التقدير الطيفي للثيامين بالاقتران التأكسدي مع بارا امينو فينول

بوجود بيريودات البوتاسيوم

رغد علي حامد
جامعة كركوك/ كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم الكيمياء

م.د. رواء طارق حميد
جامعة الموصل/ كلية التربية الأساسية
قسم العلوم العامة

صابرين شاكر محمود
جامعة سامراء/ كلية العلوم التطبيقية
قسم الكيمياء

(قدم للنشر في ٢٠١٨/٦/١٠ ، قبل للنشر في ٢٠١٨/١٢/٤)

ملخص البحث:

تم تطوير طريقة سهلة وذات حساسية عالية تعتمد على التقدير المباشر للثيامين وذلك من خلال تفاعل الاقتران ألتأكسدي مع الكاشف بارا–أمينو فينول بتركيز 2-١٠ ×١ مولاري حيث يتفاعل مع بيريودات البوتاسيوم بتركيز2-٣×١٠ مولاري في وسط ذي الدالة الحامضية المثلى ١١.١١، اذ تكون ناتج ذا لون برتقالي مصفر ذائب في الماء ومستقر ويصل الامتصاص عند اعلى مدى عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر. تتبع الطريقة قانون بير في مدى ٦٠–٢.٤ مايكروغرام. مل-1، بمعامل ارتباط ٠٩٩٨٦ وان الامتصاصية المولارية له هي ٨.٥٢٦ لتر. مول-1. سم-1، ودلالة ساندل ٠.٠٣٩٠ مايكروغرام. سم-2، والانحراف القياسي النسبي لا يتجاوز ٣.٢١%، وبحد كشف ١٠٠.١مايكروغرام. مل١–.طبقت الطريقة بنجاح في تقدير الثيامين في المستحضرات الصيدلانية ، وتراوحت الاسترجاعية ٩٩– ٩٩.٩ %.

الكلمات المفتاحية: الثيامين , بارا–أمينو فينول, الامتصاصية المولارية وطرائق تقدير الثيامين

Spectrophotometer Determination of Thiamine via Oxidation Coupling with para Amino Phenol and potassium Periodate

Abstract:

A spectral method was developed for the estimation of easy and highly sensitive thiamine based on the direct estimation of thiamine through the reaction of oxidative coupling with the para-amino phenol reagent at a concentration of 1 x10-2 molar with the oxidation factor of potassium periods at a concentration of 3 x 10-2 molar in the center of the function (11.11), with a yellow orange color dissolved in water and stabilized, giving the highest absorption at 441 nm wavelength. The BIR method is followed in the range of 60-2.4 µg. ML-1, with a correlation coefficient of 0.9986, and the molar absorbance 8.526 ×103 liter. Mol-1. cm-1, and Sandal marker 0.0390 µg. cm-2, the relative standard deviation does not exceed 3.21%, and the detection limit is 1.001 µg. ML-1. The method was successful in estimating thiamine in pharmaceuticals, and ranged between 99-99.9%.

Key words: Thiamine, para-amino phenol, molar absorption and thiamine estimation methods.

المقدمة

المستحضر الدوائي الثيامين هايدروكلورايد **Thiamine hydrochlo**

التعريف بالدواء

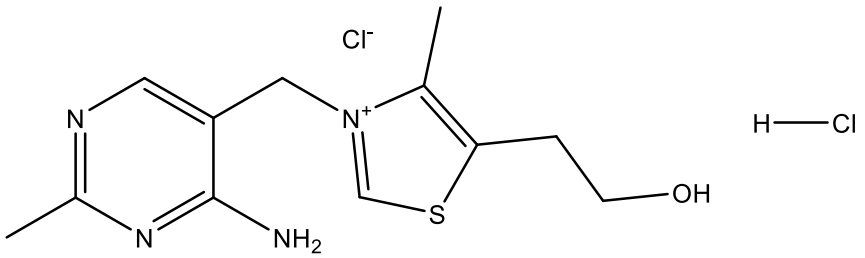
الاسم العلمي لهذا الدواء هو

3-[(4-amino-2-methylpyrimidin- 5-yl) methyl]-5-(2hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloridhydrochlorid

الاسماء التجارية للعقار[1]

Surbex,Theravite,vicon-c,Z-bec,Nwrvovit,Beblx.

الصيغة التركيبية للدواء:



Thiamine hydrochlorid

والصيغة الجزيئية للعقار $C_{12}H_{17}ClN_4OS,HCl$ ووزنه الجزيئي **337.3** غم /مول،وهو مسحوق ابيض بلوري او ابيض تقريبا ، قابل للذوبان في الماء المقطر بشكل جيد , يذوب في الكليسرول, قليل الذوبان في الكحول.[2]

الفعالية البابلوجية للدواء:

الثيامين (thiamin) هو الأسم العلمي لما كان يعرف سابقا بفيتامين ب١ ويجب عدم الخلط بينه وبين الثايمين (thymine)وهو قاعدة نيتروجينية[3]ويعتبر هذا الفيتامين ضروريا لوظائف الاعصاب و أداء العضلات و المساعده فى إنتاج الطاقه من الكربوهيدرات و البروتينات و الدهون[4] .

-مصادره:

اللحوم – الدواجن – الاسماك – الالبان و منتجاتها – البقول – الخميره – الكبد – الحبوب الكامله (لذلك يعتبر الارز غير المقشور – حبوب القمح الكامله وكذلك مطحون حبة القمح الكامله من المصادر الجيده لهذا الفيتامين)[5] .

-استطبابات الدواء[6]:

الثيامين مهم جدا للقيام بالعديد من المهام الحيوية في الجسم، ومنها :

1) الجهاز العصبي وأداء العضلات

2) تدفق المنحلات الكهربائية من و الى الخلايا العصبيهوالعضليه (من خلال القنوات الأيونية)

3) عمليات الانزيمات المختلفة (خلال كونزيمبيروفوسفيت الثيامين)

4) ايض الكربوهيدرات

5) انتاج حمض الهيدروكلوريك (ضروري لعملية الهضم) .

