الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية

فصل ومقايسة مزائج مكونة من عدة فيتامينات باستخدام طرائق تحليلية متنوعة طيفية اشتقاقية كروماتوغرافية

Separation and assay mixtures of vitamins using some analytical methods derivative spectrophotometric- chromatographic

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في مراقبة الأدوية

إعداد:

زياد طارق الهجر الحمد

إشراف

أ.د. أحمد حسن

مشاركة

أ.م.د. جهاد حربالي

2014م – 1435 هـ

تاريخ بدء العمل بالبحث:	23/2/2012
تاريخ انتهاء العمل بالبحث:	1/3/2014

الأماكن التي أجري فيها البحث :

- كلية الصيدلة – جامعة دمشق.
- كلية العلوم – جامعة الفرات.
- مخابر الرقابة الدوائية التابعة لوزارة الصحة.
- مديرية رقابة الدواء البيطري التابعة لوزارة الزراعة.

تاريخ مناقشة الرسالة : 31/ 8/ 2014

أسماء أعضاء لجنة الحكم :

برئاسة: أ.د محمد عمار الخياط ..... (عضواً)

الفاحص الأول: أ.د جمعة الزهوري .....(عضواً)

الفاحص الثاني: أ.د أحمد حسن .....(عضواً مشرفاً)

كلمة شكر

- أبدأ بشكر الله عز وجل الذي منّ علي ووفقني لإنجاز هذا العمل
- أتوجه باسمي وباسم كل أسرة كلية الصيدلة بجامعة دمشق بأحر التهاني للسيد الأستاذ الدكتور محمد عامر المارديني بتوليه مهامه الجديدة وزيراً للتعليم العالي راجين من الله عز وجل لسورية التقدم والتطور العلمي في ظل معاليه.
- أتقدم بفائق الاحترام والتقدير والامتنان وجزيل الشكر للأستاذ الدكتور أحمد حسن لتفضله بالإشراف على رسالة الماجستير ولما قدمه من دعم وتوجيهات ونصائح قيمة ومنحني من علمه ووقته الكثير وإن الكلمات لتقف عاجزةً عن إيفائه حقه من الشكر.
- شكري وخالص امتناني للدكتور جهاد حربالي لتفضله بالمشاركة في الإشراف على البحث وعلى تقديمه كافة الخدمات له مني كل التقدير والاحترام .
- كل الشكر والتقدير والاحترام للأستاذ الدكتور جمعة الزهوري عميد كلية الصيدلة بجامعة دمشق لتفضله بالمشاركة في لجنة الحكم وتقويم البحث وإغنائه بملاحظاته وتوجيهاته القيمة.
- كما أتوجه بخالص الشكر والامتنان للأستاذ الدكتور محمد عمار الخياط لتفضله بالمشاركة في لجنة الحكم وتقويم البحث وإغنائه بملاحظاته وتوجيهاته القيمة له مني كل التقدير والاحترام.
- أتوجه بالشكر وخالص الامتنان والتقدير والاحترام لأسرة كلية الصيدلة بكادرها التعليمي والإداري ممثلةً بعميدها الأستاذ الدكتور جمعة الزهوري ونائبيه للشؤون العلمية الأستاذة الدكتورة سحر الفاهوم والشؤون الإدارية الدكتورة جمانة الصالح.

- أخص بالشكر رئاسة قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية ممثلةً بالأستاذ الدكتور أحمد حسن والكادر التدريسي في القسم السيد الأستاذ الدكتور محمد عامر المارديني وزير التعليم العالي والأستاذ الدكتور محمد عمار الخياط والأستاذ الدكتور سامر حيدر والأستاذ الدكتور جهاد حربالي والدكتور إياد اللوص على كل ما يقدموه من دعم للارتقاء بالقسم بشكل خاص وبكلية الصيدلة بشكل عام.

- كما أتوجه بالشكر لكافة أعضاء القسم من هيئة تدريسية وموظفين ومخبريين لهم مني خاص التقدير والاحترام.

- كل الشكر للأستاذ الدكتور أمير صكر عميد كلية الصيدلة في حلب لكل ما قدمه من عون وفائدة علمية في بداية العمل في البحث له مني خالص التقدير والاحترام.

- أتقدم بفائق الشكر والاحترام والامتنان لمخابر الرقابة الدوائية في وزارة الصحة للتسهيلات الكبيرة المقدمة لإنجاح هذا العمل وإتمامه ممثلةً بالدكتور حبيب عبود مدير مخابر الرقابة الدوائية وأخص بالذكر الآنسة دانيا التفة لكل ما قدمته لي من عون أثناء القيام بالعمل لها مني خالص التقدير والامتنان والاحترام.

- أتوجه بالشكر إلى مديرية الدواء البيطري في وزارة الزراعة ممثلةً بالدكتور محمد حبو على كل ما قدموه لي من عونٍ وتسهيلات لإنجاح العمل وأخص بالذكر الدكتور عبد الكريم حلاق والدكتور أحمد الحمصي والسيد طارق الرسلي.

- سطور كثيرة تمر في الخيال فيحتار القلم قبل أن يخط أي كلمة في حقهم وتتبعثر حروف اللسان تجاه وصفهم لأترك قلبي هو الذي يهديهم كلمة شكراً لكم أصدقائي في قسم المراقبة الدوائية والكيمياء الصيدلية وأخص

بالذكر ماسة عثمان – أخي وصديقي العزيز بشير الداوودي –ريم يوسف – باسمة عروس –همسة قاسو –سليمان قريط –هدى مندو –ماهر درويش – سمية الحاج يونس –باسل نحاس وكل الزملاء الآخرين.

