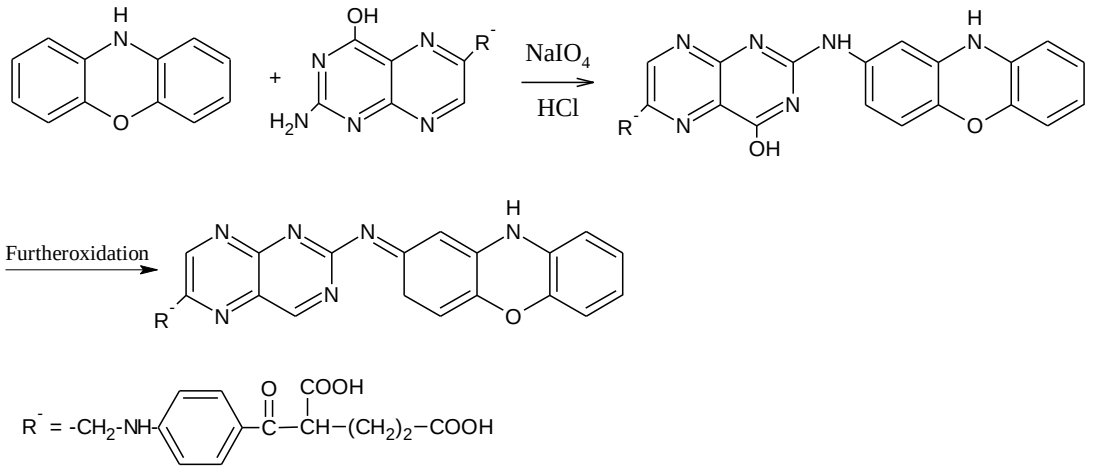
قياسي نسبي أقل من 5%. طبقت الطريقة بنجاح على الاقراص الدوائية اذا كانت النتائج متفقه على نحو جيد مع المحتوى الأصيل للمستحضرات الصيدلانية ومع طريقة الإضافة القياسية[12].

امكن تطوير طريقة طيفية حساسة لتقدير حامض الفوليك في مستحضراته الصيدلانية وبشكله النقي, استندت الطريقة المقترحة على نظام الاقتران التأكسدي للمركب الدوائي مع كاشف الاقتران 2,1- نافثوكوين -4- سلفونات (NQS) في وسط قاعدي (pH11) المخطط ٣ لتكوين ناتج اصفر اللون يقاس امتصاصه عند 436 نانوميتر, إذ بلغ المدى الخطي للتقدير 0.75-10.5 مايكروغرام/مللتر بحدي كشف وتقدير كمي 0.159 و0.531 مايكروغرام/مللتر على التوالي, وحساسية ساندل 0.0208 مايكروغرام/سم, إذ كان الانحراف القياسي النسبي 0.0198% وبنسبة استرجاع 100.015%[13]. على النحو الآتي :-



المخطط ٣ : الاقتران التأكسدي لحامض الفوليك مع 2,1- نافثوكوين -4- سلفونات (NQS) في وسط قاعدي.

يتأكسد حامض الفوليك الذي يحتوي على مجموعة الامينو الاروماتيه الأولية في الوسط الحامضي بواسطة ميتابيريودات الصوديوم لتكوين الكتروفيل فعال يقترن مع الفينوكسازين بوصفه كاشفاً كروموجينياً المخطط ٤، واعتماداً على النسبة المولية التركيبية للناتج والتي كانت 1:1 (مركب دوائي : فينوكسازين) يمكن التعبير عن تفاعل الأقتران الالكتروفيلي[14،15]. على النحو الآتي :-



المخطط ٤ : اكسدة حامض الفوليك في الوسط الحامضي بواسطة ميتابيريودات الصوديوم وبوجود الفينوكسازين.

طورت طريقة طيفية حساسة لتقدير حامض الفوليك في الأقراص الدوائية تعتمد الطريقة على التفاعل التأكسدي لحامض الفوليك مع زيادة معلومة ايونات السريوم (IV) في وسط حامض الكبريتيك، ليتم مفاعلة ايونات السيريوم (IV) الفائضة مع زيادة من ايونات الحديد (II) ثم يتبعها تفاعل ايونات الحديد (II) المتبقية مع $K_3[Fe(CN)_6]$ لتكوين الحلقة البروسية المخطط ٥ يقاس امتصاصها عند 725 نانوميتر. بلغ المدى الخطي للتقدير 0.1-4 مايكروغرام/ مللتر بامتصاصية مولارية 5.96×10^4 لتر. مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ [16].

ويمكن توضيح خطوات التفاعل بالمعادلات الاتية :-

$$\underset{\text{reductant}}{\text{Folic acid}} + Ce^{4+} \longrightarrow Ce^{3+} + \underset{\text{oxidant}}{\text{Folic acid}} + \underset{\text{excess}}{Ce^{4+}}$$

$$Ce^{4+} + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + Ce^{3+} + \underset{\text{excess}}{Fe^{2+}}$$

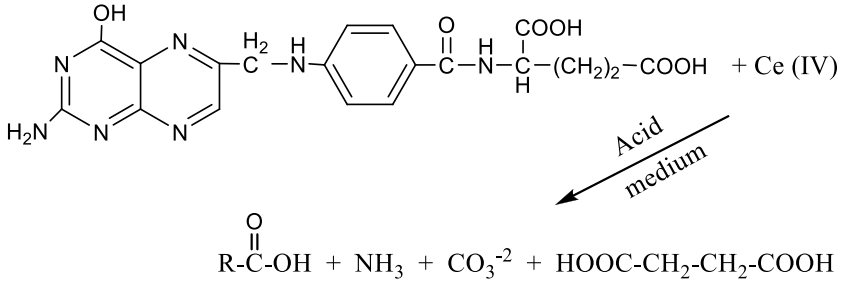
$$\underset{\text{excess}}{4Fe^{2+}} + 3K_3[Fe(CN)_6] \longrightarrow \underset{\text{Prussian blue}}{Fe_4[Fe(CN)_6]_3 \cdot xH_2O} \qquad x = (14\text{-}16)$$

المخطط ٥ : التفاعل التأكسدي لحامض الفوليك بواسطة ايونات السيريوم في الوسط الحامضي لتكوين الحلقة البروسية.

وصفت طرق طيفية حساسة وسريعة لتقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية وبشكله النقي, استندت الطريقة على التفاعل التأكسدي للمركب الدوائي مع زيادة معلومة من ايونات السيريوم (IV) في الوسط الحامضي, ليتم مفاعلة ايونات السيريوم (IV) الفائضة مع زيادة من صبغة المثيلين

الازرق وقياس المتبقي من الصبغة عند 665 نلنوميتر, بلغ المدى الخطي للتقدير 1.0 – 10.0 و 4.0 – 20.0 مايكروغرام/مللتر لطريقة الدفعة والتدفق على التوالي, والامتصاصية المولارية 4.753 × 10^4 و 0.896 × 10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$, إذ كانت حساسية ساندل 0.009 و 0.04 مايكروغرام/سم^2 وبانحراف قياسي نسبي اقل من 4.9% و 1.4% على التوالي[17].

