مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 2017 (10) 22
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

تقدير الريبوفلافين والسيانوكوبال أمين طيفيا باستعمال طريقة المساحة تحت المنحني

محمد قاسم السامرائي ، خلف فارس السامرائي
قسم الكيمياء ، كلية التربية ، جامعة سامراء ، سامراء ، العراق

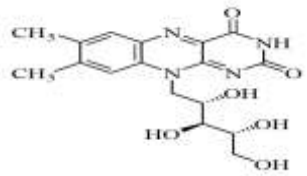
الملخص

تم تقدير عقاري الريبوفلافين (RIBO) والسيانوكوبال امين (CCA) في اشكالها النقية وفي مستحضراتها الصيدلانية بتطوير طريقة طيفية وبسيطة وحساسة واقتصادية ، تستند الطريقة على حساب المساحة تحت المنحني (AUC) في المنطقة المحصورة مابين الطولين الموجيين 526- 400 nm لـ RIBO و 538-562 nm لـ CCA ، أظهرت الطريقة مطاوعة لقانون بير – لامبرت لمدى من التراكيز تراوحت بين $\mu g.ml^{-1}$ 10 - 90 لعقار RIBO و $\mu g.ml^{-1}$ 6-96 لعقار CCA ، أظهرت النتائج الاسترجاعية المئوية Rec% مابين 97.6542-103.5198% ومعامل الإنحراف القياسي النسبي RSD% مابين 0.5871-0.7542% و حد كشف بقيمة $\mu g.ml^{-1}$ 0.2168 وحد كمي بقيمة $\mu g.ml^{-1}$ 0.8560 لعقار RIBO وتراوحت الاسترجاعية المئوية Rec% مابين 99.7835-102.3990% ومعامل الإنحراف القياسي النسبي RSD% مابين 0.4811-0.8238% وحد كشف بقيمة $\mu g.ml^{-1}$ 0.1381 وحد كمي بقيمة $\mu g.ml^{-1}$ 0.4606 لعقار CCA .

الكلمات المفتاحية: المساحة تحت المنحني ، الريبوفلافين ، سيانو كوبال امين .

المقدمة

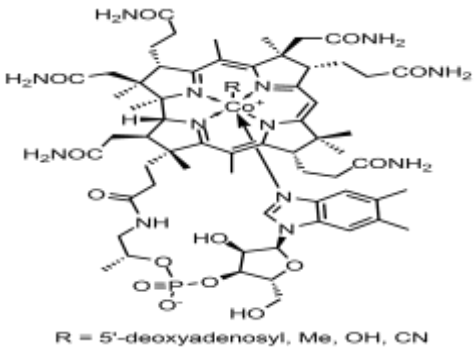
الريبوفلافين (RIBO): اسمه العلمي 7,8-dimethyl-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl) isoalloxazine ويبين الشكل 1 التركيب الكيميائي للمركب [2,1]:



شكل 1 . التركيب لعقار الريبوفلافين

RIBO مهم لنمو الجسم وإنتاج الطاقة وخلايا الدم الحمراء كما يساعد على انتاج الطاقة من الكربوهيدرات وتكوين الأحماض الأمينية والدهنية وإنتاج الجلوتاثيون [3] ويعد المصدر الوحيد للإنزيمات المساعدة فلافين وحيد النوكليوتيد (FMN) و فلافين الأدينين ثنائي النوكليوتيد (FAD) في الانسان ويشارك الفيتامين في ردود الفعل الأساسية للأكسدة والاختزال [4] .

السيانو كوبال امين (CCA) : اسمه العلمي α- (5,6-dimethylbenzimidazolyl) cobamidcyanide ويبين الشكل 2 التركيب الكيميائي للمركب [2,1] :



شكل 2 . التركيب لعقار السيانو كوبال امين

يعد فيتامين مهم لإنضاج كريات الدم الحمراء وله دور في تشكيل الدم إذ يستعمل لتعديل نقص الهيموغلوبين لأنه يدخل في تركيب الخلايا الدموية الحمراء ، ضروري لتصنيع الحامض النووي DNA إذ يستعمل في تكوين ثايميدين ثلاثي الفوسفات وهومن وحدات بناء الـ DNA كما له أهمية للعمل الطبيعي للدماغ والجهاز العصبي ويساهم في تصنيع غلاف الميلالين للألياف العصبية وإضافة الميثيل إلى الهوموسيستين لتحويله الى الميثيونين [7,6,5] .