- تعجز الكلمات عن وصف ما أحمله تجاهكم فقد قضيت معكم أجمل أيام عمري التي ستبقى ذكرى جميلة في حياتي أعود إليها كل يوم لأنكم أخوتي وأحبتي وأعز أصدقائي سارية الصفدي –عبد الخالق اليافي – معن الشافعي – وائل مسلماني –محمود جوار –محمد القسيم –حسام حاج حمدو – بلال العمار – محمد القاضي – تمكين حسن – علاء رجو.

- كل الشكر والتقدير والاحترام لمن حضر اليوم معي ليشاركني فرحتي من أحبتي وإخوتي أسأل الله لكم التوفيق دائماً في حياتكم.

الإهداء

إلى التي فاق عطرها في حياتي كل الزهور

إلى الشمعة التي أشعت أمامي كل نور

تلك التي حنان صدرها أحن من كل الصدور

وعطر كفيها أزكى من كل العطور

هي وسط قلبي البهجة والسرور

أول من علمني الكتابة على السطور

سامحيني فمهما كتبت فيك لن أوفيك حقك يا حبيبتي في كل الدهور

حبيبتي ومعلمتي الأولى أمي...

يا زهرة الحب المسافر

في قلوب الوالهين

يا نسمة الفجر الضحوك

على جباه المخلصين

يا دوحة الحب الذي لا ينتهي

ما أجمل الأحلام تحياها بظلك يا أبي عبر السنين

وأنت تسقينا الحنين

وأنت تعطينا الدروس نذلل الصعب المعين

والدي العزيز المهندس طارق الهجر

إلى شقائق النعمان في أرض الفرات

إلى ورود الفل تداعبها النسمات

ليفوح منها عبق الحب وأجمل اللحظات في الحياة

أحبكم حبا فوق المتصور في العادات

معكم قضيت أجمل اللحظات

ولكم أرفع أكفي بالدعوات

أسأل الله أن يديم في وجوهكم الضحكات

وأن أراكم في أفضل المستويات

فأنتم عزوتي وعزي في كل الأوقات

أخوتي وأخواتي محمد – أحمد – عبدالله – ريم – سارة – شهد

عندما أردت أن أكتب لك هذه الكلمات

وقفت القلم عن الكتابة وتاهت العبارات

ليصمت عقلي عن الكلام ويقول قلبي بالنبضات :

إليك يا من تحملتني كل هذه الفترات

إليك يا من كنت سندي في كل المعضلات

لكم تمنيت اليوم أن تشاركيني فرحتي وهذه اللحظات

إليك يا عشقي في كل الأوقات

إليك سيدة قلبي حبيبتي زوجتي

إلى أحب ما أعطاني الله إلى قلبي في الوجود

إلى التي إليها أحن

ومن الشوق إليها صوتي يئن

إلى مؤنستي في دراستي

ومشاركتي في رسالتي

إلى أكبر فرحة في حياتي

تمنيت اليوم أن تكون معي لتشاركني بضحكتها فرحتي

حبيبتي مدللتي ابنتي سارة

إلى من قال فيها سيد الأنبياء (خيرة الله في أرضه)

عشقي الأزلي والأبدي

قضيت في ربوعها أجمل أيام عمري

مع أهلي وأصدقائي وأحبتي

وفي جامعتها مع زملائي وأساتذتي

أسأل الله لك فرجاً قريباً ونصراً عاجلاً مؤزراً

إليك يا شام العزة

لمحة عن حياة الباحث:

ولدت في مدينة دير الزور 15/ 7/ 1984، حصلت على الشهادة الثانوية عام 2002 بدرجة قدرها 225/ 240، تخرجت من كلية الصيدلة بجامعة تشرين عام 2007 بمعدل قدره 75.045، قبلت في ماجستير مراقبة الأدوية للعام 2008-2009

تصريح:

الاسم الكامل: زياد طارق الهجر الحمد

مكان وتاريخ الولادة: دير الزور – 1984

عنوان البحث باللغة العربية:

فصل ومقايسة مزائج مكونة من عدة فيتامينات باستخدام طرائق تحليلية متنوعة طيفية اشتقاقية – كروماتوغرافية

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل علمي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر .

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها .

أتعهد بأنني لم أقل إلا الحقيقة ولم أخف شيئا تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه أوقع

زياد طارق الهجر الحمد

قائمة المحتويات

المحتوى	رقم الصفحة
قائمة المحتويات	1
مقدمة عامة	8
الباب الأول: الدراسة النظرية	9
الفصل الأول: الفيتامينات	10
1-1- تعريفها	11
1-2- تصنيفها	11
1-3- دورها الأساسي الحيوي	11
1-4- الخصائص العامة للفيتامينات	11
1-5- عوز الفيتامينات	12
1-5-1- أولي	12
1-5-2- ثانوي	12
1-6 - أقسام الفيتامينات	12
1-6-1- الفيتامينات الذوابة بالماء	12
1-6-2- الفيتامينات الذوابة بالدسم	12
1-6-2-1- ميزات الفيتامينات الذوابة بالدسم	13
1-2- فيتامين B1	14
1-1-2- لمحة تاريخية	14
2-1-2- الصيغة والتسمية لفيتامين B1	14
1-2-1-2- التسمية الشائعة	14
2-2-1-2- الصيغة الجزيئية	14
2-2-1-2- الوزن الجزيئي	14
2-2-1-2- الصيغة المفصلة لثيامين	14
3-1-2- الخواص الفيزيائية	15
1-3-1-2- المظهر	15
2-3-1-2- الذوبانية	15
3-3-1-2- pH و pK_a محلول فيتامين B1	15
4-3-1-2- قمة الامتصاص الأعظمي لفيتامين B1	16
4-1-2- الحرائك الدوائية لفيتامين B1	16
1-4-1-2- الامتصاص	16
2-4-1-2- عمر النصف	16
3-4-1-2- الاستقلاب	16- 17
4-4-1-2- الإطراح	17
5-1-2- وظائف ثيامين بيروفوسفات الحيوية	17-19
6-1-2- مصادره	19
7-1-2- الأمراض الناجمة عن عوز فيتامين B1	19
1-7-1-2- البري - بري عند الأطفال	19-20
2-7-1-2- البري – بري الرطب عند الأطفال والبالغين	20
3-7-1-2- البري - بري الوبيل	20
4-7-1-2- البري – بري الجاف	20