استخدمت طريقة طيفية سريعة وحساسة لتقدير حامض الفوليك في مستحضراته الصيدلانية بشكله النقي, اعتمدت الطريقة على التفاعل التاكسدي لحامض الفوليك مع كبريتات السيريوم (IV) في الوسط المائي مكون معقد ملون برتقالي – محمر خلال استخدام منظومة الحقن الجرياني المستمر والمصممة محلياً Ayah 3Sx3-3D-Solar cell , إذ قدرت القطع الملونة باستخدام وصلة ثنائية كمصدر باعث للضوء الاخضر الساطع, واعتمدت على اخذ 100 مايكروليتر أفضل حجم لأنموذج محقن لتقدير الحامض, بلغ مدى التقدير الخطي 0.005–20 مللي مول. لتر$^{-1}$ وبحد كشف 0.5 مايكرومول. لتر$^{-1}$, بمعدل نسبة استرجاع 99.88% والانحراف القياسي النسبي اقل من 1% وأمكن استخدام اختبار–t وتبين انه لا يوجد فرق بين الطريقة المقترحة والطريقة القياسية وتم قبول الطريقة المستحدثة كطريقة تحليلية جديدة [18]. المخطط ٦ على النحو الآتي :-

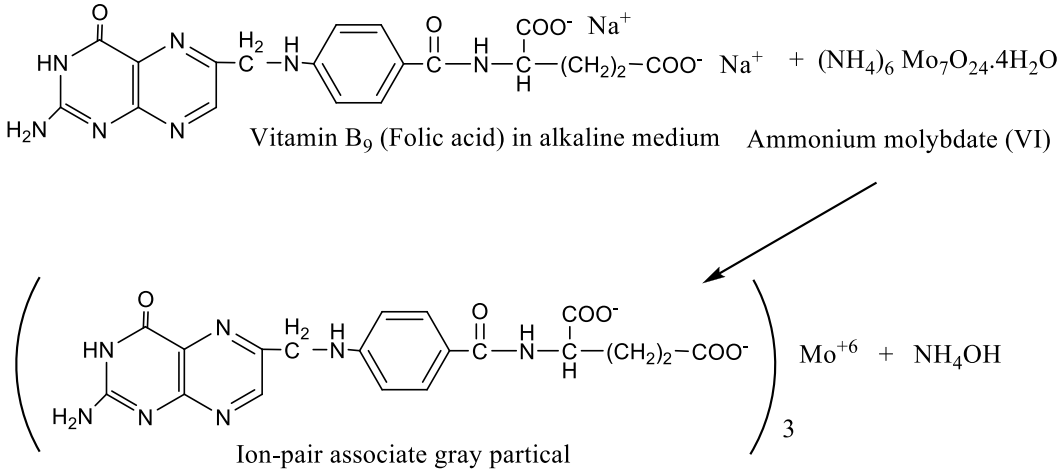


المخطط ٦ : التفاعل التأكسدي لحامض الفوليك بواسطة كبريتات السيريوم في الوسط المائي باستخدام منظومة الحقن الجرياني.

امكن تطوير طريقة طيفية حساسة لتقدير حامض الفوليك في مستحضراته الصيدلانية, استندت الطريقة على اكسدة حامض الفوليك بواسطة Fe(III) في وسط حامض الكبريتيك الى Fe(II) خلال اقترانه مع فيري سيانيد البوتاسيوم لتكوين ناتج زرقة بروسيان وقياس الامتصاص عند الطول الموجي 725 نانوميتر, ضمن مدى التراكيز 1–20 مايكروغرام/مللتر, وبحد كشف 0.91 مايكروغرام/مللتر [19].

طُورت طريقة طيفية حساسة وسريعة لتقدير حامض الفوليك في مستحضراته الصيدلانية وبشكلهُ النقي, استندت الطريقة على تكوين معقد المزدوج الأيوني رصاصي اللون خلال تفاعل المركب الدوائي مع مولبيدات الامونيوم في الوسط المائي خلال استخدام Ayah-6SX1-ST-2D Solar Cell CFIA , ضمن مدى التقدير الخطي 0.01–0.6 ملي مول/لتر وبحد كشف 131.994 نانوغرام/النموذج وكان

الانحراف القياسي النسبي اقل من 0.5% وقياس الامتصاص عند 255 نانوميتر, طُبق اختبار–t للمقارنة بين الطريقة المطورة والطريقة القياسية واثبتت النتائج عدم وجود فرق عند مستوى ثقة 95% [20]. المخطط ٧ على النحو الآتي :-

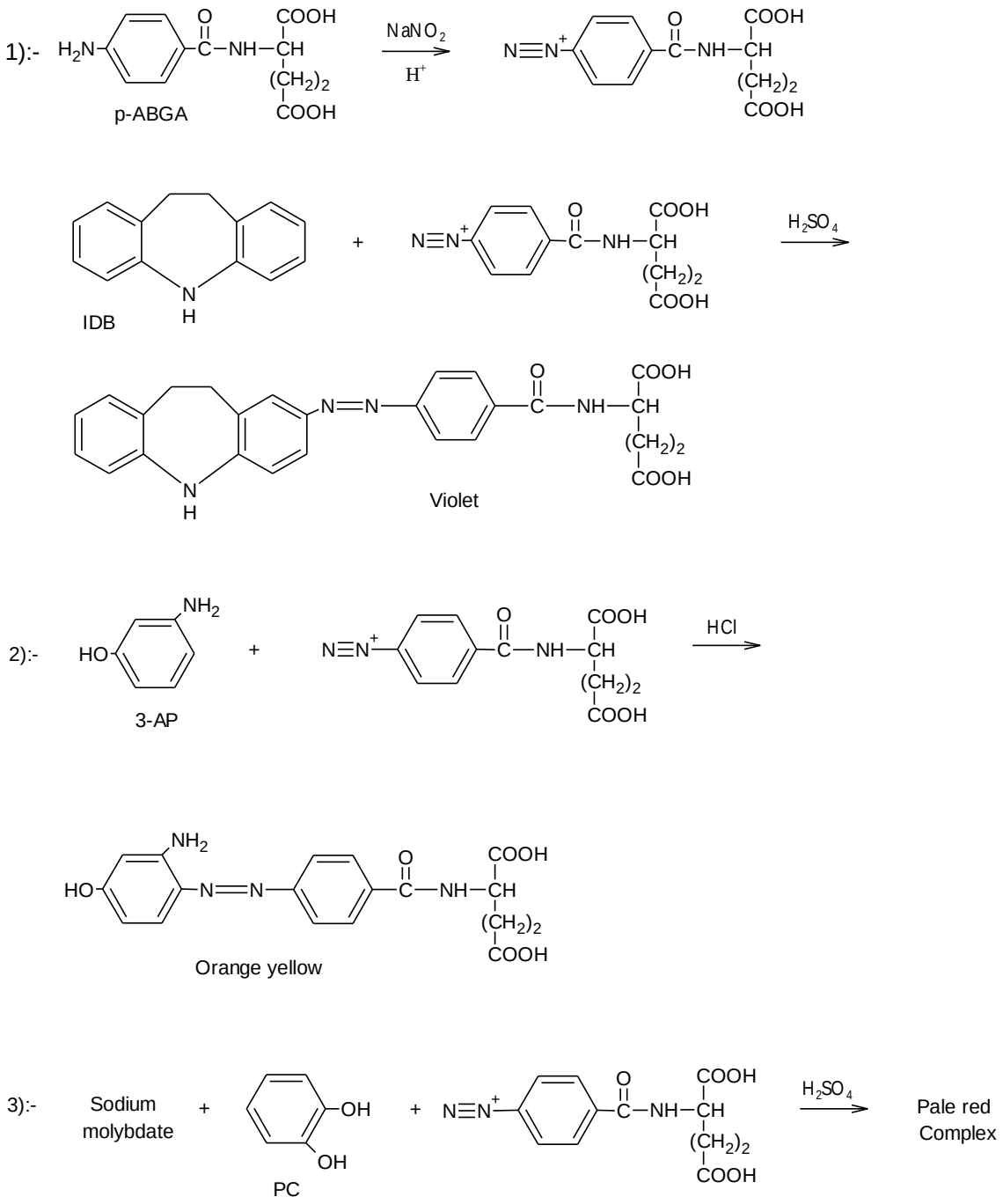


المخطط ٧ : تفاعل تكوين معقد المزدوج الأيوني لحامض الفوليك مع مولبيدات الامونيوم في الوسط المائي.

واستخدمت تفاعلات الازوتة والاقتران في تقدير حامض الفوليك طيفياً بهيئة النقية وفي المستحضرات الصيدلانية. وذلك اما من خلال ازوتته واقترانه مع كاشف الريسورسينول في وسط قاعدي لتكوين صبغة الازو قيس امتصاصها عند 367 نانوميتر بامتصاصية مولارية 1.11×10^4 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$, ضمن مدى التركيز الخطي 0.5–30 مايكروغرام/ مللتر. او اقترانه مع الكاشف 4– نيتروانيلين المؤزوت في وسط قاعدي لإعطاء صبغة صفراء تقاس عند 404 نانوميتر، إذ قُدر المركب الدوائي بكميات 0.1–7.5 مايكروغرام/ مللتر بامتصاصية مولارية 3.60×10^4 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ [21].