قدر RIBO في المنتجات التجارية باستعمال طريقة كروماتوكرافيا السائل Liquid chromotography [8] ، كما قدر باستعمال طريقة مربع الموجة Square wave في اقراص الفيتامينات الحاوية على حامض الفوليك وفيتامين (B_2) [9] وكذلك قدر في البلازما باستعمال طريقة (RP-HPTLC) [10] .

اما CCA فتم تقديره في أقراص الأدوية باستعمال طريقة المربعات الصغرى الجزئية Least partical square [11] ، و قدر بطريقة الاستشعار اللوني RNA باستخدام جزيئات الذهب [7] ، كما قدر باستعمال الفلورة Fluresence في حالة الإنبعاث في محلول الفوسفات المنظمة ذو pH = 7.0 [12] .

تهدف هذه الدراسة الى التقدير الطيفي للعقارين بشكليهما النقي باستعمال طريقة المساحة تحت المنحني كون العقارين لم يتم تقديرهما بهذه الطريقة.

الجزء العملي

المواد الكيميائية والأجهزة المستعملة

تم استعمال المواد القياسية للعقارين RIBO و CCA والتي تم الحصول عليها من (الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية – سامراء – العراق) في تحضير المحاليل التي أجريت عليها تجارب البحث المختلفة إضافة الى مادة NaOH المجهزة من شركة Fluka-Switzerland كما تم استعمال جهاز UV- Shimadzu

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

Japan Visible-1650 ثنائي الحزمة في تحليل العقارين وقد أجريت القياسات في نطاق الطول الموجي 190-350 nm باستعمال خلايا من الكوارتز.

المحاليل

محلول RIBO (100 µg.ml^{-1}) RIBO Solution

حضّر بإذابة 0.01 g من مادة RIBO النقية الصلبة في حجم معين من محلول 0.1 N هيدروكسيد الصوديوم ثم أكمل الحجم إلى العلامة في قنينة حجمية سعة 100 ml من المذيب ذاته .

محلول CCA (100 µg.ml^{-1}) CCA Solution

حضّر بإذابة 0.01 g من مادة CCA النقية الصلبة في حجم معين من محلول 0.1 N هيدروكسيد الصوديوم ثم أكمل الحجم إلى العلامة في قنينة حجمية سعة 100 ml من المذيب ذاته.

المحاليل المصنعة لعقاري RIBO و CCA

تم تحضير مستحضرين صيدلانيين يحتوي الأول على (20 µg.ml^{-1}) من الريبوفلافين بينما يحتوي الثاني على (12 µg.ml^{-1}) من السيانو كوبال امين بوجود (النشأ) كسواغ.

محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز تقريبي (0.1 N) Soduim Hydroxide

حضر بإذابة 0.4 g من هيدروكسيد الصوديوم الصلب بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 ml لتحضير التركيز 0.1 N .

اختيار المذيب المناسب Selection of the Solvent

تم اختيار عدد من المذيبات لاستعمالها في إذابة عقاري RIBO و CCA ومن ثم تسجيل طيف الامتصاص، والمذيبات المستعملة هي الماء المقطر والايثانول وكذلك استعمال مزائج وهي الايثانول: الماء المقطر بنسبة حجوم (9:1)، الايثانول: (DMSO) بنسبة حجوم (1:9) ،محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 N.

أطياف الامتصاص

حُضّرت مجموعة من التراكيز 10–90 µg.ml^{-1} من عقار RIBO و 6 – 96 µg.ml^{-1} من عقار CCA كلاً على حدى وتم إجراء مسح الأطوال الموجية لهما ما بين 190 - 800 nm لرسم الطيف الصفري وبناء منحنيات المعايرة .