2-1-7-5- متلازمة كورساكوف – فرنكيه	20
2-1-7-6- الزهايمر (Alzheimer)	21-21
2-1-7-7- من الأخطار الأخرى	21
2-1-8- الأعراض المبكرة لعوزفيتامين B1	21
2-1-9- الجرعة الدوائية والسمية لفيتامين B1	22-21
2-1-10- الحاجة اليومية DRI	22
2-2- فيتامين B6 (بيريدوكسين)	22
2-2-1- لمحة تاريخية	22
2-2-2- الصيغة والتسمية لفيتامين B6	22
2-2-2-1- التسمية الشائعة	22
2-2-2-2- التسمية الكيميائية	23
2-2-2-3 -الصيغة الجزيئية	23
2-2-2-4- الوزن الجزيئي	23
2-2-2-5- الصيغة المفصلة	23
2-2-3- الخواص الفيزيائية لبيريدوكسين	24
2-2-3-1- المظهر	24
2-2-3-2- الذوبانية	24
2-2-3-3- درجة الانصهار	24
2-2-3-4- pH و pK_a	24
2-2-3-5- طيف الامتصاص لبيريدوكسين	24
2-2-4- حرائك فيتامين B6 الدوائية	25
2-2-4-1- الامتصاص	25
2-2-4-1-1- العوامل المؤثرة في امتصاص فيتامين B6	25
2-2-4-2- الاستقلاب	26-25
2-2-5- الوظائف الحيوية لفيتامين B6	27 - 26
2-2-6- مصادره	27
2-2-7- المظاهر السريرية لعوز فيتامين B6	27
2-2-7-1- عند الأطفال والرضع	28
2-2-7-2 عند النساء	28
2-2-7-3- زمر دوائية تسبب عوز فيتامين B6	28
2-2-8- الجرعة العلاجية لفيتامين B6	28
2-2-9- الحاجة اليومية منه DRI	29
2-3- فيتامين B12	29
2-3-1- الصيغة والتسمية	29
2-3-1-1- التسمية الشائعة	29
2-3-1-2- الصيغة المجملة	29
2-3-1-3- الصيغة المفصلة	29
2-3-2- الخواص الفيزيائية	30
2-3-3- الحرائك الدوائية لفيتامين B12	30
2-3-3-1- امتصاصه	30
2-3-3-1-1- العوامل المؤثرة على الامتصاص لفيتامين B12	31

2-3-3-2- النقل البلازمي لفيتامين B12	32-31
2-3-4- الوظائف الحيوية لفيتامين B12	32
2-3-5- المصادر التغذوية لفيتامين B12	32
2-3-6- عوز فيتامين B12	33
2-3-7- الحاجة اليومية منه DRI	33
2-4- فيتامين A	34
2-4-1- لمحة تاريخية	34
2-4-2- الزمرة	34
2-4-3- الصيغة والتسمية لفيتامين A	35
2-4-4- الخواص الفيزيائية	36
2-4-5- الحرائك الدوائية لفيتامين A	36
2-4-5-1- النقل والاستقلاب	37-36
2-4-5-2- التوافر الحيوي لفيتامين A	37
2-4-5-3- الامتصاص	37
2-4-5-3-1- العوامل المؤثرة على امتصاص فيتامين A	37
2-4-5-4- التخزين	37
2-4-5-5- الإطراح	38
2-4-6- آلية تشكل فيتامين A في الجسم	38
2-4-7- الوظائف الحيوية لفيتامين A	39-38
2-4-7-1- له دور في عملية الإبصار	39 – 38
2-4-8- عوزه	39
2-4-9- الحاجة اليومية من فيتامين A (DRI)	39
2-4-10- المصادر الغذائية لفيتامين A	40-39
2-5- فيتامين E	40
2-5-1- لمحة تاريخية	40
2-5-2- التسمية والصيغة	41-40
2-5-3- الخواص الفيزيائية	41
2-5-4- الحرائك الدوائية لفيتامينE	41
2-5-4-1- الامتصاص	41
2-5-4-2- الاستقلاب	42-41
2-5-4-3- الإطراح	42
2-5-4-4- النقل	42
2-5-5- الوظائف الحيوية لفيتامين E	42
2-5-6- فعالية الجرعات الفارماكولوجية	43-42
2-5-7- العوز	43
2-5-8- مصادر فيتامين E الطعامية	43
2-5-9- الحاجة اليومية منه DRI	43
الفصل الثاني: التحليل الطيفي الضوئي الاشتقاقي	44
1- مقدمة عن التحليل الطيفي	46 – 45
1-1- آلية التحليل الطيفي	46
1-1-1- الجزيئات المحرضة بالفوتونات	46
1-1-2- تفسير آلية التحليل الطيفي	47