كما امكن اقتران حامض الفوليك المؤزوت مع كاشف 3–امينوفينول في وسط قاعدي لتكوين صبغة الأزو تقاس طيفياً عند 460 نانوميتر. بلغ مدى التقدير الخطي 2–20 مايكروغرام/ مللتر بحد كشف 0.36 مايكروغرام/ مللتر [22].

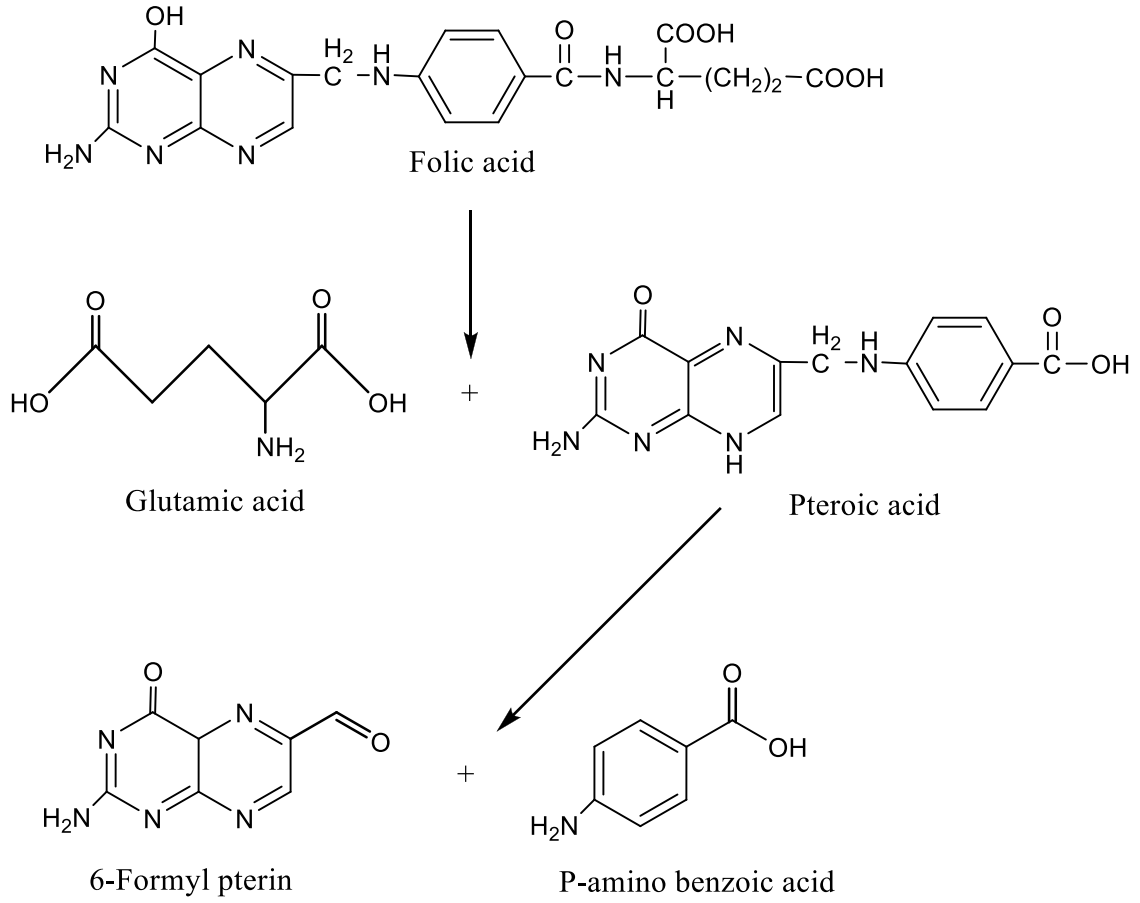
كما وصفت طرائق طيفية غير مباشره لتقدير كميات مايكروغرامية من حامض الفوليك اعتمدت على ازوتة ناتج انشطاره الاختزالي (بمسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك) الى بارا–امينوبنزويل حامض الكلوتاميك واقترانه في وسط حامضي مع الكواشف ايمينو ثنائي البنزايل (IDB) و 3 –امينو فينول (3–AP) او البايروكاتيكول (PC) بوجود موليبدات الصوديوم لتكوين نواتج ملونة تقاس عند 580 و460 و490 نانوميتر على التوالي المخطط ٨. طبقت الطريقة بنجاح على الأقراص الدوائية[23].



المخطط ٨ : تفاعل الازوتة والاقتران لحامض الفوليك مع الكواشف ايمينو ثنائي البنزايل (IDB) و 3 –امينو فينول (3-AP) او البايروكاتيكول (PC) بوجود موليبدات الصوديوم.

استحدثت طريقة طيفية بسيطة وانتقائية لتقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية بشكله النقي, خلال استخدام مذيب 0.1 مول/لتر هيدروكسيد الصوديوم وبحدود كشف وتقدير كمي 0.64–0.75 و 1.80–2.85 مليغرام/لتر على التوالي, إذ كانت نسبة الاسترجاع تتراوح بين 98–104% وانحراف قياسي نسبي اقل من 4.8% [24].

استخدمت طريقة طيفية فعالة لتقدير حامض الفوليك في الملح بوجود وسط من محلول كاربونات الصوديوم وقياس الامتصاص عند 285 نانوميتر حيث تم اختيار هذا الطول الموجي على انه انتقائي لتقدير حامض الفوليك بوجود حامض البتيرويك, حامض الكلوتاميك, حامض الامينوبنزويك, ومنتجات اخرى, بلغ المدى الخطي للتقدير 1 – 25 مايكروغرام/مللتر لحامض الفوليك, وبنسبة استرجاع 100±1.2% و 100±1.8% في الملح والمحلول بحدي كشف وتقدير كمي 0.011 و 0.033 مايكروغرام/مللتر على التوالي[25]. المخطط ٩ على النحو الآتي :-



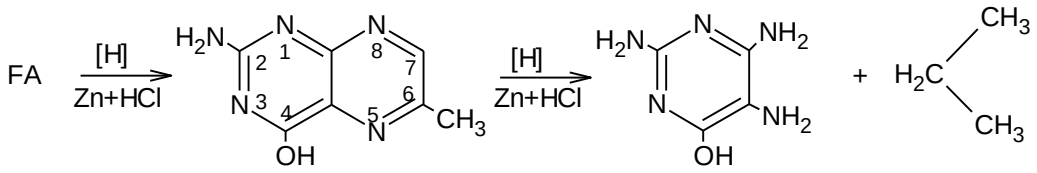
المخطط ٩ : التفاعل الطيفي الانتقائي لحامض الفوليك في وسط كاربونات الصوديوم بوجود حامض البتيرويك, حامض الكلوتاميك, حامض الامينوبنزويك.

امكن استخدام الكاشف Folin-Ciocaleteu (مزيج من تنكستات الصوديوم وموليبدات الصوديوم واورثو حامض الفسفوريك)[26] في تقدير حامض الفوليك طيفياً من خلال تكوين ناتج ازرق مخضر مستقر لمدة 90 دقيقة في وسط كاربونات الصوديوم ، إذ قيس امتصاصه عند الطول الموجي 760 نانوميتر. كان مدى الخطية للطريقة بين 4.4 – 44.0 مايكروغرام/ مللتر وبنسب استرجاع بين 100–101 %[27].

وطورت طريقة حساسة لتقدير حامض الفوليك لونياً في الحقن الدوائية بوجود lignocaine و hexamine بعد اكسدته مع برمنكنات البوتاسيوم لتكوين 4-امينو حامض البنزويك الذي يتم ازوتته واقترانه مع كاشف N-(1- نفثيل) اثيلين ثنائي الامين هيدروكلوريد (كاشف براتون- مارشال) (Bratton-Marshall reagent) عند دالة حامضية 1.8- 2.0 . تم قياس امتصاص المحلول الأرجواني اللون المتكون عند الطول الموجي 550 نانوميتر, إذ كان مقدار الخطأ النسبي لهذه الطريقة ± 4.4 %[28].