طريقة عمل وبناء منحنيات المعايرة لعقاري RIBO و CCA Procedure and constructional of calibration curves for RIBO and CCA

عد إذابة 0.002 g من عقار RIBO و 0.0012 g من عقار CCA بشكل منفرد بمحلول 0.1 N هيدروكسيد الصوديوم في قنينة حجمية سعة 100 ml. تم نقل حجوم تتراوح ما بين 1- 9 ml من محلول عقار RIBO ذو التركيز 100µg.ml^{-1} وعقار CCA ذو التركيز 100 µg.ml^{-1} بحجوم تتراوح مابين 6-96 ml إلى سلسلتين من القناني الحجمية سعة 10 ml وخففت جميع المحاليل بعد ذلك بالماء المقطر إلى العلامة ثم سجل طيف الإمتصاص لكل منها لمدى من الأطوال الموجية 190-800nm مقابل محلولها الصوري . يبين جدول 1 خواص تحليل عقاري RIBO و CCA بطريقة المساحة تحت المنحني.

الدقة والتوافق

تم حساب دقة وضبط الطريقة المقترحة عن طريق اجراء خمسة مكررات لكل عملية قياس . وأُ جريت للتراكيز 20 , 40 µg.ml^{-1} لعقار RIBO و 12, 48 µg.ml^{-1} لعقار CCA والتي تقع ضمن تراكيز منحني المعايرة ، استعملت قيمة Rec% للتعبير عن دقة النتائج وقيمة RSD% للتعبير عن توافق النتائج. يبين جدول 2 نتائج دقة وتوافق تقدير عقاري RIBO و CCA بهذه الطريقة.

دراسة تأثير السواغات

تم دراسة تأثير النشأ السواغ الوحيد المضاف إلى العقارين وبتراكيز وصلت إلى عشرة أضعاف من النشأ لمعرفة تأثيره على عملية تقديرهما, يبين الجدول 3 نتائج دراسة تأثير السواغات على العقارين.

تطبيق الطريقة

تم تطبيق الطريقة المقترحة بإجراء خمسة مكررات لكل عملية قياس وأُ جريت لثلاثة تراكيز هي 20 , 40 and 60 µg.ml^{-1} لعقار RIBO و 12 , 36 and 60 µg.ml^{-1} لعقار CCA، إذ أُ ختيرت تراكيز عقاري RIBO و CCA من ضمن تراكيز منحنيات المعايرة , يبين الجدول 4 النتائج التجريبية لتطبيق الطريقة المقترحة.

تحليل عينات دوائية لعقاري RIBO وCCA بطريقة الإضافات القياسية المتعددة Analysis of dosage form of RIBO and CCA via multi standard additions method

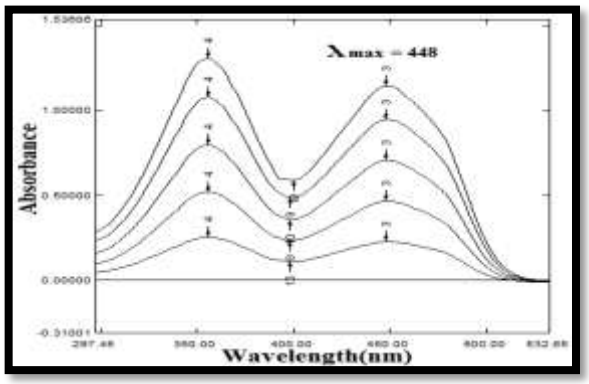
تم استعمال طريقة الإضافات القياسية المتعددة من أجل إختبار إمكانية تقدير العقارين RIBO و CCA كلا على انفراد , إذ تم نقل حجوم ثابتة 1ml من المحلول المصنع لعقار RIBO ذو التركيز 20 µg.ml^{-1} إلى قناني حجمية سعة 10ml ثم تمت إضافة حجوم متزايدة من المحلول القياسي 0-3 ml والذي تركيزه 100 µg.ml^{-1},كما تم نقل حجوم ثابتة 1ml من المحلول المصنع لعقار CCA ذو التركيز 12 µg.ml^{-1} إلى قناني حجمية سعة 10 ml ثم تمت إضافة حجوم متزايدة من المحلول القياسي لنفس العقار 0 - 3 ml والذي تركيزه 100 µg.ml^{-1} , ثم خفف المحلول بالماء المقطر إلى العلامة وبعدها تم تسجيل طيف الإمتصاص لكل محلول لمدى من الأطوال الموجية والتي تراوحت ما بين 190 - 800 nm ثم بعد ذلك تم إعداد منحنيات الإضافات القياسية لكل عقار وذلك برسم قيمة الإمتصاصية مقابل الحجم , يبين جدول 5 نتائج تحليل RIBO و CCA باستعمال المساحة تحت المنحني بطريقة الإضافات القياسية المتعددة.