2-1- الطرق القديمة في تفسير الطيف المعقد	47
1-2-1- الطرق الضوئية (البصرية)	47
3-1- الطرق الحديثة أو الحاسوبية	48
1-3-1- التحليل متعدد المكونات الرقمي	48
2-3-1- تحليل فورير	48
2- الاشتقاق (Derivative)	49
1-2- لمحة تاريخية عن التحليل الطيفي الاشتقاقي	49
2-2- الاشتقاق والطيف الاشتقاقي	52 - 49
3-2- معالم الطيف الضوئي المحلل	53 - 52
4-2- التحليل الطيفي الاشتقاقي	54-53
1-4-2- ميزات الطريقة الطيفية الاشتقاقية في التحليل	54
2-4-2- مجالات تطبيق الطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية	55-54
3-4-2- مساوئ طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	55
4-4-2- أنواع العصابات التحليلية الطيفية المدروسة	57 – 55
5-4-2- اشتقاق العصابات التحليلية المدروسة	58-57
6-4-2- اعتبارات تحليلية للطيف المشتق	59 - 58
5-2- القيمة الحقيقية للحد الأعظمي لامتصاص العصابة الطيفية	60
6-2- تداخل الإشارات	61 - 60
7-2- الطيف الحقيقي والضجيج	62 - 61
1-7-2- كيفية التخلص من الضجيج	62
8-2- تقييم الطيف الاشتقاقي	62
1-8-2- الطرق الشائعة	62
1-1-8-2 طريقة PEAK – PEAK	63 - 62
2-1-8-2- طريقة PEAK – TANGENT	63
3-1-8-2- طريقة PEAK – ZERO	64
4-1-8-2- طريقة PEAK – PEAK RATIO	64
2-8-2- طرق خاصة من أجل دراسة الطيف الاشتقاقي	64
1-2-8-2- طريقة HALF WAVE GRAPHICAL ILLUSTRATION	65 - 64
2-2-8-2- طريقة EXTENDED PEAK – PEAK RATIO	65
3-2-8-2- طريقة SIDE PEAK – SIDE RATIO	66
3-8-2- الطرق الحاسوبية لتقييم الطيف الاشتقاقي	66
1-3-8-2- طريقة الطرح والإضافة	67 - 66
2-3-8-2- طريقة القسمة	68 - 67
9-2- تقييم وحساب مساحة القمة	68
الفصل الثالث: مصدوقية الطريقة التحليلية	69
1- مصدوقية الطريقة التحليلية	70
1-1- تعريف المصدوقية	70
2-1- الدلائل الإرشادية للمصدوقية	70
3-1- أنماط الإجراءات التحليلية التي يجرى لها اختبارات المصدوقية	70
4-1- المتثابتات التحليلية للمصدوقية	71 – 70
1-4-1- المضبوطية (Accuracy)	71

1-4-2- الدقة (precision)	71
1-4-3- التناتج (Reproducibility)	71
1-4-4- الدقة الوسطى	71
1-4-5- التكرارية	71
1-4-6- النوعية	71
1-4-7- حد الكشف	71
1-4-8- حد القياس الكمي	71
1-4-9- الخطية	72
1-4-10- المتانة	72
الفصل الرابع: الدراسات السابقة	73
1- الدراسات السابقة الطيفية الاشتقاقية	74
2- الدراسات السابقة باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز	76 - 74
الباب الثاني:هدف البحث	78 - 77
الباب الثالث: الدراسة العملية	79
الفصل الأول: المواد والطرق	80
1- فصل ومقايسة مزائج عدة فيتامينات باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز	81
1- المواد الكيميائية والكواشف	81
2- المعياريات والعينات	81
3- الأجهزة والأدوات المستخدمة	82
4- تحضير المحاليل	83
4 -1- الطور المتحرك لفيتامينات A وE	83
4-2- الطور المتحرك للفيتامينات B1,B6,B12	83
4-3- تحضير المحلول المعياري الأم لمزيج الفيتامينات AوE	83
4-3-1- تحضير محلول العمل المعياري من المحلول المعياري الأم لمزيج فيتاميني A و E	84
4-4- تحضير المحلول المعياري الأم لفيتامينات B1,B6,B12	84
4-5- تحضير محاليل العينات	85
4-5-1- تحضير محلول العينة المحتوية على فيتاميني A و E	85
4-5-1-1- تحضير العمل من محلول العينة الأم	85
4-5-2- تحضير محلول العينة المحتوية على فيتامينات B1,B6,B12	85
4-6- تحضير محاليل الخطية	86
4-6-1- تحضير محاليل الخطية لمزيج فيتاميني A و E	86
4-6-2- تحضير محاليل الخطية لفيتامينات: B1 , B6 , B12	88 – 86
4-7- تحضير محاليل المضبوطية	88
4-7-1- محاليل المضبوطية لمزيج فيتاميني A,E	89 - 88
4-7-2- تحضير محاليل المضبوطية لفيتامينات B1,B6,B12	91 – 90
4-8- تحضير محاليل الدقة	91
4-8-1- الدقة التكرارية	91
4-8-1-1- الدقة التكرارية لفيتاميني A وE	91
4-8-1-2- تحضير محاليل الدقة التكرارية لفيتامينات B1,B6,B12	91
4-8-2- تحضير محاليل الدقة الوسطى	92