استخدم الباحث Kanjilal[29] واخرون كاشف 1،2- نفثاكوينون -4-سلفونات الصوديوم 1-(2-naphthaquinone-4-sulphonic acid (sodium salt) لتقدير حامض الفوليك طيفياً بعد اختزاله بواسطة مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك ثم قياس امتصاص الناتج المتكون عند الطول الموجي 485 نانوميتر بامتصاصية مولارية 7.067×10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$. وبلغ مدى الخطية 11.7 – 58.7 مايكروغرام/ مللتر. وتم تطبيق الطريقة على الأقراص والحقن التي تحتوي على حامض الفوليك.

استحدثت طريقة لونية لتقدير حامض الفوليك في الأقراص والحقن وذلك اعتماداً على اختزالة بواسطة مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك الى 2،4،5- ثلاثي امينو -6- هيدروكسي بردين (2،4،5-triamino-6-hydroxy pyrimidine, TAHP) وبحسب المخطط ١٠ الاتي:-



المخطط ١٠ : تفاعل اختزال حامض الفوليك بواسطة مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك الى 2،4،5- ثلاثي امينو -6- هيدروكسي بردين.

ليتم معاملة الناتج TAHP مع النهيدرين (ninhydrin) وقياس امتصاص المركب البنفسجي اللون عند 555 نانوميتر. كان مدى الخطية بين 2.4-45.0 مايكروغرام/ مللتر. بلغت نسب الاسترجاع بين 98.9-101.6% في حالة الأقراص 97.0-106.1 % في حالة الحقن[30].

استخدم ثنائي كرومات البوتاسيوم عاملاً مؤكسداً في تفاعل الاقتران التأكسدي لناتج اختزال حامض الفوليك مع كاشف الميتول (4-amino-N-methyl phenol sulphate) عند دالة حامضية 3. إذ قيس امتصاص المركب الناتج 4-N-methylquinoneimine عند طول موجي 520 نانوميتر. وكانت قيمة الامتصاصية المولارية للطريقة 7.25×10^3 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ومدى الخطية بين 1.8-14.0

مايكروغرام/ مللتر. بمعدل نسبة الاسترجاع 99.7 %. تم تطبيق الطريقة بنجاح في تقدير حامض الفوليك في الأقراص[31].

طورت ثلاث طرائق طيفية اعتمدت على تفاعل ناتج اختزال حامض الفوليك (بواسطة مسحوق الخارصين وحامض الهيدروكلوريك) مع كاشف 4- ثنائي مثيل امينو سينامالديهايد الايثانولي (ethanolic-4-dimethylamino-cinnamaldehyde) وقيس امتصاص الناتج المتكون عند طول موجي 520 نانوميتر. بمدى خطية 2.5–20.0 مايكروغرام/ مللتر. اما الطريقة الثانية فتضمنت أزوتت ناتج الاختزال ثم اقترانه مـع كاشف فلوروكلوسينول (phloroglucinol) وقياس امتصاص الصبغة الناتجة عند طول موجي 450 نانوميتر، وكان مدى الخطية بين 0.5–5.0 مايكروغرام/مللتر. وتضمنت الطريقة الثالثة تفاعل الاقتران التأكسدي لناتج الاختزال مع كاشف الفينول بوجود هايبوكلوريت الصوديوم وفي وسط قاعدي (NaOH) وقياس امتصاص الناتج المتكون عند 610 نانوميتر. كان مدى الخطية للطريقة الاخيرة بين 25–175 مايكروغرام/ مللتر، بلغ معدل نسبة الاسترجاع للطرائق الثلاث بين 98.8–99.4 %. وتم تطبيق الطرائق الثلاث على المستحضرات الصيدلانية بشكل اقراص وكبسولات وحقن[32] .

استحدثت ثلاثة طرق طيفية بسيطة (طريقة الترتيب الصفري, طريقة AUC, طريقة المشتقة الاولى) لتقدير حامض الفوليك في المستحضرات بشكله النقي, وعند طول موجي 208 و 296–306 و 193 نانوميتر, إذ كانت نسبة الاسترجاع 100.19% و 100.92% و 101.05% وبحد كشف 0.261 و 0.006 و 3.800 ملغرام/لتر على التوالي, وكان مدى التقدير الخطي 6–20 ملغرام/لتر وبانحراف قياسي نسبي اقل من 0.856% لكل طريقة على التوالي, بأمتصاصية مولارية 2.4946× 10^3 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$. وحساسية ساندل 0.0176 مايكروغرام/سم لطريقة الترتيب الصفري[33].

طُورت طرق طيفية بسيطة وحساسة لتقدير حامض الفوليك في مستحضراته الصيدلانية وبشكله النقي, تضمنت الطريقة الاولى قياس طيف الاشعة فوق البنفسجية خلال اذابة المركب الدوائي في الماء وقياس امتصاص الناتج المتكون عند 281 نانوميتر, بمدى خطية 2 – 10 مايكروغرام/مللتر وبلغت نسبة الاسترجاع 100.30% والانحراف القياسي النسبي 0.03%, اما الطريقة الثانية فتضمنت تحليل طيف المشتقة من الدرجة الاولى للتخلص من التداخل الطيفي وقياس سعة المشتقة عند 281 نانوميتر وبمدى خطية 15 – 100 مايكروغرام/مللتر, إذ بلغت نسبة الاسترجاع 99.51% بانحراف قياسي نسبي 0.36% [34].

امكن تطوير طريقة تفلورية لتقدير حامض الفوليك بالهيئة النقية وفي الخضراوات، اعتمدت على اكسدة المركب الدوائي بواسطة يودات البوتاسيوم في وسط الخلات المنظم بوجود ايون الكوبلت (II) محفزاً لتكوين بترين -6- حامض الكاربوكسيلك (pterin-6-carboxylic acid) المتفلور تقاس شدة تفلوره عند 445 نانوميتر بطول موجة إثارة 262 نانوميتر. قدر حامض الفوليك ضمن المدى الخطي 5^{-} 1×10^{-8} – 1×10 مول/لتر بحد كشف 5×10^{-4} مول/ لتر[35] .

كما قدر حامض الفوليك تفلورياً باستخدام كاشف Fenton (خليط من H_2O_2،Fe^{2+}) بوصفة عاملاً مؤكسداً للمركب الدوائي بدرجة حرارة 80 م في حمام مائي لمدة 8 دقائق لتكوين الفلوروفور، إذ وجد ان شدة انبعاثه تعطي دالة خطية ضمن مدى التراكيز 0.02-1.0 مايكروغرام/ مللتر من حامض الفوليك بحد كشف 2.69 نانوغرام/ مللتر. طبقت الطريقة بنجاح على نماذج مختلفة من الخضراوات بنسب استرجاع 91.0-96.1 %[36].

قُدر حامض الفوليك بواسطة تفاعله مع كاشف فلوروسكامين (fluorescamine) في وسط حامضي باستخدام محلول الخلات المنظم (pH4.5) وقيست شدة التفلور عند 499 نانوميتر بطول موجة اثارة 399 نانوميتر. كان مدى الخطية بين 0.05-6.0 مايكروغرام/ مللتر وقيمة الانحراف القياسي النسبي بين 5.24 و1.29 % ، بحد كشف 0.016 مايكروغرام/ مللتر. تم تطبيق الطريقة في تقدير حامض الفوليك في المنعشات الرياضية (sports beverages). كما طبقت الطريقة على المستحضرات الصيدلانية[37].

وطبقت تقنية البريق الكيميائي لتقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية اعتماداً على تأثيره التثبيطي في تفاعل البريق الكيميائي بين N-بروموسكسينميد وثنائي كلوروفلوروسين في وسط قاعدي إذ اعطى التناقص في شدة البريق دالة خطية مع تركيز المركب الدوائي ضمن المدى 6-114 مايكروغرام/ مللتر بحدود كشف وتقدير كمي 2 و 6 مايكروغرام/مللتر على التوالي[38] .