النتائج والمناقشة

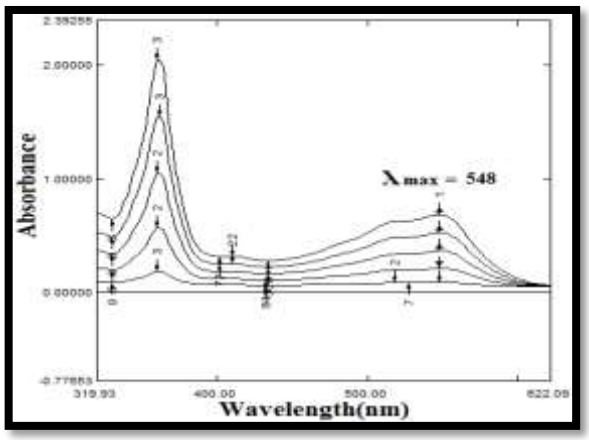
أطياف الإمتصاص

تم تحضير محاليل كل من عقاري RIBO و CCA بالتراكيز 1- 100 µg.ml^{-1} ، ثم اجري مسح للأطوال الموجية مقابل المحلول الصوري لكل منهما لرسم الطيف الصفري وتحديد الطول الموجي الأعظم للعقارين حيث أعطى عقار RIBO أعلى إمتصاص عند الطول

الموجي 448 nm كما في الشكل 3 في حين أعطى عقار CCA أعلى إمتصاص عند الطول الموجي 548 nm كما في الشكل 4 .



شكل 3 . الطيف الصفري لعقار RIBO للتراكيز 10 - 90 µg.ml^{-1}

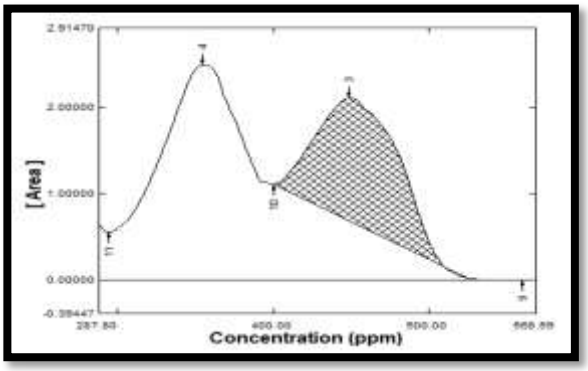


شكل 4 . الطيف الصفري لعقار CCA للتراكيز 6 - 96 µg.ml^{-1}

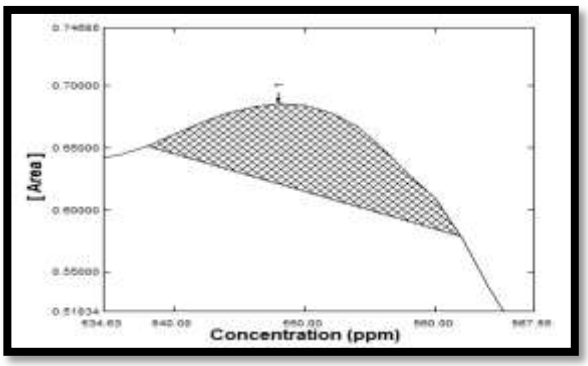
بناء منحنيات المعايرة لعقاري RIBO و CCA

Constructional of calibration curves for RIBO and CCA

تم تقدير عقاري RIBO و CCA باستعمال طريقة المساحة تحت المنحني حيث أظهرت الأطياف المسجلة لهما إن بإمكان هذه التقنية تقدير العقارين بنجاح والحصول على نتائج ذات دقة عالية ، إعتماداً على طيف إمتصاص كل من عقاري RIBO و CCA تم بناء منحنيات المعايرة وذلك بحساب المساحة تحت المنحني للمنطقة المحصورة بين 400-526nm لعقار RIBO و 538-562nm لعقار CCA المبينة في الشكلين 5 و6 ورسمت هذه القيم مقابل التركيز والتي أظهرت مطاوعتها لقانون بير–لامبرت لمدى من التراكيز تراوحت بين 10-90 µg.ml^{-1} لعقار RIBO و 6 - 96 µg.ml^{-1} لعقار CCA , يبين الشكلين 7 و8 منحنيات المعايرة لعقاري RIBO و CCA على التوالي.