4-8-2-1- تحضير محاليل الدقة الوسطى لفيتاميني AوE	92
4-8-2-2- تحضير محاليل الدقة الوسطى لفيتامينات B1,B6,B12	93 - 92
4-9- تحضير محاليل النوعية	93
4-9-1- تحضير محاليل النوعية لفيتاميني AوE	94 – 93
4-9-2- تحضير محاليل النوعية لفيتامينات B1,B6,B12	94
4-10- محاليل المتانة	94
4-10-1- تحضير محاليل المتانة لفيتاميني AوE	94
4-10-2- تحضير محاليل المتانة لفيتامينات B1,B6,B1	94
2- فصل المزائج السابقة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	95
1- المواد الكيميائية والكواشف	95
2- المعياريات والعينات	95
3- الأجهزة والأدوات المستخدمة	95
4- تحضير المحاليل	95
4-1- تحضير محلول حمض كلور الماء0.1N	96 – 95
الفصل الثاني: النتائج	97
1- الفصل والمقايسة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	98
1-1- الدراسة الكيفية وتعيين الشروط الملائمة لفصل أمزجة الفيتامينات المدروسة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	98
2-1- نتائج مصدوقية طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	98
1-2-1- الخطية	103 -98
2-2-1- نتائج المضبوطية بالطريقة الطيفية الاشتقاقية	112 - 110
3-2-1- الدقة	113
1-3-2-1- الدقة التكرارية	115 - 113
2-3-2-1- الدقة الوسطى	121 - 115
4-2-1- الإنتقائية	124 - 122
2- نتائج الفصل والمقايسة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز	125
1-2- الشروط الكروماتوغرافية	125
1-1-2- اختيار طول الموجة	125
2-1-2 -اختيار pH الطور المتحرك	125
3-1-2- اختيار معدل التدفق	125
4-1-2- تطوير طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز لفصل أمزجة المركبات المدروسة	126 - 125
2-2- نتائج مصدوقية طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز	126
1-2-2- نتائج الخطية بطريقة HPLC	131 – 127
2-2-2 - نتائج المضبوطية بطريقة HPLC	134 - 132
3-2-2- نتائج الدقة بطريقة HPLC	134
1-3-2-2- نتائج الدقة التكرارية	136 – 134
2-3-2-2- نتائج الدقة الوسطى	139 - 137
4-2-2- نتائج الإنتقائية بطريقة HPLC	141 - 139
5-2-2- المتانة	144 - 141
6-2-2- حد الكشف (LOD) وحد القياس الكمي (LOQ)	145 -144
الفصل الثالث: المناقشة	149

1- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتاميني A وE بالاشتقاق	150
2- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتامينات B1,B6,B12بالاشتقاق	151 - 150
3- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتامينات B1 و B6 و B12 ومزيج فيتاميني A وE بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز	152 - 151
4- مقارنة نتائج الطريقتين التحليليتين المطورتين	152
الباب الرابع: الاستنتاجات والتوصيات	154
الاستنتاجات	156 – 155
التوصيات والمقترحات	156
الباب الخامس: الملخصات	157
الباب السادس: المراجع	161
قائمة الجداول	171
قائمة الأشكال	173
قائمة الاختصارات	175

مقدمة البحث

تستخدم تقنيات الكروماتوغرافيا بشكلٍ واسع في العمليات التحليلية وخاصة في مجال فصل مزائج المواد الدوائية وتحديدها كمياً وكيفياً، ولعل أفضل الطرق الكروماتوغرافية وأكثرها استخداماً هي طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز (HPLC)[1]. ومن المزائج المدروسة مزائج الفيتامينات، حيث تتواجد الفيتامينات ضمن الأشكال الصيدلانية المتوافرة في الأسواق بشكل مزائج إما لفيتامينات ذوابة بالماء أو لفيتامينات ذوابة بالدسم أو كلا المزيجين مع بعضهما البعض وقد درست عمليات الفصل والمقايسة لهذه المزائج كلاً على حده، باستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز (HPLC). ولأن هذه الطرق تحتاج فترةً زمنيةً طويلةً نسبياً لإجراء التحليل، كما أنها تحتاج إلى عمليات ضبط pH الطور المتحرك واستخدام مذيباتٍ كثيرةٍ وإجراء عمليات الاستخلاص قبل التحليل لكل مزيجٍ فيتامينيٍّ واختيار الأعمدة المناسبة للفصل وغيرها من الأمور التحليليّة الأخرى .

وبالتالي فقد قادنا ذلك إلى التفكير في استخدام طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي كطريقةٍ بديلةٍ في عملية فصل ومقايسة المزائج الدوائية حيث تتميز هذه الطريقة بأنها سريعةٌ لا تستهلك مذيباتٍ بشكل ضخم غير مكلفةٍ مادياً إضافةً إلى سهولة التطبيق وسهولة التعامل مع الأجهزة التحليلية التي يُجرَى عليها الاشتقاق،إضافةً لإمكانية استخدام هذه الطريقة في مجالاتٍ مختلفةٍ من التحاليل كاستخدامها في تحاليل المواد الدوائية والمواد الغذائية وفي التحاليل البيئية وفي تحليل المواد اللا عضوية كالشوارد الموجبة والسالبة الموجودة في الطبيعة وغيرها من التحاليل [4]. وقد جرى اختيار مزيج فيتاميني A وE كممثل عن الفيتامينات الذوَابة في الدسم ومزيج فيتامينات B12،B6،B1 كممثل عن الفيتامينات الذوّابة في الماء لفصلها ومقايستها بهذه الطريقة التحليلية وذلك نظراً لأهمية هذه المتممات الغذائية[2] ودورها الحيوي في الجسم ووظيفتها كتمائم لبعض الإنزيمات التي تدخل في التفاعلات الحيوية في الجسم[3] والاستخدام الاعتباطي لها من قبل الأشخاص كان لابد من دراستها وإيضاح دورها الحيوي في الجسم والأمراض الناجمة عن عوزها وسميتها وغيرها من الواصمات الحيوية للفيتامينات.