وتم تطبيق الحقن الجرياني المستمر مع تقنية البريق الكيميائي في تقدير حامض الفوليك من خلال اكسدته بواسطة ايونات السيريوم (IV) في وسط حامضي إذ تزداد شدة الانبعاث بإضافة رودامين B (rhodamin B) كمتحسس (sensitizer) إذ تنتقل الطاقة الفائضة من ايون السيريوم (III) إلى الرودامين B الذي يؤدي إلى زيادة البريق الكيميائي المنبعث وبحسب المخطط ١١ الاتي :-

$$Ce(IV) + \text{Folic acid} \rightarrow Ce(III)^{*} + \text{Folic acid}$$

reductant oxidant

$$Ce(III)^{*} \rightarrow Ce(III) + hv$$

(ضوء منبعث ضعيف)

$$Ce(III)^{*} + \text{Rho-B} \rightarrow Ce(III) + \text{Rho-B}^{*}$$

رودامين B

$$\text{Rho-B}^{*} \rightarrow \text{Rho-B} + hv$$

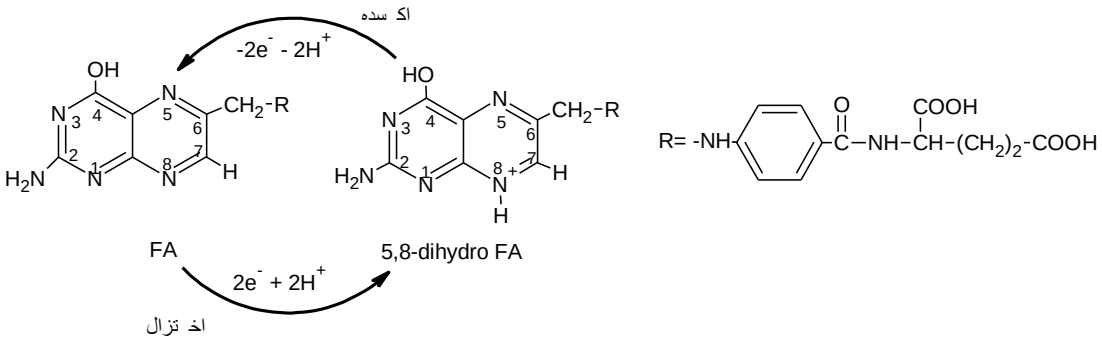
(الضوء المنبعث المقاس)

المخطط ١١ : تفاعل اكسدة حامض الفوليك بواسطة ايونات السيريوم (IV) في وسط حامضي بوجود الرودامين B.

كان مدى الخطية للطريقة بين 0.004–4.414 مايكروغرام/ مللتر وحد الكشف 0.004 مايكروغرام/ مللتر وقيمة الانحراف القياسي النسبي 0.54 % . تم تحليل 180 نموذجاً في الساعة باستخدام معدل جريان في كل ناقل (channel) مقداره 5.25 مل/دقيقة[39].

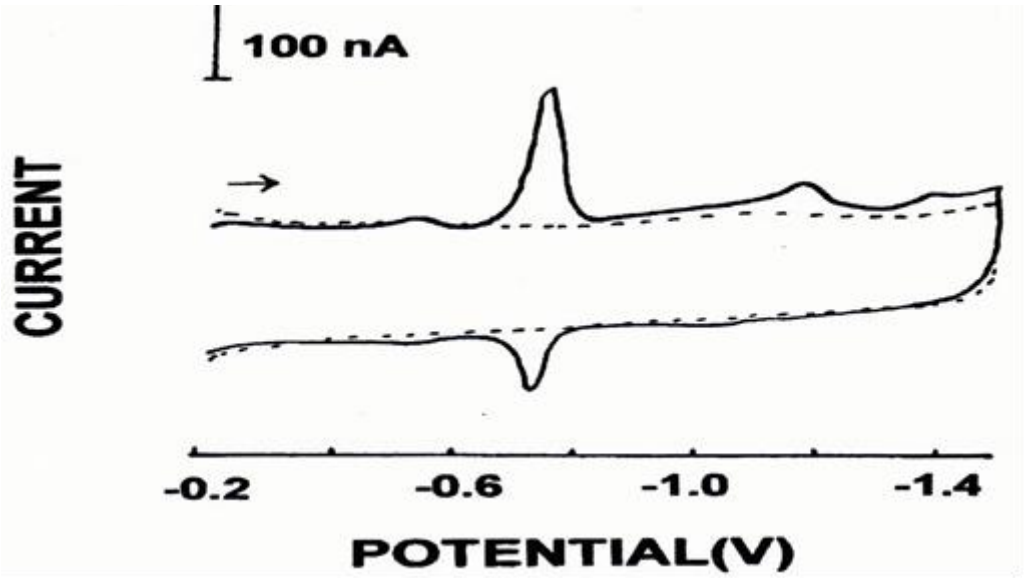
الطرائق الكهربائية

امكن تقدير حامض الفوليك بكميات ضمن المدى الخطي 5.3×10^{-5} – 1.7×10^{-3} مول/لتر بتقنية الفولتامتري الدائري وذلك اعتماداً على استخدام قطب الكاربون الزجاجي المحور بطبقة من انابيب الكاربون النانوية متعددة الطبقات مقابل قطب الفضة / كلوريد الفضة وقياس الموجة الكاثودية عند الجهد –0.7 فولت في وسط الفوسفات المنظم (pH7) المخطط ١٢. طبقت الطريقة على المستحضرات الصيدلانية[40] .



المخطط ١٢ : تفاعل اكسدة واختزال حامض الفوليك بتقنية الفولتامتري الدائري.

وطبقت تقنية فولتامتري الانتزاع الأمتزازي (Adsorption stripping voltammetry) لتقدير حامض الفوليك انتقائياً في المستحضرات الصيدلانية متعددة الفيتامينات. وذلك بامتزاز المركب الدوائي على قطرة الزئبق المعلق في وسط الفوسفات المنظم (pH4) ليتبعها القياس الفولتامتري للموجة الكاثودية عند الجهد −0.75 فولت (الشكل1). اعطت قمم التيار استجابة خطيه في مدى 1×10^{-5} – 2×10^{-6} مول/لتر بحدود كشف وتقدير كمي 1.4×10^{-8} و 1.26×10^{-7} مول/لتر على التوالي[41].

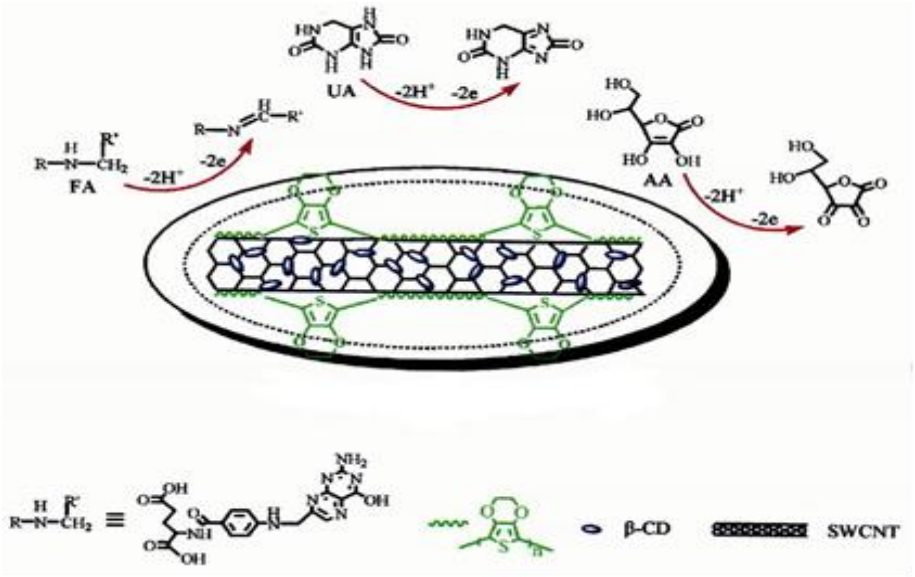


شكل ١ : فولتاموغرام الأنتزاع الدائري لحامض الفوليك.