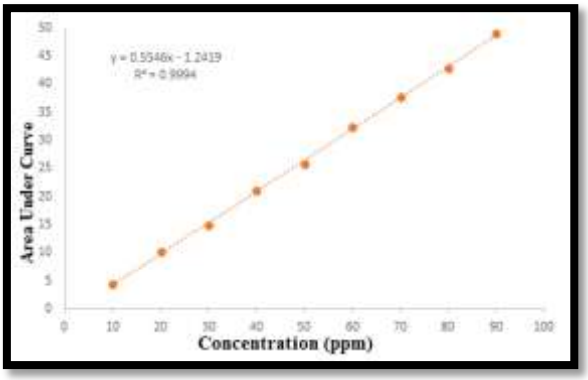
شكل 5 . المساحة تحت المنحني لعقار RIBO للتراكيز 10 - 90 µg.ml^{-1}



شكل 6 . المساحة تحت المنحني لعقار CCA للتراكيز 6 - 96 µg.ml^{-1}

جدول 1. التراكيز مقابل المساحة تحت المنحني لعقار RIBO

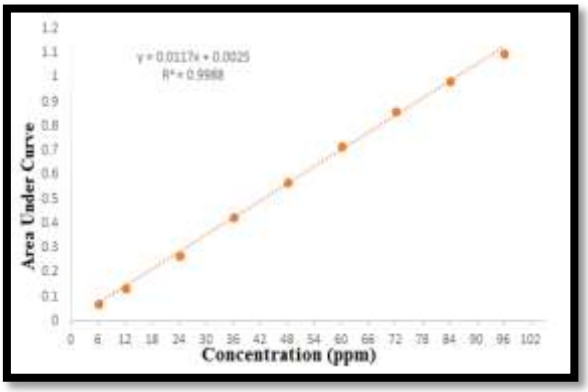
RIBOFLAVIN			
Area under curve	Concentration	Regression equation	R^2
4.4165	10	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
10.1958	20	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
14.9697	30	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
21.1110	40	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
25.7951	50	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
32.4145	60	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
37.7158	70	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
42.8581	80	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994
48.9082	90	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994



شكل 7. منحني معايرة RIBO للتراكيز $\mu g.ml^{-1}$ 10 - 90 مقابل المساحة تحت المنحني

جدول 2. التراكيز مقابل المساحة تحت المنحني لعقار CCA

Cyanocobalamine			
Area under curve	Concentration	Regression equation	R^2
4.07274	6	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.1374	12	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.2695	24	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.4258	36	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.5679	48	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.7149	60	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.8617	72	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
0.9851	84	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988
1.0994	96	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988



شكل 8. منحني معايرة CCA للتراكيز $\mu g.ml^{-1}$ 6 - 96 مقابل المساحة تحت المنحني

جدول 3. خواص تحليل عقاري RIBO و CCA بطريقة المساحة تحت المنحني

Samples	λ(nm)	Regression equation	R^2	Slope	L.O.D $\mu g.ml^{-1}$	L.O.Q $\mu g.ml^{-1}$
RIBO	448	y = 0.5546x - 1.2419	0.9994	0.5546	7.5995	25.3319
CCA	548	y = 0.0117x + 0.0025	0.9988	0.0117	0.1381	0.4606

دقة وتوافق الطريقة

تم حساب دقة وتوافق الطريقة لعقار RIBO وعقار CCAعن طريق اجراء خمسة تكرارات لكل عملية قياس للتركيزين 20, 40 $\mu g.ml^{-1}$ لعقار RIBO و 12, 48 $\mu g.ml^{-1}$ لعقار CCA وقد بينت النتائج إن الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين كما مبين في جدول 2.