بسبب وجود كمية ضئيلة جدا من الثيامين مخزنه في الجسم ، يمكن ان يحدث استنزاف سريع لا يتعدى ١٤ يوما . والثيامين النشط هو ثيامين ثنائي الفوسفات وهو يعمل كمرافق إنزيم (كوإنزيم) في عمليات نزع الكربوكسيل (في البيروفاتpyruvateوالكيتوجلوتاراتketoglutarate) وفي عمليات إضافة الكيتول transketolation pathways في أيض الكربوهيدرات وربما في عمليات التوصيل العصبي (الفيتامين ضروري لتكوين الأسيتيل كولين) .

-الاثار الجانبية للدواء:

في بعض الحالات النادرة ، يمكن أن لمكملات فيتامينات B1يسبب رد فعل تحسسي . الأعراض الأكثر شيوعا من الحساسية هو تهيج الجلد مما يؤدي إلى الجفاف ، وحكة في الجلد أو الطفح الجلدي . أيضا في حالات نادرة ، قد يحدث رد فعل أكثر حدة ، مما يؤدي إلى الغثيان ، والدوخة ، وضيق في التنفس وتورم في اليدين والوجه والفم أو الحلق[7] .

الاجهزة المستخدمة

تَم استخدام الأجهزة الآتية للقياسات :

١-جهاز المطياف \او الحزمة الواحدة نوع **CECIL single beam CE**١٠٢١.

٢-جهاز المطياف مزدوج الحزمة نوع **Shimadzu UV-Visible Spectrophotometer UV-160**

٣- خلايا نوع كوارتز وسليكا

٤- حمام مائي نوع **Galleahomb** .

٥-جهاز قياس الدالة الحامضية نوع **pH meter 3310 (Jenway)**

٦- ميزان حساس نوع**Sartorius BL 210S**

الجدول (١)الكواشف والمواد الكيميائية المستخدمة

Chemical name	Chemical formula
Thiamine hydrochloride	**$C_{12}H_{17}ClN_4OS,HCl$**
p- Amino phenol.HCl	**C_6H_7NO,HCl**
potassium periodate	**KIO_4**
Sodium Hydroxide	**NaOH**

–محاليل المواد المستخدمة :

– محاليل المواد والكواشف الكيميائية

- محلول الثيامين القياسي ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$ **(8.89×10^{-4}** مولاري)

يتم تحضير هذا المحلول بإذابة ٠.٠٣٠٠ غرام من الثيامين هيدروكلوريد في يتم اذابته بلماء المقطر باستخدام قنينة حجمية سعة ١٠٠ مل.

- محلول العامل المؤكسد بيريودات البوتاسيوم ٣×10^{-2} مولاري.

يتم تحضير هذا المحلول باذابة ٠.٦٩٠٠غرام منه بلماء المقطر مع القليل من التسخين باستخدام قنينة حجمية سعة ١٠٠ مل.

- محلول بارا–أمينو فينول ١×10^{-2} مولاري

حضر المحلول باذابة ٠.١٤٦١ غرام في ١٠٠ مل من الماء المقطر باستخدام قنينة حجمية سعة ١٠٠ مل.

- محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز تقريبي ٠.١ مولاي

حضر هذا المحلول باذابة ٠.٤٠٠٠ غرام في ١٠٠ مل من الماء المقطر باستخدام قنينة حجمية سعة ١٠٠ مل.

– –محاليل المستحضرات الصيدلانية

- محلول كبسول الدواء (٥ ملغم) بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$

Capsul Beblx (Thiamine hydrochlorid) (5 mg) S.D.I Iraq[8]

يحتوي كل كبسول على ٥ ملغرام من الثيامين ويحضر المحلول باذابة ٦ كبسولات في الماء المقطر لتحضير محلول بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$ ويذاب بالماء المقطر، ثم يرشح المحلول

ويغسل الراسب عدة مرات بالماء المقطر، ويكمل الحجم الى ١٠٠ مل في قنينة حجمية سعة ١٠٠ مل، للحصول على محلول بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$.

-الجزء العملي

مبدأ الطريقة

مبدأ الطريقة هو اقتران الثيامين بالكاشف بارا-أمينو فينول حيث يتفاعل مع بيريودات البوتاسيوم مع قاعدة إذ يتكون محلول لونه اصفر- برتقالي ويمتص عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

- الاختبارات الأولية

لوحظ عند إضافة ١ مل من بيريودات بتركيز ١×١٠^{-2} مولاري إلى٢ مل من محلول الثيامين بتركيز٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$في وسط قاعدي (١ مل من ٠.١ مولاري **NaOH**)، وبوجود ٢ مل من بارا-أمينو فينول بتركيز ١×١٠^{-2} مولاري تكون محلول لونه برتقالي مصفر. تم التخفيف بالماء المقطر بلقنينة الحجمية سعة ٢٥ مل، وتم قياس الطيف للناتج الملون حيث أعطى الامتصاصعند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر مقابل محلوله الصوري.

- دراسة ظروف التفاعل المثلى

تم دراسة مختلف العوامل المؤثرة على الامتصاص باستخدام ٢ مل من الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$، في حجم نهائي مقداره ٢٥ مل (وتركيز نهائي ٢٤ مايكروغرام. مل$^{-1}$)، وتم قيس الامتصاص للمحاليل عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر حيث يقابل المحلول الصوري.