الباب الأول

الدراسة النظرية

Theoretical study

الفصل الأول

الفيتامينات

Vitamins

1- مقدمة عامة وتشمل:

1-1 تعريف الفيتامينات
2-1 تصنيف الفيتامينات
3-1 دورها الحيوي بشكل عام
4-1 خصائصها العامة
5-1 عوزها
6-1 أقسام الفيتامينات

2- الدراسة النظرية للفيتامينات التي وقع الاختيار عليها للدراسة العملية:

1-2 فيتامين B1

2-2 فيتامين B6

3-2 فيتامين B12

4-2 فيتامين A

5-2 فيتامين E

Vitamins (الفيتامينات)

1-1- تعريفها (Definition): هي مغذياتٌ عضويةٌ ضروريةٌ لإنجاز العديد من الوظائف الخلوية والفيزيولوجية في الجسم [5].

1-2- تصنيفها (Classification): تصنف ضمن المتممات الغذائية [5].

1-3- الوظيفة الحيوية (Biological Function): تلعب الفيتامينات دوراً أساسياً كتمامات إنزيمات (Co-Enzymes) والتي تمثل الأشكال الفعالة لهذه الفيتامينات في الجسم وهذا يعني أن عوزاً في فيتامين ما ينعكس على وظيفة أحد الأنزيمات ويسبب مرضاً ما [6].

1-4- الخصائص العامة للفيتامينات (Common properties):[6,5]

1- يحتاجها الجسم بكميات زهيدة .

2- لا تصطنع ذاتيا وتؤخذ من مصادر خارجية (باستثناء الفيتامين ب 12 المصنع من قبل الميكروفلورا الطبيعية المعوية).

3- جزيئات غير طاقية .

4- تساهم في الإستقلاب بشكل مفرد و بشكل متآزر.

5- حساسة تجاه الضوء و الحرارة و الخزن .

6- تمتص بشكل مباشر من الأمعاء (الذوابة بالماء) .

7- واسعة الانتشار بالطبيعة (ضمن المواد الغذائية ذات المصدر الطبيعي) .

8- البعض منها يخزن بشكل متوسط وكبير(الذوابة بالدسم) .

9- الفائض منها يطرح عن طريق البول (الذوابة بالماء) أما الذوابة بالدسم تطرح عن طريق الاستقلاب بالكبد ومن ثم بالبراز .

10- تتأثر الفيتامينات الذوابة بالدسم بشكل أكبر من الفيتامينات الذوابة بالماء باضطرابات الجهاز الهضمي وسوء الامتصاص .

11- تختلف الحاجة اليومية منها حسب العمر والجنس .

1-5- عوز الفيتامينات (Vitamins deficiency): عوز فيتامين ما يؤدي إلى خلل في وظيفة أحد الإنزيمات ويسبب مرضاً ما [7] .

ويكون العوز بشكلين:

1-5-1- أولي (Primary): بشكل مزمن أو ناجم عن كحولية مزمنة .

1-5-2- ثانوي(Secondary): ناجم عن سوء امتصاص، اضطرابات معوية معدية، إفراغ زائد .

1-6- أقسام الفيتامينات:[5,6]

تم تقسيم الفيتامينات إلى مجموعتين أساسيتين: الذوابة في الماء والذوابة بالدسم .

1-6-1- الفيتامينات الذوابة بالماء(water soluble Vitamins) وتضم::

ثيامين: **B1** (Thiamin)

ريبوفلافين: **B2** (Riboflavine)

نياسين: **B3** (Niacine)

حمض بنتوتينيك: **B5**(Pantothenic Acid)

بيريدوكسين: **B6** (Pyridoxine)

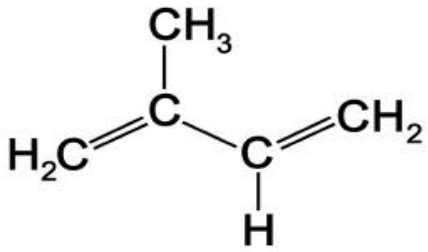
حمض الفوليك: **B9** (Folic Acid)

سيانوكوبالامين: **B12**(Cyanocobalamin)

حمض الأسكوربيك: **C** (Ascorbic Acid)

بيوتين: **H** (Biotin)

1-6-2- الفيتامينات الذوابة بالدسم (fat soluble): وهي جزيئات لا قطبية كارهة للماء تصطنع من مركب يدعى الإيزوبرين [6] .



الشكل (1): صيغة الإيزوبرين [6]

1-6-2-1- ميزات الفيتامينات الذوابة بالدسم:[6]

1- لا تصطنع الفيتامينات الذوابة بالدسم في الجسم بشكل كافي .

2- تعالج في الجهاز الهضمي كباقي الشحوم وبالتالي ظهرت اضطرابات في امتصاص هذه الفيتامينات وبالتالي عوز فيها .

3- تتميز هذه الفيتامينات أيضا أنها لا تنتقل من الأمعاء مباشرةً إلى الدم كما في الذوابة بالماء ولكنها تنتقل إلى اللمف ومن ثم الدم وبعدها إلى الكبد حيث تخزن فيه .

4- تنتقل محملة على البروتينات الشحميَّة إلى العضو الذي يحتاجها .

تضم الفيتامينات الذوابة بالدسم فيتامينات: **A ، E ، K ، D**

سنقتصر في دراستنا على الفيتامينات الذوابة بالماء **B1، B6 ، B12**

وذلك نظراً لتواجدها في الأشكال الصيدلانية بشكل مزائج إضافةً لوجود تداخل في المخطط الطيفي من الرتبة صفر بين الفيتامينين **B1،B6** .