جدول 4 . نتائج دقة وتوافق عقاري RIBO و CCA باستعمال طريقة المساحة تحت المنحني

Excipients	Concentration ($\mu g.mL^{-1}$)		Rec%	RSD%
	Taken	Found		
RIBO	20.0000	20.2436	101.2180	0.1880
	40.0000	40.3046	100.7615	0.5790
CCA	12.0000	11.6649	97.2075	0.3062
	48.0000	47.5017	98.9618	0.6601

دراسة تأثير السواغات

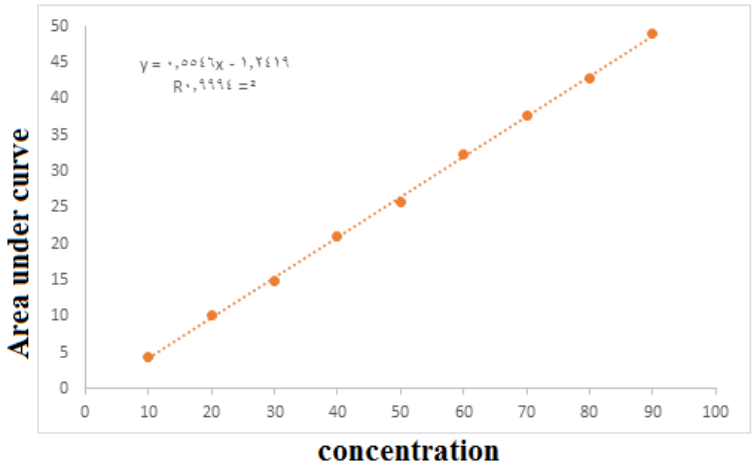
تم تقدير عقاري RIBO و CCA بوجود السواغ الوحيد الموجود في مستحضرها الصيدلاني وهو النشأ ، لوحظ من نتائج التحليل إنَّ وجوده ليس له تأثير على تقدير العقارين حتى عند وجوده بتراكيز تصل إلى عشرة أضعاف على عملية تقدير RIBO 20 $\mu g.ml^{-1}$ و CCA 12 $\mu g.ml^{-1}$ والجدول 3 يبين النتائج التي تم الحصول عليها.

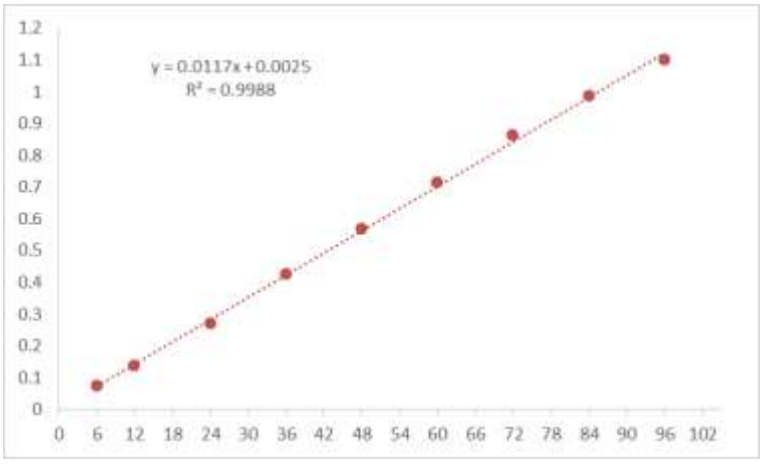
جدول 5 . تأثير وجود عشرة أضعاف سواغ النشأ على عملية تقدير 20 $\mu g.ml^{-1}$ لعقار RIBO و 12 $\mu g.ml^{-1}$ لعقار CCA

Excipients	drug	Concentration ($\mu g.mL^{-1}$)		Rec%	RSD %
		Taken	Found		
STARCH	RIBO	20.0000	20.0221	100.1105	0.9750
	CCA	12.0000	12.2649	102.2075	0.3261

تطبيق طريقة المساحة تحت المنحني لتقدير عقاري RIBO و CCA
Area under curve method application for determination of RIBO and CCA