- تأثير نوع العامل المؤكسد

تم استخدام عدة عوامل مؤكسدة بتركيز ٣×١٠^{-2} مولاري لكل منها وبحجم ١مل أضيفت إلى ٢ مل من الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$ و١مل من محلول قاعدي (٠.١ مولاري **NaOH**) ٢مل من الكاشف بارا-أمينو فينول بتركيز ١×١٠^{-2} مولاري في القنينة الحجمية حجم ٢٥ مل، وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة. بعدها تم قياس الامتصاص لكل نموذج مقابل محلوله الصوري في مدى من الطول الموجي بين ٨٠٠-٢٠٠ نانوميتر، ووجد أن أفضل عامل مؤكسد هو بيريودات البوتاسيوم والنتائج مبينة في الجدول (٢) لذلك تم استخدامه في التجارب اللاحقة.

الجدول (٢) تأثير نوع العامل المؤكسد

Oxidizing agent $3\times10^{-2}M$	Δλ (nm)	Absorbance		$L.mol^{-1}.cm^{-1}$. Ɛ
		S	B	
KIO_4	91	0.626	0.118	8.816×10^3
KIO_3	99	0.474	0.616	6.657×10^3
$Na_2[Fe(CN)_6NO]$	227	0.634	0.523	8.904×10^3
K_2CrO_4	77	0.660	0.457	9.269×10^3

اختيار أفضل عامل اقتران

تم استخدام عدد من الكواشف الكيمياوية التي من الممكن استخدامها عوامل اقتران بتركيز ١×١٠$^{-2}$ مولاري وحجم ٢ مل في تقدير الثيامين، أضيفت الى قنان حجمية سعة ٢٥ مل تحتوي ٢مل من الثيامين بتركيز٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$ و١ مل من الوسط القاعدي(٠.١ مولاري (**NaOH**)، بوجود ١مل من العامل المؤكسد بيريودات البوتاسيوم بتركيز ٣×١٠$^{-2}$ مولاري، وتم قياس الامتصاص لكل نموذج مقابل محلوله الصوري في مدى من الطول الموجي بين ٨٠٠–٢٠٠ نانوميتر، ومن النتائج الموضحة في الجدول٢ تم اختيار بارا–أمينو فينول عامل اقتران لأنه أعطى أعلى امتصاص للناتج الملون عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر.

الجدول (٣) اختيار أفضل عامل اقتران

Reagent 10^{-2}M×1	Variable	Absorbance	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$L.mol^{-1}.Cm^{-1}$.ε
p-Amino phenol.HCl	S	0.658	441	95	9.143×10^{3}
	B	0.260	350		
8-hydroxyquinoline	S	0.348	710	10	4.887×10^{3}
	B	0.259	700		
Resorcinol	S	0.301	384	42	4.227×10^{3}
	B	0.261	342		

تأثير زمن الأكسدة

تمت دراسة الزمن اللازم للأكسدة بواسطة بيريودات البوتاسيوم بأخذ سلسلة من القناني الحجمية حجم ٢٥ مل، ويتم اضافة ٢ مل من محلول الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل $^{-1}$ و١مل من المحلول القاعدي (٠.١ مولاري**NaOH**) ، ثم أضيف ٢مل من محلول الكاشف بارا–أمينو فينول بتركيز١×١٠$^{-2}$ مولاري ثم أضيف١ مل من محلول بيريودات البوتاسيوم بتركيز٣ ×١٠$^{-2}$ مولاري، وتركت المحاليل مدد زمنية مختلفة، بعدها تم التخفيف بالماء المقطر إلى ٢٥ مل، وقيس الامتصاص اللمحاليل عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر مقابل المحلول الصوري والنتائج مبينة في الجدول (٤) .

الجدول (٤) تأثير زمن الأكسدة

Time Minutes	0	5	10	15	20
Absorbance	0.377	0.558	0.632	0.621	0.618

يلاحظ من الجدول (٤) أن١٠دقائق كافية لإتمام التفاعل لذا تم اعتماده في التجارب اللاحقة.

تأثير الدالة الحامضية

تم دراسة تأثير الدالة الحامضية على الامتصاص باستخدام هيدروكسيد الصوديوم بحجوم مختلفة اضيفت إلى قناني حجمية سعة ٢٥ مل تحتوي٢ مل من محلول الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$، ثم أضافة ٢ مل من بارا–أمينو فينول بتركيز $^{-2}$ ١٠×١ مولاري ثم اضيفت١ مل من محلول العامل المؤكسد بيريودات البوتاسيوم بتركيز $^{-2}$١٠×٣ مولاري، تركت المحاليل لمدة ١٠ دقائق ثم خففت بالماء المقطر إلى حد العلامة ، تم قياس الامتصاص لجميع المحاليل عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر، مقابل محاليلها الصورية والنتائج مبينة في الجدول (٥).

جدول (٥) تأثير الدالة الحامضية

NaOH(0.1)M ml of		0.2	0.5	0.7	1	1.5	2	2.5
Absorbance	S.B	0.456	0.618	0.623	0.627	0.632	0.651	0.665
	B.W	0.034	0.083	0.107	0.121	0.151	0.260	0.313
	pH	8.23	10.71	10.98	11.11	11.76	11.78	11.80

يلاحظ من الجدول الاعلاه ان استخدام ١مل كافية لاتمام التفاعل لذا تم اعتماده في التجارب اللاحقه

تأثير كمية العامل المؤكسد:

يتم ايجاد الحجم المفضل للعامل المؤكسد بيريودات البوتاسيوم في الامتصاص بتركيز 3×10^{-2} مولاري بإضافة أحجام مختلفة (٤-٠.٥ مل) منه إلى حجم ثابت ٢ مل من الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$، في ١ مل من المحلول قاعدي) ٠.١ مولاري من **NaOH**) ، و٢ مل من بارا-أمينو فينول بتركيز 1×10^{-2} مولاري، ويتم اكمال القنينة بالماء المقطر إلى ٢٥ مل في قنينة حجمية سعة ٢٥ مل، بعدها تم قياس الامتصاص لجميع المحاليل عند اعلى طول الموجي ٤٤١ نانوميتر مقابل محاليلها الصورية والنتائج مبينة في الجدول (٦).