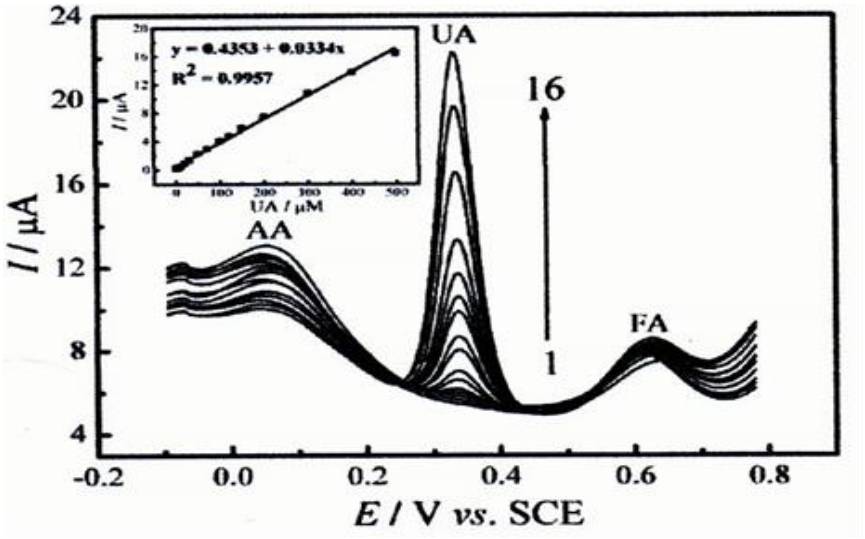
ونشرت طريقة بولاروغرافية لتقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية (بشكل اقراص) وذلك اعتماداً على قياس الموجة الكاثودية عند الجهد −0.4 فولت في وسط منظم دالته الحامضية 8 . بلغ المدى الخطي للمنحنى القياسي 9 – 883 نانوغرام/مللتر[42] .

واستخدمت تقنية الفولتامتري في تقدير حامض الفوليك في المستحضرات الصيدلانية متعددة الفيتامين إذ سجل الفولتاموغرام النبضي المشتق في نظام مكون من ثلاثة اقطاب (قطب الكاربون الزجاجي قطباً عاملاً وقطب البلاتين مساعداً وقطب الكالوميل المشبع قطباً مرجعياً) وقياس تيار الانتشار عند الجهد +0.63 فولت. بلغت الاستجابة الخطية لحامض الفوليك ضمن مدى التراكيز 5 – 10 مايكروغرام/مللتر بمعدل نسبة استرجاع 95.05 % وانحراف قياسي نسبي 1.30 %[43] .

تمكن Nie[44] واخرون من التقدير الآني لحامض الفوليك وحامض اليوريك(uric acid) بوجود حامض الاسكوربيك بتقنية الفولتامتري النبضي التفاضلي على قطب زجاجي محور بطبقة من poly (3,4-ethylene dioxy thiophene) وبنيته تحتوي على انابيب الكاربون النانوية متعددة الطبقات في وسط منظم بدالة حامضية 5 (الشكل2) . اذ اعطت قمه الموجة الانودية (الشكل 3) استجابة خطية لتقدير حامض الفوليك ضمن المدى 1 – 1000 مايكرومولاري بحد كشف 0.8 مايكرومولاري. طبقت الطريقة بنجاح على الأدرار.



شكل ٢ : ميكانيكية اكسدة حامض الفوليك وحامض اليوريك.

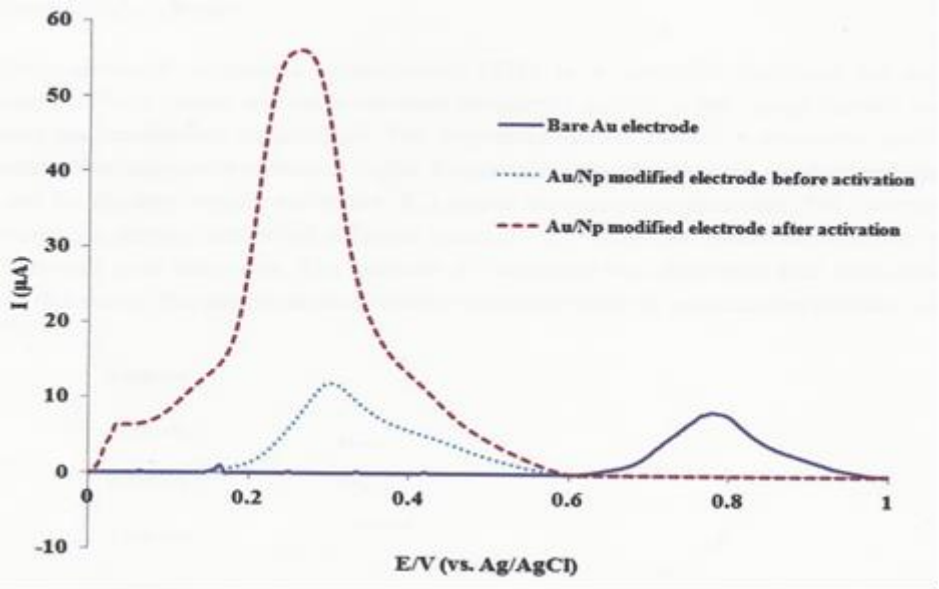


شكل 3 : فولتاموغرام لحامض الفوليك وحامض اليوريك وحامض الاسكوربيك.

استحدثت تقنية تحليلية هي الكيمياء الطيفية لأمتصاص الاشعة فوق البنفسجية والمرئية للحصول على المعلومات في وقت واحد من الكيمياء الكهربائية والتحليل الطيفي لتقدير حامض الفوليك خلال اكسدته في الوسط القاعدي (pH12.9) ليتم الكشف عنه خلال وجه القطب المستخدم مما يسمح بتطوير بروتوكول تحليلي للتقدير الطيفي الكهروكيميائي للمركب الدوائي في المستحضرات الصيدلانية عند قيم الأس الهيدروجيني القاعدي خلال التغيرات التي تحدث في الاشارة الضوئية اثناء الأكسدة الكهروكيميائية (الشكل 4) والقياس عند 332 نانوميتر بحد كشف 4.7 مايكروغرام/مولاري والقياس عند 392 نانوميتر وبحد كشف 4.8 مايكروغرام/مولاري[45].

شكل 4 : مخطط الأكسدة الكهروكيميائية.

وطورت حديثاً طريقة انتقائية لتقدير حامض الفوليك في الأطعمة والأقراص الدوائية بتطبيق تقنية فولتامتري النبضي التفاضلي وذلك بأكسدته في وسط هيدروكسيد الصوديوم عند الجهد 4.5 فولت باستخدام قطب الذهب المحور بدقائق الذهب النانوية (الشكل 5)، إذ وجد ان هناك ترابط خطي بين قمم التيار وتراكيز حامض الفوليك ضمن المدى $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-6}$ مول/لتر بحد كشف 10×10^{-9} 7.5 مول/لتر ومعامل ارتباط 0.9861[46].



شكل ٥ : فولتاموغرام حامض الفوليك.

الطرائق الكروماتوغرافيا

وحلل حامض الفوليك في عصائر الفاكهة المدعمى بالفيتامينات ومشروبات الفاكهة بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء–الطور المعاكس المزدوج الأيوني (Ion – pair RP – HPLC) تستند الطريقة على حقن حامض الفوليك المستخلص من العينات بتقنية الاستخلاص بالطور الصلب في عمود الكروماتوغرافيا باستخدام محلول الخلات المنظم (pH4.5) طوراً متحركاً. امكن التقدير ضمن المدى 0.30 – 1.40 مايكروغرام/مللتر على التوالي وانحراف قياسي نسبي اقل من 2.3 %[47].

أمكن تحليل حامض الفوليك في المشروبات التي تحتوي على الشعير بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء, إذ تم الفصل خلال عمود نوع C_{18} Column 2.1 X 50 mm X 1.8 µm باستخدام

الطور المتحرك المكون من حامض الفورميك 0.1% في الماء بنسبة حجمية (90:10 حجم/حجم) وقياس الامتصاص طيفياً عند 284 نانوميتر, بأنحراف قياسي نسبي اقل من 1.5% بكميات 20.13- 2004 مايكروغرام/لتر وبلغت حدود الكشف والتقدير الكمي 6.66-20.13 مايكروغرام/لتر وبنسبة استرجاع تراوحت بين 99.1 – 106% [48].