من ضمن منحنيات معايرة عقاري RIBO و CCA أُ ختيرت ثلاث تراكيز يتم من خلالها تطبيق الطريقة المقترحة عن طريق إجراء خمسة تكرارات لكل عملية قياس من كل تركيز، والتراكيز هي 20 ,40 and 60 $\mu g.ml^{-1}$ لعقار RIBO و 12 , 36 and 60 $\mu g.ml^{-1}$ لعقار CCA وقد تبين من خلال النتائج إن الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين إذ تراوحت قيمة Rec% مابين 96.1722-102.2745% وقيمة RSD% مابين 0.4903-1.0075% لعقار RIBO في حين تراوحت قيمة Rec% ما بين 98.9315-103.4519% وقيمة RSD% ما بين 0.4228-0.8179% لعقار CCA كما في الجدول 4 .





جدول 5 . النتائج التجريبية لتطبيق الطريقة المقترحة باستعمال المساحة تحت المنحني

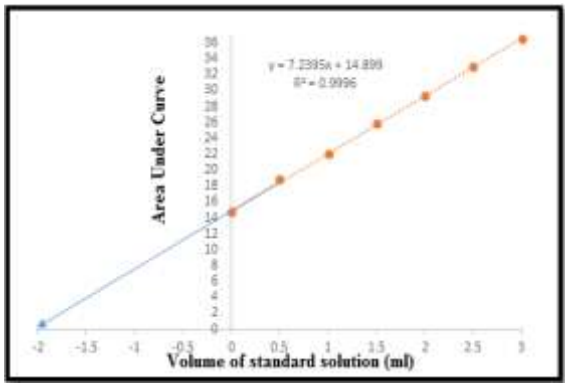
Samples	Concentration ($\mu g.mL^{-1}$)		Rec%	RSD%
	Taken	Found		
RIBO	20.0000	20.4549	102.2745	0.4903
	40.0000	38.4689	96.1722	1.0075
	60.0000	58.5813	97.6355	0.5622
CCA	12.0000	12.0940	100.7833	0.8179
	36.0000	37.2427	103.4519	0.4228
	60.0000	59.3589	98.9315	0.7417

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

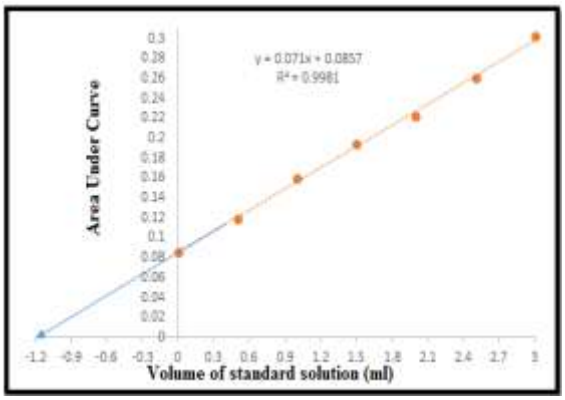
تحليل عينات دوائية لعقاري RIBO و CCA بطريقة الإضافات القياسية المتعددة

Analysis of dosage form of RIBO and CCA via multi standard additions method

تم تقدير عقاري RIBO و CCA في مستحضرهما الصيدلاني التحضيري باستعمال طريقة الإضافات القياسية المتعددة حيث أظهرت النتائج كفاءة ونجاح الطريقة المتبعة ، إذ كانت Rec% بقيمة 102.9000% و RSD% بقيمة 0.4810% لعقار RIBO في حين كانت Rec% بقيمة 100.5833% و RSD% بقيمة 0.0454% لعقار CCA كما في الجدول 5 .



شكل 11. منحني الإضافات القياسية لعقار الريبوفلافين للتراكيز (10 - 90 µg.ml^{-1})



شكل 12 . منحني الإضافات القياسية لعقار السيانوكوبال امين للتراكيز (6 - 96 µg.ml^{-1})

جدول 6 . نتائج تحليل RIBO و CCA باستعمال المساحة تحت المنحني بطريقة الإضافات القياسية المتعددة

Samples	Drug Concentration (µg.mL^{-1})		Rec%	RSD%
	Taken	Found		
RIBO	2.0000	2.0580	102.9000	0.4810
CCA	1.2000	1.2070	100.5833	0.0454

الاستنتاجات

أظهرت النتائج إمكانية تطبيق طريقة المساحة تحت المنحني بنجاح لتقديرعقاري RIBO و CCA من خلال نتائج حساب المساحة تحت المنحني للمنطقة المحصورة بين 400-526 nm لعقار RIBO و 538-562 nm لعقار CCA وقد إمتازت الطريقة بحساسية عالية للتراكيز القليلة كما إنها ذات دقة وتوافق عاليين.