أما الفيتامينات الذوابة بالدسم فنقتصر فيها على دراسة **A و E** وذلك لتواجدها بشكل مزيج في شكل صيدلاني واحد وحدوث تداخل في المخطط الطيفي من الرتبة صفر لهذا المزيج .

2-1- فيتامين B1 (Vitamin B1):

2-1-1- لمحة تاريخية:[8]

هو أول الفيتامينات المكتشفة حيث استخدم فيتامين B1 بدايةً كعاملٍ وقائيٍّ (Preventative) وعلاجي في بعض الأمراض كمرض البري بري أو (KAKKE) حيث ينتشر هذا المرض في مناطق شرق آسيا والمناطق التي تعتمد على الأرز بشكل خاص في تغذيتها .

بين الطبيب الياباني (Dr.Ktakaki) عام 1885 أن الأطعمة الحاوية على بروتين كاللحم نادراً ما يصاب متناولوها بالبري بري .

بينت دراسة أجراها الدكتور (Krestian Ijekman) أن الأطعمة المعتمدة على الأرز الأبيض سببت مرض التهاب عصبي متعدد مشابه للبري بري أما الأطعمة التي تعتمد على الأرز الأحمر أو البني والتي تحوي طبقة (silver skin) لا تزال بالطحن لا تتسبب بتطوير مرض عصبي .

2-1-2- الصيغة والتسمية لفيتامين B1 (Structure and nomenclature):

2-1-2-1- التسمية الشائعة: THIAMIN الثيامين

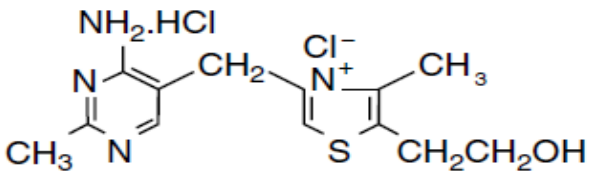
2-1-2-2- التسمية الكيميائية:[83]

3-[(4-Amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride hydrochloride.

2-1-2-3- الصيغة الجزيئية: $C_{12}H_{17}ClN_4OS,HCl$ [82]

2-1-2-4- الوزن الجزيئي: 337.3 [83,82]

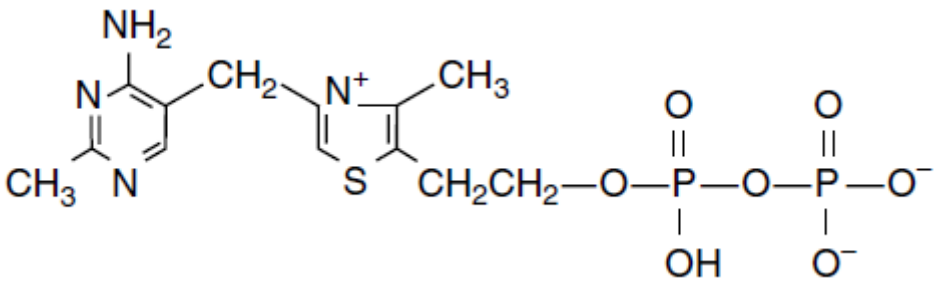
2-1-2-5- الصيغة المفصلة للثيامين(Structure):[83]



الشكل (2): صيغة ثيامين هيدروكلوريد

نلاحظ أن الصيغة تحتوي على حلقتين الأولى بيريميدينية والثانية ثيازولية ترتبطان ببعضهما بجسر -CH2 وهو الشكل غير الفعال لفيتامين B1 (الثيامين) أما الشكل الفعال له فهو: THIAMINE PYROPHOSPHATE [10]

الصيغة (Structure):



الشكل (3): صيغة ثيامين بيرو فوسفات[10]

حيث يتم تحويله إلى الشكل الفعال في الكبد والدماغ بواسطة أحد أنزيمات الكيناز المعتمدة على ATP . يتواجد الثيامين في الأشكال الصيدلانية بالشكل ثيامين هيدروكلوريد.

2-1-3- الخواص الفيزيائية (Physical properties): [82,84,83,8]

2-1-3-1- المظهر (Apperance): مسحوق بلوري كريستالي أبيض أو يغلب عليه اللون الأبيض أو يتواجد بشكل بلورات عديمة اللون تملك درجة انصهار تتراوح بين $196°c - 200°c$ ، غير ثابت بالتعرض للأشعة فوق البنفسجية والأشعة X وللأشعة غاما[9] .

2-1-3-2- الذوبانية (Solubility): [83,84] ذواب في الماء بسهولة (freely) كما أنه يذوب في الغليسيرول (soluble) قليل الذوبان في الكحول و الكلوروفورم (slightly).

2-1-3-3- pH و pK_a محلول الثيامين:

يعطي المحلول المائي له بتركيز 1% قيمة pH تتراوح بين (3.3 – 2.7) حسب دستور الأدوية البريطاني[83] وقيمة تتراوح بين (3.4 – 2.7) حسب دستور الأدوية الأمريكي[82] .يعد التيامين ثابتاً في هذه القيمة من pH حيث يكون ثابتاً حتى في الصاد الموصد ولكن في القيم المعتدلة من pH يصبح أقل ثباتاً .يتحول الثيامين في المحاليل القلوية إلى الشكل المؤكسد معطياً مركباً شديد التألق ثلاثي الحلقة هو الثيوكروم وهذا هو التفاعل النوعي المستخدم في تحديد هوية الثيامين [82]. أما pK_a **له فهو:** 4.8 [84].

2-1-4-3- قمة الامتصاص الأعظمي للثيامين:[84]

يظهر المحلول المائي للثيامين هيدروكلوريد pH(3) قمة امتصاص أعظمي عند (246nm).