الجدول (٦) تأثير حجم العامل المؤكسد

Amount (ml) Potassium periodate 3×10^{-2}M	**Absorbance of 24 µg /ml**	
	S.B	**B.W**
0.5	**0.834**	**0.344**
0.7	**0.766**	**0.300**
1	**0.623**	**0.111**
1.5	**0.420**	**0.101**
2	**0.385**	**0.070**
2.5	**0.362**	**0.056**
3	**0.328**	**0.043**
4	**0.301**	**0.034**

يلاحظ من النتائج الموضحة في الجدول (٦) أن استخدام الإحجام ١ -٠.٥ مل كافية لأكسدة الثيامين إذ تم استخدام ١.٠ مل في التجارب اللاحقة.

تأثير كمية الكاشف بارا–امينو فينول

تمت دراسة تأثير كمية الكاشف المستخدم وذلك بإضافة أحجام متزايدة ٢.٥–٠.٥) مل) من بارا–أمينو فينول بتركيز $^{-2}$١٠×١ مولاري أضيفت إلى قناني حجم ٢٥ مل، تحتوي أحجاما مختلفة (٠.٥، ١.٠، ١.٥،٢، ٣مل) من الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل $^{-1}$و١ مل من ٠.١ مولاري **NaOH**، ويتم اضافة ١مل من محلول بيريودات البوتاسيوم بتركيز **10^{-2}**×١ مولاري، تركت المحاليل لمدة ١٠ دقائق ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة وتم قياس الامتصاص لجميع المحاليل عند طول موجي٤٤١ نانوميتر مقابل محاليلها الصورية والنتائج مبينة في الجدول (٧).

الجدول (٧) تأثير كمية الكاشف بارا–أمينو فينول

Amount(ml)of p-aminophenol 1×10^{-2}M	**Absorbance of µg/ml of thiamine .HCl**					
	B.W	**6**	**12**	**18**	**24**	**36**
0.5	**0.035**	**0.075**	**0.218**	**0.323**	**0.392**	**0.524**
1	**0.045**	**0.116**	**0.279**	**0.335**	**0.579**	**0.730**
1.5	**0.074**	**0.175**	**0.297**	**0.469**	**0.627**	**0.818**
2	**0.113**	**0.224**	**0.373**	**0.483**	**0.630**	**0.831**
2.5	**0.234**	**0.120**	**0.206**	**0.276**	**0.427**	**0.557**

يتبين من النتائج الموضحة في الجدول (٧) إن استخدام ١.٥ مل من الكاشف لذا تم استخدام ذلك في التجارب اللاحقة.

–تأثير تسلسل الإضافات

إن لتسلسل إضافة المحاليل المستخدمة أحيانا تأثيرا على شدة لون المركب الناتج لذلك تم إجراء عدد من التجارب وبتسلسل إضافات مختلفة، علما إن جميع الاحجام وتراكيز المواد المستخدمة كانت نفسها في الحالات كافة، ولوحظ من النتائج التي تم الحصول عليها في الجدول (٨) أن الترتيب (١) يعطي أعلى امتصاص لذلك تم استخدامه في التجارب اللاحقة.

الجدول (٨) تأثير تسلسل الإضافات

No	Order of additions	Absorbance
1	D + R + B + O	0.633
2	D + R + O + B	0.275
3	D + B + R + O	0.512
4	D + O + R + B	0.115

- **Thiamine hydrochloride(D)**
- **p-Amino phenol (R)**
- **Potassium periodate (O)**
- **Base NaOH (B)**

.

استقرارية الناتج المتكون

تم تتبع قيم الامتصاص لمحلول الثيامين بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$بأحجام متعددة (٢، ٣،٤ مل)، المقاسة باستخدام الظروف المثلى التي تم الحصول عليها في التجارب السابقة، ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر في قنان حجمية سعة ٢٥ مل، بعدها تم قياس الامتصاص للمحاليل الملونة بعد مدد زمنية مختلفة بالدقائق عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر مقابل محاليلها الصورية والنتائج مبينة في الجدول (١٠) .

الجدول (١٠) استقرارية الناتج المتكون

Time (min)	Absorbance of µg / ml of Thiamine hydrochloride		
	24	36	48
0	0.358	0.697	0.989
5	0.564	0.749	1.008
10	0.628	0.844	1.213
15	0.624	0.839	1.283
20	0.621	0.828	1.276
25	0.609	0.810	1.263
30	0.574	0.775	1.232
35	0.557	0.744	1.213
40	0.535	0.734	1.198
50	0.498	0.700	1.172
60	0.484	0.689	1.146

يتبين من النتائج في الجدول (١٠) اكتمال الناتج الملون خلال ١٠دقائق ويبقى ثابته لمدة ٣٠ دقيقة على الأقل وهي مدة كافية لأجراء القياسات.

٢-٣-١٠-تأثير نوع المذيب المستخدم

بعد إضافة جميع مكونات التفاعل حسب الطريقة المثلى في التجارب السابقة، تّم استخدام مذيبات عضوية مختلفة لإكمال الحجوم إلى حد العلامة في قنانٍ حجميه سعة ١٠ مل للحصول على اعلى امتصاص والنتائج مبينة في الجدول (١١) .

الجدول (١١) تأثير نوع المذيب المستخدم

Solvent	λ_{max} (nm)	Absorbance
Water	441	0.626
Ethanol	434	1.093
Methanol	436	1.484

توضح النتائج في الجدول (١١) أن الماء المقطر يعد وسط جيد ويعطي امتصاص جيد للناتج الملون عند الطول الموجي ٤٤١نانوميتر.