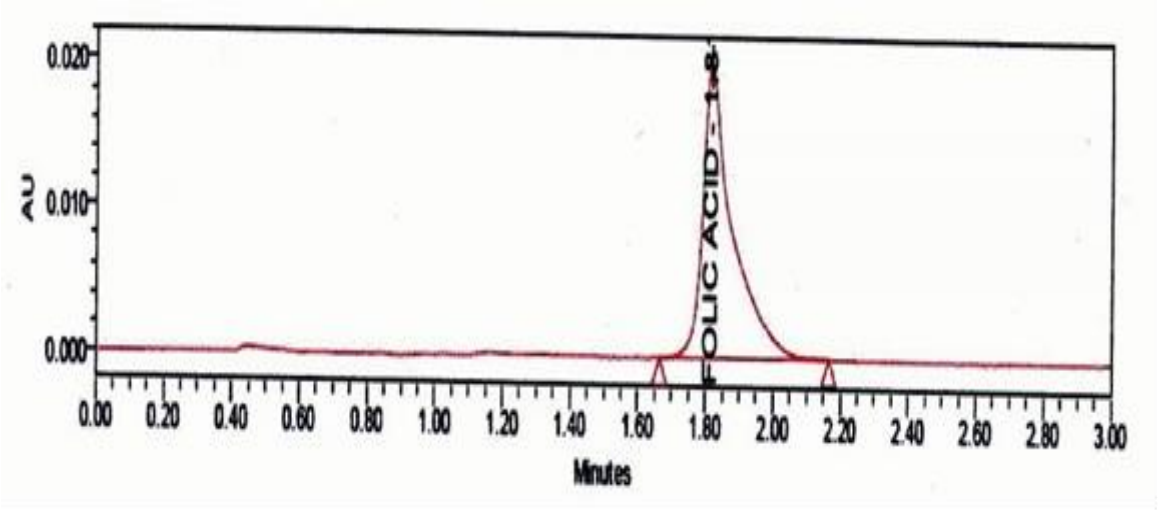
وطبقت تقنية HPLC– الطور المعاكس لتقدير حامض الفوليك في طحين الحنطة المدعم (fortified wheat flours)، إذ اعتمدت الطريقة على اجراء استخلاص المركب من الأنموذج بواسطة محلول رباعي البورات المنظم ثلاثي كلورو حامض الخليك بتقنية الاستخلاص بالطور الصلب ليتبعها الفصل الكروماتوغرافي خلال عمود Supelcosil LC18 باستخدام اسيتونيتريل حامض الخليك طوراً متحركاً والتقدير بمكشاف UV عند 280 نانوميتر. بلغت حدود الكشف والتقدير الكمي لحامض الفوليك 0.06 – 0.19 مايكروغرام/مللتر على التوالي[49].

كما حُلل حامض الفوليك في خضراوات النعناع (Mint Vegetable) بكميات 0.2 – 1.0 مايكروغرام/مللتر وبحد كشف 0.015 مايكروغرام/مللتر بتطبيق HPLC المقترنة بتقنية الاستخلاص بالطور الصلب، إذ تم الفصل خلال عمود كروماتوغرافيا نوع RP-Discovery C18 باستخدام الطور المتحرك KH_2PO_4 (pH7)– ميثانول (90 – 10 حجم/حجم) وقياس الامتصاص عند 282 نانوميتر[50].

طُبقت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء – الطور المعاكس (BLC – 20) لتقدير حامض الفوليك في نبات الخس باستخدام وسط الفوسفات المنظم (pH7) وقياس الامتصاص طيفياً عند 282 نانوميتر, امكن التقدير ضمن المدى 0.4-100 ملغرام/ لتر بحد كشف 0.042 ملغرام/ لتر وبانحراف قياسي نسبي اقل من 3.01% [51].

امكن تطبيق تقنية HPLC– الطور المعاكس في تحليل المستحضرات الصيدلانية الحاوية على حامض الفوليك بكميات مايكروغرامية إذ تم الفصل باستخدام الطور المتحرك المكون من اسيتونايترايل hexane sulfonic acid salt بدالة حامضية 2.5 بنسبة حجمية 90:10 على عمود الكروماتوغرافيا نوع C_8 والتقدير بقياس الامتصاص طيفياً عند 210 نانوميتر عند زمن احتباس 2

دقيقة بسرعة جريان 0.4 مللتر/دقيقة (الشكل 6). بلغت دقة الطريقة (نسبة الاسترجاع) 104.50 – 96.60 % وتوافقها (الانحراف القياسي النسبي) اقل من 0.2 %[52].



شكل ٦ : كروماتوغرام حامض الفوليك.

المصادر

1) T. L. Pazdernik, L. Kerecsen and M. K. Shah, "Pharmacology", (2003) Independence square west, Philadelphia, pp. 110-112.
2) Di Tinno, A., Cancelliere, R., and Micheli, L., "Determination of Folic Acid Using Biosensors—A Short Review of Recent Progress", (2021) Sensors, 21(10), p. 3360.
3) "British Pharmacopoeia on CD-ROM", (2007), 5th Edn., System simulation lted., The stationery office, London.
4) B. Shea, M. V. Swinden and Z. Ortiz, "Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis", (2013) Cochrance Database of systematic Reviews, 5, CD 00951.
5) مدخل الى الكيمياء الحياتية تأليف الأستاذة الدكتورة خولة احمد آل فليح, جامعة الموصل ٢٠٠٠م ص ١٨٦
6) J. A. Yagiela, F. J. Dowd and E. A. Neidle, "Pharmacology and therapeutics for dentistry", (2004) 5th Edn., Elsevier Mosby, Philadelphia, p 707.
7) S. S. Roach and J. C. Scherer, "Introd- uctory clinical pharmacology", (2000) Lippincott, Philadelphia, p. 558.

8) منتديات شبكة حياة – من قسم : رعاية الاطفال – رعاية المواليد – نصائح تربوية – تربية الاطفال

9) M. Czarnowska-Kujawska., J. Klepacka., O. Zielińska., and M. D. L. Samaniego Vaesken., "Characteristics of Dietary Supplements with Folic Acid Available on the Polish Market", (2022) Nutrients, 14(17), p. 3500.
10) M. Q. Al-Abachi and R.S. Al- Abaidi, "Spectrophotometric microdetermination of folic acid in pharmaceutical tablet via oxidative coupling reaction with phenothaizine in the presence of sodium periodate ", (2002) J. Edu. and Sci., 14, pp. 21-30.
11) M. Q. Al-Abachi and R.S. Al- Abaidi, "Spectrophotometric microdetermination of folic acid in pharmaceutical tablet via oxidative coupling reaction with o-aminophenol in the presence of sodium iodate", (2002) N. J. Chem.,7, pp. 382-390.
12) Z. Z. S. Al-Abdali., "Development of spectrophotometric fluorometric and high performance liquid chromatographic methods for determination of some drug compounds", (2013) ph.D. Thesis, Mosul University, pp. 43-79.
13) R. R. Al-Araji., M. S. Mashkour., and E. A. J. Al-Mulla., "Spectrophotometric determination of vitamin folic acid B9 in some drugs using 1, 2-naphthoquine-4-sulphonate (NQS)", (2017) Nano Biomedicine and Engineering, 9(3), pp. 208-213.
14) L. Wen-chao., and X. Chan-juan., "$Ce(SO_4)_2$-mediated Oxidative Coupling of Primary Aromatic Amines in Water", (2009) Chemical Research in Chinese Universities, 25(5), pp. 638-643.
15) M. Q. Al-Abachi., T. S. Al-Ghabsha., and E. S. Salih., "Application of promethazine hydrochloride as a chromogenic reagent for the spectrophotometric determination of aniline and its substituents", (1990) Microchemical J., 41(1), pp. 64-71.
16) R. S. A. Al- Abaidi., "Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical tablets", (2003) M. Sc. Thesis, Baghdad University.
17) S. O. Baban., and K. F. Azeez., "Batch and flow injection spectrophotometric methods for determination of folic acid in pharmaceutical preparations using cerium (IV) ammonium sulphate (CAS) as an oxidant". (2018) J. of Zankoy Sulaimani, 20 (2), pp. 21-33.
18) A. Jasim., "New Approach for the On-Line Spectrophotometric Determination of Folic Acid in Pure and Pharmaceutical Preparation via Oxidation by Cerium (IV) Sulphate Using Ayah 3Sx3-3D-Solar Cell CFI

Spectrophotometer Analyzer", (2014) Iraqi J. of Science, 55(3B), pp. 1153-1163.