المصادر

1- The United States Pharmacopeia (USP) 35 .Vol:1. (2012); pp 1067-8.
2- 228 - British Pharmacopeia, Appendix IIIA. Vol: 3. (2012); 110A.
3- S. Sareen Gropper and L. Jack Smith; Advanced Nutrition And Human Metabolism. Book. (2012); pp 320 - 360.
4- Brian J. Petteys and Elizabeth L. Frank; Rapid Determination of Vitamin B_2 (riboflavin) in Plasma By HPLC. Clinica Chimica Acta, Vol: 412. (2011); pp 38 - 43 .
5- Cyanocobalamine (Cyanocobalamine 50 Microgram Tablets) Side Effects. NHS Choices. Archived From The Original on (2015) .
6- Cyanocobalamine Injection. Medline Plus. Archived From The Original on (2015) .
7- L.S. Selvakamur, M.S. Thaku; Nano RNA Aptamer Wrie For Analysis of Vitamin B12. Analytical Biochemistry. Vol : 427. (2012) ; pp 151-157 .
8- CAO Sheng-lin , Chen Yu , Qamar Subhani , Zhu Yan and Lü Wei-de; Determination of Riboflavin in Vitamin Tablets By Ion Chromatography With Post-Column Photochemical Derivatization and Fluorescence Detection . (2013) .
9- Semiha Cakir , Iclal Atayman and Osman Caklr ; Simultaneous Square-wave Voltammetric Determination of Riboflavin and Folic Acid in Pharmaceutical Preparations. Micro chimica Acta. Vol: 126. (1997); pp 237 - 240 .
10-Brian J. Petteysa and Elizabeth L. Frank; Rapid Determination of Vitamin B2 (Riboflavin) in Plasma By HPLC . Clinica Chimica Acta. Vol: 412 (1-2). (2011); pp 38 – 43 .
11- L. Sratthaphut and N. Ruangwises; Genetic Algorithms - Based Approach For Wavelength Selection in Spectrophotometric Determination of Vitamin B12 in Pharmaceutical Tablets By Partial Least-Squares . Procedia Engineering 32. (2012) ; pp 225 - 231 .
12-Hua-Bin Li and Feng Chen.; Determination of Vitamin B12 in Pharmaceutical Preparations By a Highly Sensitive Fluorimetric Method. Fresenius Journal Anal Chem. Vol : 368. (2000); pp 836 - 838.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 2017 (10) 22

Determination of Riboflavin and Cyanocobalamine Spectrophotometricaly via Area Under Curve Method

Mohammed Qasim Al-Samarrai , Khlaf F Al-Samarrai
Chemistry department. College of Education. Samarra University , Samarra , Iraq
alfarisalsamarai2013@ gmail.com

Abstract
A simple, sensitive, accurate and economical spectrophotometric method for determination of Riboflavin (RIBO) and Cyanocobalamin (CCA) in pure and pharmaceutical forms was developed .The method based on the area under curve (AUC) in the region between 400-526 nm for RIBO and 538-562nm for CCA. The method obey Beers law in the concentration range between 10- 90 µg.ml^{-1} of RIBO and 6- 96 µg.ml^{-1} of CCA. The Rec% range was between 97.6542-103.5198 % and RSD% 0.5871-0.7542 % , LOD 0.2168 µg.ml^{-1} , LOQ 0.8560 µg.ml^{-1} of RIBO . The Rec% range was between 99.7835-102.3990 % and RSD% 0.4811-0.8238 % and LOD 0.1381 µg.ml^{-1} , LOQ 0.4606 µg.ml^{-1} of CCA .

Kywords: area under curve , Riboflavin , Cyanocobalamine .