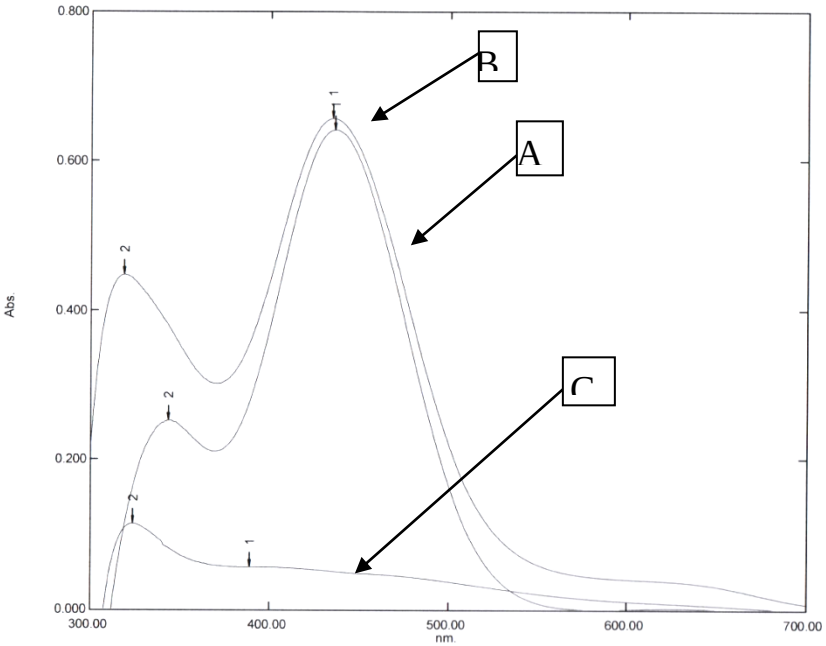
طيف الامتصاص النهائي

من خلال نتائج التجارب السابقة، تم تلخيص الظروف المثلى لتقدير الثيامين حسب ما موضح في الجدول (١٢) .

الجدول (١٢) ملخص الظروف المثلى لتقدير الثيامين

Experimental Conditions	
441	**λ_{max}**
1.5ml	**Amount (ml) of 1×10^{-2} M p-Amino phenol hydrochloride**
1.0 ml	**Amount (ml) of 3×10^{-2} M potassium periodate**
1 ml	**Amount (ml) of NaOH 0.1M**
Min.10	**Oxidation time**
Water	**Solvent**

تم التأكد من الطول الموجي لأعلى امتصاص تحت ظروف العمل المثلى لتقدير الثيامين بقياس طيف الامتصاص للمحلول الناتج وتم الحصول على الشكل (١) وتبين أن الطول الموجي لأعلى امتصاص هو ٤٤١ نانوميتر، وحسب ما وجد في الاختبارات الاولية.



شكل رقم (١) طيف الامتصاص النهائي للثيامين

(**A**) محلول ٢٤ مايكروغرام. مل$^{-1}$من الثيامين النقي مقابل المحلول الصوري.

(**B**) محلول الثيامين مقابل الماء.

(**C**) المحلول الصوري مقابل الماء المقطر.

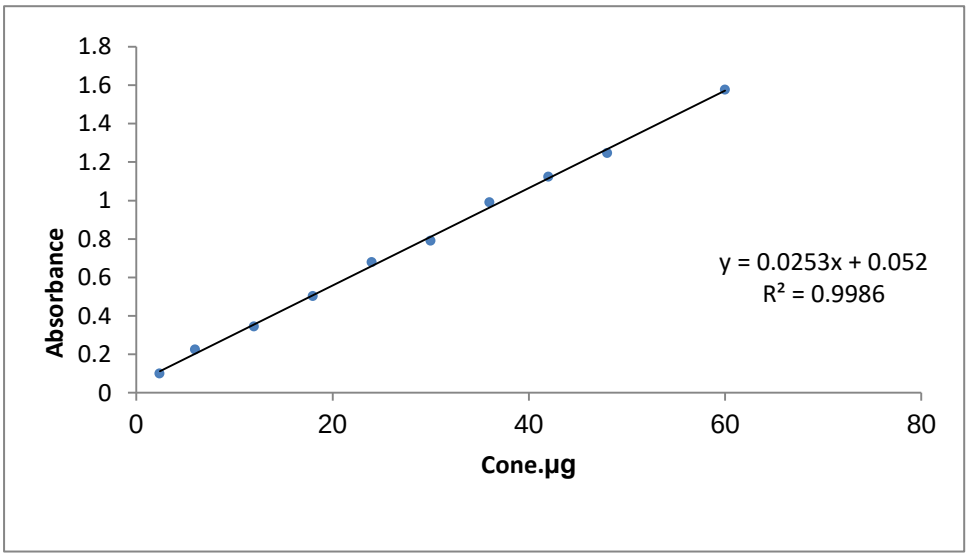
– طريقة العمل المعتمدة وإعداد منحني المعايرة

يتم تثبيت الظروف المثلى لتقدير الثيامين [٩]حضر المنحني القياسي وحسب الاتي:

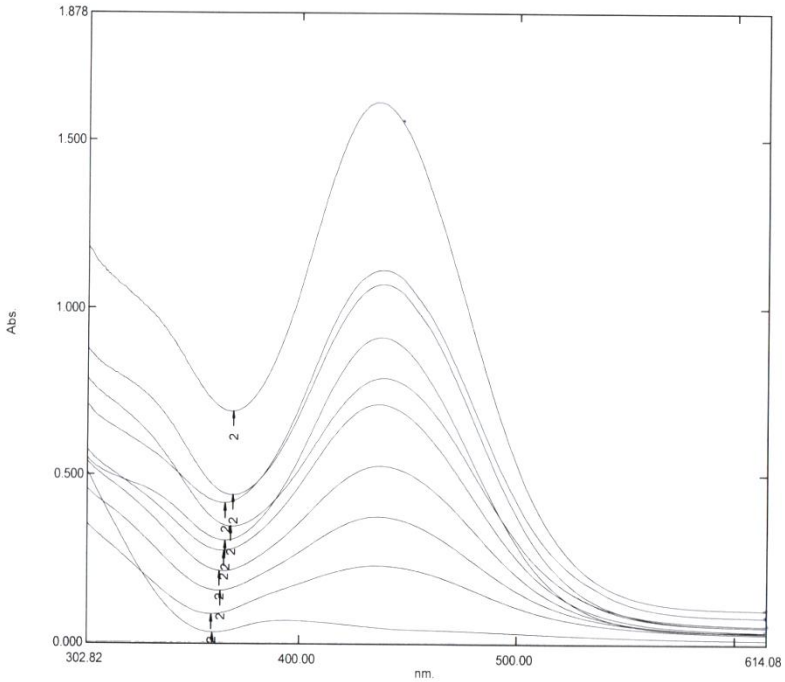
أضيفت حجوم متزايدة (٥–٠.٢ مل) من محلول الثيامين ذو تركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$الى سلسلة من القناني الحجمية سعة ٢٥ مل، واضيف إليها ١.٥ مل محلول الكاشف بارا–أمينو فينول بتركيز ١×١٠^{-2} مولاري، ثم اضيف ١ مل من **NaOH**، بعدها أضيف ١ مل

بوجود العامل المؤكسد بيريودات البوتاسيوم بتركيز 3×10^{-2} مولاري، وتركت المحاليل ١٠ دقائق ثم يكمل الحجم بالماء المقطر، وتم قياس الامتصاص لجميع المحاليل عند ٤٤١ نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

يمثل الشكل (٢) المنحني القياسي الذي ويتبع قانون بير لمدى من التراكيز بين ٦٠–٢.٤ مايكروغرام. مل$^{-1}$من الثيامين، وبلغت الامتصاصية المولارية للطريقة (٨.٥٢٨٦× **10** ^{3}لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$)، وبلغت دلالة ساندل ٠.٠٣٩٥ مايكروغرام. سم$^{-2}$، وقيمة معامل الارتباط ٠.٩٩٨٦، وهذا يدل على أن المنحني القياسي ذو مواصفات خطية عالية.



الشكل رقم (٢) منحني القياسي لتقدير الثيامين



الشكل (٣) طيف الامتصاص لتراكيز بين ٦٠-٢.٤ مايكروغرام. مل$^{-1}$ من مع الكاشف والعامل المؤكسد

- دقة الطريقة وتوافقيتها:

تم حساب دقة الطريقة المقترحة لتقدير الثيامين هيدروكلوريد وتوافقيتها تحت الظروف المثالية المبينة حسب طريقة العمل، وذلك من خلال قياس الاسترجاعية والانحراف القياسي النسبي لثلاثة تراكيز مختلفة من (١٢، ٣٠، ٤٢) مايكروغرام. مل$^{-1}$ بأخذ معدل ست قراءات لكل منها، وكان معدل الاسترجاعية ٩٩.٦ %، والانحراف القياسي النسبي لا يتجاوز ٣.٢١١%، أي أن الطريقة ذات دقة عالية وذات توافق جيد .

والنتائج مبينة في الجدول (١٣) .

الجدول (١٣) دقة الطريقة وتوافقيتها

Amount of thiamine Taken µg/ml[10]	RE.%	Recovery.%	Average recovery.%	RSD.%
12	-1.5	98.4	99.6	3.211
30	0.4	100.4		0.935
42	0.2	100.2		0.864

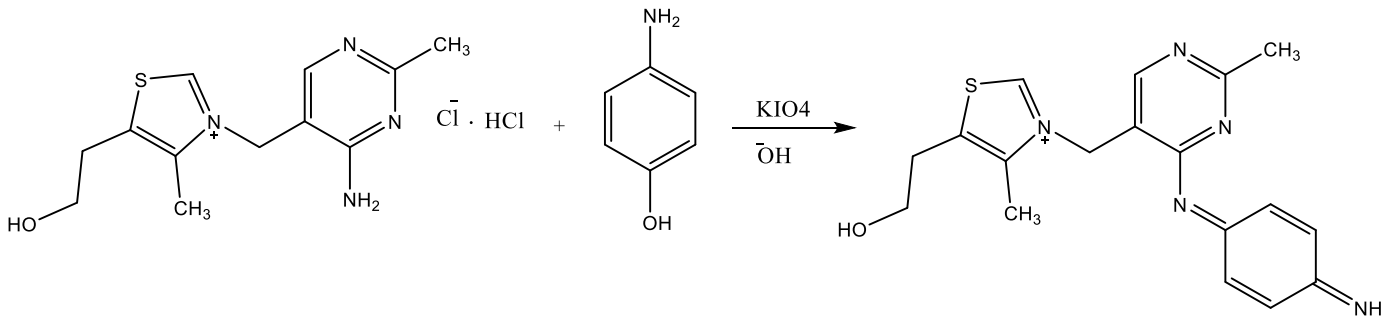
- حد الكشف

تم حساب حد الكشف لتقدير الثيامين عند اعلى طول موجي ٤٤١ نانوميتر، وذلك بقياس الامتصاص لأدنى تركيز مأخوذ من منحنى المعايرة ٢.٤ مايكروغرام. مل$^{-1}$ولست مرات وعند الظروف نفسها والنتائج مبينة في الجدول (١٤)

الجدول (١٤) حد الكشف

Concentration µg/ml	$\bar{X}$	S	D.L µg/ml
2.4	0.1043	0.0146	1.001

وعليه تكون معادلة التفاعل المقترحة كالاتي:



-الجزء التطبيقي

- تقدير الثيامين في كبسول البيبلكس ٥ ملغرام بالطريقة المباشرة[١١]

تم أخذ حجوم مختلفة (٠.٥، ٢.٠، ٣ مل) من محلول القرص الدوائي ٥ملغرام في للحصول على تراكيز (٦، ٢٤، ٣٦) مايكروغرام. مل$^{-1}$، تمت معاملتها وفق طريقة العمل المثلى، وتم قياس الامتصاص (معدل ست قراءات) لكل محلول مقابل محلوله الصوري عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر، وتم حساب الاسترجاعية و**RSD** والنتائج مبينة في الجدول (١٥) .