19) M. Khateeb., B. Elias., and F. AL-Rahal., "New Kinetic Spectrophotometric Method for Determination of Folic Acid in Pharmaceutical Formulations", (2015) International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy, 50, pp. 169-178.
20) N. S. T. Al-Awadi., and R. A. K. Aldeen., "CFIA-Turbidimetric and photometric determination of vitamin B9 (folic acid) using LEDs as a source of irradiation and two solar cells as an energy transducer", (2017) Baghdad Science J., 14(4).
21) S. G. Gesso, "Development of trace quantities spectrophotometric analytical methods for determination of organic compounds", (1991) M. Sc. Thesis, Mosul University.
22) W. Ruengsitagoon., and N. Hattanat., "Simple spectrophotometric method for deter- mination of folic acid", (2012) The 4th annul northeast pharmacy research conference of pharmacy profession in harmony faculty of pharmaceutical sciences, khon Kaen university, Thailand., pp. 281-288.
23) P. Nagaraja., R. A. Vasantha., and H. S. Yathirajan., "Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or 3-aminophenol or sodium molybdate–pyrocatechol", (2002) Analytical biochemistry, 307(2), pp. 316-321.
24) M. V. D. M. Ribeiro., I. D. S. Melo., F. D. C. D. C. Lopes., and G. C. Moita., "Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry", (2016) Brazilian J. of Pharmaceutical Sciences, 52, pp. 741-750.
25) O. Modupe., J. B. Maurras., and L. L. Diosady., "A spectrophotometric method for determining the amount of folic acid in fortified salt", (2020) J. of Agriculture and Food Research, 2, 100060.
26) G. R. Rao., G. Kanjilal., and K. R. Mohan., "Extended application of Folin-Ciocalteu reagent in the determination of drugs", (1978) Analyst, 103(1230), pp. 993-994.
27) G. R. Rao., G. Kanjilal., and K. R. Mohan., "Extended application of Folin-Ciocalteu reagent in the determination of drugs", (1978) Indian J. Pharm., 40 (23), 177273.
28) I. Calafeteanu., V. Stoicescu., P. Grintescu., H. Beral., E. Dumitrescu, and C. Ivan., "Contributions to methods of examining pharmaceutical preparations

Analysis of eye drops", (1965) Pharmazeutische Zentralhalle fur Deutschland, 104, pp. 77-83.

29) G. Kanjilal., S. N. Mahajan., and G. R. Rao., "Colorimetric determination of folic acid in pharmaceutical preparations", (1975) Analyst, 100(1168), pp. 19-24.
30) G. Ramana Rao., S. N. Mahajan., G. Kanjilal., and K. R. Mohan., "New colorimetric method for folic acid assay in dosage forms", (1977) J. of the Association of Official Analytical Chemists, 60(3), pp. 531-535.
31) R. R. Krishna., and C. P. Sastry., "A new spectrophotometric method for the determination of primary aromatic amines", (1979) Talanta, 26(9), pp. 861-865.
32) M. N. Reddy., N. Viswanadham., and C. S. P. Sastry., "Spectrophotometric methods for the determination of folic acid", (1984) Ind. Drugs, 21, pp. 460-462.
33) H. A. Abbas., M. M. Rawa., D. A. Abdulabbas., and M. A. Abed., "Estimation of the Folic Acid Using Zero Order, Area Under Curve and First Derivative Spectrophotometric Methods in Pure and Marketed Tablet Formulations", (2017) Al-Nahrain J. of Science, 20(3), pp. 34-41.
34) S. S. Kshirsagar., S. M. Bhalekar., D. K. Gopale., and D. A. Shirishkumar., "Development and validation of new UV-Spectroscopic method for water soluble folic acid", (2017) Inter. J. Chem. Concepts, 3, pp. 364-70.
35) Z. Fu-lin., S. Shao-fei., G. Qiao-juan., Z. Wen-chan., W. Tian-jiao., "Catalytic oxidation fluorimetry for determination of folic Acid in vegetable", (2010) J. Inst. Anal. 3, pp. 70-75.
36) S. Wen-bin., "Fluorimetric determination of folic acid in vegetable samples using fenton reagent as oxidant", (2011) Food Sci.,4, pp. 40-48.
37) C. C. Blanco., A. S. Carretero., A. F. Gutiérrez., and M. R. Ceba., "Micellar-enhanced synchronous-derivative fluorescence determination of derivatized folic acid in pharmaceutical preparations", (1995) J. of pharmaceutical and biomedical analysis, 13(8), pp. 1019-1025.
38) T. Anastasopoulos., M. Mellos., T. Spinou, Tsiaka., and M. Timotheou-potamia "Chemilumin- ometric and Fluorimetric determination of folic acid", (2007) Anal. Lett., 40, pp. 2203-2216.
39) A. A. Al-Warthan., "Flow injection chemiluminometric determination of folic acid in pharmaceutical formulations", (1994) Analytical sciences, 10(6), pp. 919-922.

40) B. Unnikrishnan., Y. Yang., and S. Chen., "Amperometric determination of folic acid at multi-walled carbon nanotube-polyvinyl sulfonic acid composite film modified glassy carbon electrode", (2011) Int. J. Electrochem. Sci.,6, pp. 3224-3237.
41) P. A. M. Farias., M. C. Rezende., and J. Costa., "Folic acid determination in neutral pH electrolyte by adsorptive stripping voltammetry at the mercury film electrode", (2012) IOSR J. Pham.,2, pp. 302-311.
42) E. Jacobsen., and M. W. Bjørnsem., "Polarographic determination of folic acid in pharmaceutical preparations", (1978) Analytica Chimica Acta, 96(2), pp. 345-351.
43) J. Ballantine., and A. D. Woolfson., "The application of differential pulse voltammetry at the glassy carbon electrode to multivitamin analysis", (1980) J. of Pharmacy and Pharmacology, 32(1), pp. 353-356.
44) T. Nie., L. Lu., L. Bai., J. Xu., and K. Zhang., "Simultaneous determination of folic acid and uric acid under coexistence of L-Ascorbic acid using amodified electrode based on poly (3,4-ethylene dioxy thiophene) and functionalized single -walled carbon naotubes composite", (2013) Inte. J. Electr. Chem. Sci., 8, pp.7016-7029 .
45) F. Olmo., A. Rodriguez., A. Colina., and A. Heras, "UV/Vis absorption spectroelectrochemistry of folic acid", (2022) J. of Solid State Electrochemistry, 26(1), pp. 29-37.
46) L. Mirmoghtadaie., A. A. Ensafi., M. Kadivar., and M. R. Ganjali., "Highly selective sensitive and fast determination of folic acid in food samples using new electrodeposited gold nanoparticales by differential pulse voltammetry", (2013) Int. J. Electrochem. Sci, 8, pp. 3755-3767.
47) R. Amidzic., J. Brboric., O. Cudina., and S. Vladimirov., "RP-HPLC determination of vitamins, B1 , B2 , B6, folic acid and B12 in multivitamin tablet", (2005) J. Serb. Chem. Soc., 70, pp. 1229-1235.
48) E. M. Öncü-Kaya., "Determination of Folic Acid by Ultra-High Performance Liquid Chromatography in Certain Malt-based Beverages after Solid-Phase Extraction", (2017) Celal Bayar University J. of Science, 13(3), pp. 623-630.
49) J. Alaburda., A. P. Almeida., L. Shundo., V. Ruvieri., and M. Sabino., "Determination of folic acid in fortified wheat flours", (2007) J. Food Composition Anal., 21, pp. 336-342.

50) R. Rahimi., and N. Goodarzi., “Determination of folic acid in mint vegetable by high-performance liquid chromatography”, (2011) Org. Chem. J.,1, pp. 31-35.

51) I. A. A. Ibrahim., and A. J. Yusuf., “Quantitative determination of iron and folic acid in Lactuca sativa (lettuce) plant”, (2015) Advances in Applied Science Research, 6(7), pp. 112-115.

52) V. Sreeram, M. V. Basaves wara Rao and S. R. Karumuri,"A Validated and stability indicating ultra high pressure liquid chromatographic method for folic acid in pharmaceutical preparation",(2013) Int. J.chem.Studies,1, pp. 17-27.