الجدول (١٥) تقدير الثيامين في كبسول البيبلكس (٥ملغرام) بالطريقة المباشرة

Amount of Beblx Tablets taken µg/ml	Thiamine.HCl measured µg/ml	RE.%	Recovery.%	Average recovery.%	RSD.%
6	5.94	1-	99	99.4	0.18
24	23.86	-0.58	99.42		2.57
36	36.02	0.05	99.9		1.17

تؤكد نتائج الجدول(١٥) نجاح الطريقة المقترحة في تقدير الثيامين في الأقراص الدوائية المدروسة.

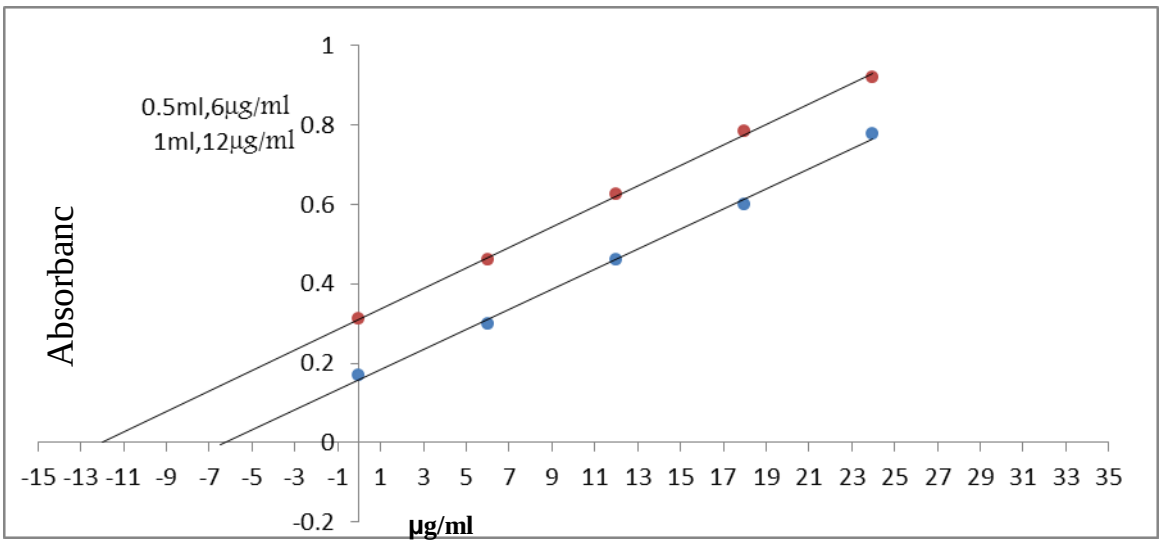
– طريقة الإضافات القياسية

لمعرفة مدى كفاءة الطريقة المقترحة ودقتها واثبات أن الطريقة المطورة خالية من التداخلات، طبقت طريقة الإضافات القياسية في تقدير الثيامين في المستحضرات الصيدلانية،[١٢] تضمنت الطريقة إضافة كميات ثابتة (٠.٥ و١ مل) من محلول كبسول ببلكس ٥ ملغم بتركيز ٣٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$ ثم إضافة حجوم متزايدة (٠.٣، ٠.٥، ١.٠، ١.٥ مل) من المحلول القياسي النقي ذي تركيز ٥٠٠ مايكروغرام. مل$^{-1}$، وتركت إحدى القناني بدون إضافة، وتم معاملة المحاليل أعلاه بنفس طريقة العمل المستخدمة عند تحضير منحنى المعايرة، ثم تم قياس الامتصاص (معدل ست قراءات) لكل محلول مقابل محلوله الصوري عند الطول الموجي ٤٤١ نانوميتر، والنتائج مبينة حسب الجدول (١٦) والأشكال (٦)

الجدول (١٦) طريقة الإضافات القياسية

Type of Drug	Thiamine .HCl present µg/ml	Thiamine.HCl measured µg/ml	Recovery (%)
Tablets Beblx Thiamine.HCl 5mg S.D.I Iraq	6	5.94	99.01
	12	12.01	100.08

يتبين من نتائج الجدول(١٦) أن طريقة الإضافات القياسية متفقة وبشكل جيد مع الطريقة المباشرة ضمن المدى المقبول للخطأ مما يدل على أن الطريقة مرضية وخالية من التداخلات.



الشكل (٦) منحنى الإضافات القياسية لتقدير الثيامين في كبسول ٥ ملغرام

-التقييم الاحصائي لنتائج الطريقة المقترحة

أجريت مقارنة بين الطريقة التحليلية المقترحة والطريقة القياسية لمعرفة مدى دقة وصلاحية التطبيق التحليلي للطريقة المقترحة من خلال تطبيق الاختبارين الآتيين:

٢-١٠-١-اختبار **t**[١٣]

اذ وجد ان قيمة **t** التجريبية١.٥٥± اقل من قيمة **t** الجدولية البالغة ٢.٧٧٦عند مستوى ثقة ٩٥% ولأربع درجات حرية، وهذا يشير إلى ان الطريقتين لا تختلفان من حيث المصداقية.

- اختبار **F**[١٤]

يستخدم هذا الاختبار لمعرفة فيما إذا كان هناك فرق معنوي بين نتائج الطريقة المقترحة والطريقة القياسية وبتطبيق المعادلة الإحصائية في الملحق وجد ان قيمة **F** التجريبية ١.١٨ اقل من قيمة **F** الجدولية البالغة ٩.٢٨عند مستوى ثقة ٩٥% ولثلاث درجات حرية، لذا يمكن ان نحكم بانه لا يوجد فرق معنوي بين الطريقتين، وان الانحراف القياسي لكلتا الطريقتين ناتج عن أخطاء عشوائية، وبهذا تكون طريقة الاقتران التأكسدي المقترحة ذات صلاحية تطبيق جيدة على المستحضر الدوائي.

١- مقارنة الطريقة مع الطرائق الأخرى[١٥،]

تّم مقارنة المتغيرات التحليلية للطريقة الحالية لتقدير الثيامين مع طرائق تقدير طيفية أخرى والجدول (١٧) يبين نتائج تلك المقارنة.

الجدول (١٧) مقارنة الطريقة مع طرائق طيفية اخرى

Analytical parameters	Literature method	Literature method	Present method
Reagent	Silphanilic acid	Sodium phenylhydrazine-4-Salphonate	p-Amino phenol
Medium	Alkaline	Alkaline	Alkaline
Colour	Red	Orange	Orange
λ_{max} (nm)	490	490	441
Temperature	-----	-----	15
Solvent	-----	------	Water
$\varepsilon(L.mol^{-1}.cm^{-1})$	7.74×10^{3}	-----	8.528×10^{3}
Beer's lawµg/ml µrangeµg/mlµ µg/ml µg/ml µg/ml	------	16-1	60-2.4
Sandel Index $\mu g.cm^{-2}$	0.045	-----	0.0390
D.L µg/ml	----	-----	1.007
Average recovery %	------	100.6-99.7%	99.6
RSD,%	-----	0.35	3.21

يتبين من الجدول (١٧) أن الطريقة المقترحة ذات حساسية جيدة نسبة الى الطرائق المثبتة في الجدول

Reference

1. N. H. Shekho , B. A. Abed Al-Hadi , L. A. Sarsam " Indirect Spectrophotometric Determination of Thiamine Hydrochloride in Presence of SulphiteVia Chromium-1,5-Diphenylcarbazide Complex " Rafidain J. sci., 2013, **24** (4), 60-73

2. P. Ortega-Barrales , M. L. Fernández-de Córdova , and A. Molina-Díaz " Micro determination of Vitamin B1 in the Presence of Vitamins B2, B6, and B12 by Solid-Phase UV Spectrophotometry " Anal. Chem, 1998, **70**(2) 271–275

3. K . K. ViswanathS. makrishman . M.V.IndianJ. Pharm. Sci, 1986, **48**(80).

4. R. D Amrutkar., V.D. Rakibe ,A. Prakruti " Simultaneouof Thiamine and Pyridoxine Hydrochloride in Multivitamin Injection by UV Spectrophotometric Method " International J. Research in Pharm. Biomedical Sci. 2013, **4**(4).

5. A. F. Husssin, M. A.AL Daamy and A.b. Alkhalily" Spectrophotometric determination of Thiamine.HCl in pharmaceutical preparations using Prussian blue reaction "J. Kerbala Univ , 2010**8,** (3).

6.K. M. Al-Ahmary "simple spectrophotometric method for determination
Of thiamine In pharmaceuticalEuropean J.Chem., 2014, **5**(1) ,81-84s

7. E. Din, G. Kökdil, F. Onur." A comparison of matrix resolution method, ratio spectra derivative spectrophotometry and HPLC method for the determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical

preparation. " J. Pharm. Biomed Anal, 2000, **22**(6), 915-23.

determination of cyproheptadine hydrochloride, multivitamins, and sorbic acid" J. Pharm. Biomed Anal, 2004,**35**(4) 703-13.

8. L sz łł L i zińsk W Cz n wski P z f High- performance liquid chromate-graphy method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection " J. Chromatography, 2005, **1**(2) 91–98.

11. D.I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, J. López-Hernández, and P. Paseiro-Losada "Simultaneous Determination of Thiamine and Riboflavin
in Edible Marine Seaweeds by HPL C " J. Chromatographic Sci, 2004,**42**.

9. N. Yantih, D. Widowati, T. Aryani" validation of HPLC method for
determination of thiamine hydrochloride, riboflavin, nicotinamide, and pyridoxine hydrochloride in syrup preparation " Canadian J. Sci. Industrial Research , 2011, **2**(7).

12. R. amid, J.Abrboric, O.AûdinaandS, O.Adimirov "RP-HPLC Determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12in multivitamin tablets "J.Serb.Chem.Soc., 2005,**70**(10).

10. A. Gindy, F .Yazby, A Mostafa, M. Maher " HPLC and chemometric methods for the simultaneous

13. C. Anyakora, I. Afolami, T. Ehianeta and F. Onwumere "HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in

Nigeria "African J. Pharm. Pharmacology**,** 2008,**2**(2) 029-036.

14. B.D. Peer; T.B. Bhanu, K. Katikala. P.Murthy. "HPLC Method development for Simultaneous Estimation of Pyridoxine, Thiamine, Paracetamol and Ibuprofen in Tablets" J. Pharm. Research, 2011, **4** (5), 1584

15. J. Rubaj, W. Korol, G. Bielecka, A.K. Kwiatek "determination of thiamine in premixture and compound feed by liquid chromatography method" Bull Vet Inst Pulawy, 2008,**52** ,435-440.