2-1-4- الحرائك الدوائية لفيتامين B1(Pharmacokinetics):

يوجد حوالي نصف الكمية الكلية من الثيامين في الجسم مخزنةً ضمن الكتلة العضلية [13] بشكل التميم الأنزيمي ثيامين ثنائي فسفات حيث يقسم الأدينوزين ثلاثي فسفات (ATP) إلى أدينوزين ثنائي فسفات لاصطناع ثيامين ثنائي الفسفات من الثيامين الحر بفعل ثيامين بيروفسفوكيناز وهو الشكل الفعال للثيامين في الجسم كما يختزن في الكبد والدماغ والقلب [8,11].

2-1-4-1- الامتصاص (Absorption):[8]

يمتص الثيامين عبر المخاطية المعوية وفق آليتي النقل الفعال والانتشار البسيط ويرتبط ببروتينات البلازما بمعدل 90% [11] وتتأثر عملية الامتصاص هذه بعوامل:[15]

1- التقدم بالعمر حيث تتناقص الألفة للركيزة بزيادة العمر .
2- داء السكري .
3- عوامل هرمونية كالتيروكسين والموديولين (بروتين رابط للكالسيوم) .
4- تناول الكحول .
5- الأطعمة الدسمة حيث تنقص امتصاص الفيتامينات المنحلة بالماء بشكل كامل .
6- تناول بعض الأدوية كالمدرات عند كبار السن يزيد الفقد البولي للثيامين .
7- قطع الأمعاء (resection) يسبب مشكلة كبيرة في امتصاص الثيامين .

2-1-4-2- عمر النصف: قدر عمر النصف الحيوي للثيامين ب(9.5 - 18.5) ساعة [11]

2-1-4-3- الاستقلاب (Metabolism):[9]

يستقلب ثيامين ثنائي فسفات وفقاً لمايلي:

- نزع الفسفرة (diphosphorylation) معطياً ثيامين أحادي فسفات المحفز بفعل ثيامين بيروفسفاتاز .
- الفسفرة الإضافية تعطي ثيامين ثلاثي فسفات المحفز بفعل فسفوريلاترانسفيراز من ثيامين ثنائي فسفات حيث يتحول ثيامين أحادي فسفات بفعل الفسفاتاز القلوية التي توجد في جدار الأمعاء .

- حددت بعض المواد المستقلبة لثيامين بيروفسفات والتي قدرت بحوالي 20- 30 مركب من خلال تناول ثيامين الموسوم إشعاعياً ومن هذه المركبات (4- مثيل ثيازول 5- أسيتيك أسيد) و (5- (2- هيدروكسي إيثيل 4- مثيل ثيازول) .هذه المستقلبات لثيامين بيروفسفات تطرح عبر البول بشكل كامل .

2-1-4-4- الإطراح (Elimination): [9]

اعتبر معدل الإطراح البولي لمدة من الزمن كعاكسٍ للتزويد بالثيامين لدى الأفراد و قد أظهرت الدراسات أنه فوق عتبة معينة من ثيامين المتناول وهي حوالي (0.3 – 0.4) mg/100kcal لدى البالغين فإن التراكيز البولية تزداد تدريجياً .

معدل الإطراح في حال كان المتناول (0.5mg/1000kcal) على الأقلμg100 .في حال التناول الثانوي (0.2mg/1000kcal) فإن معدل الإطراح اليومي كان فقط (5 – 25) μg أما في حال البري – بري كان المقدار المطروح (0 – 15) μg .

يتم تحديد الثيامين المطروح في البول اعتماداً على تحول الثيامين إلى ثيوكروم ويقاس إما بطريقة معايرةٍ طيفيةٍ أو باستخدام HPLC بعد جمع بول 24 ساعة .

2-1-5- الوظائف الحيوية لثيامين بيروفوسفات (Biological functions):[15,36,35]

يعد ثيامين بيروفسفات (ثنائي الفسفات) هو الشكل الفعال حيوياً للفيتامين B1 ويدخل التفاعلات الحيوية كتمامة إنزيم في تحفيز التفاعلات التالية:

2-1-5-1- نزع الكربوكسيل المتأكسد على الحموض ألفا كيتونية (بيروفات و ألفا كيتوغلوتارات) وذلك من خلال تحفيز ثلاثة أنظمة نازعة للهيدروجن هي:

- معقد بيروفات ديهيدروجيناز .
- معقد ألفا كيتوغلوتارات ديهيدروجيناز.
- معقد كيتو أسيد ديهيدروجيناز .

لثيامين ثنائي فسفات علاقة خاصة بشوارد المغنزيوم في الموقع الفعال للإنزيمات التي يتطلب عملها وجود ثيامين ثنائي فسفات حيث هذه الشاردة الموجبة مطلوبة لتحقق لثيامين ثنائي فسفات الأنيوني صميم إنزيمه [15,36,35].

- الإنزيم الأول في سلسلة بيروفات دي هيدروجيناز هو (E1) ويدعى بيروفات دي كاربوكسيلاز دوره تحفيز التفاعل البدئي لتحول بيروفات إلى مشتق هيدروكسي إيتيل كاربوكسي يرتبط في الموقع 2 لحلقة التيازول لتمامة الإنزيم ثيامين ثنائي فسفات وينزع الكاربوكسيل .
- (E2) هو الإنزيم الثاني يدعى ديهيدرو ليبويل أسيتيل ترانسفيراز والذي ينتج أستيل كو إنزيم A .
- (E3) ديهيدروليبويل ديهيدروجيناز وهو الذي يعمل على توليد $NADH$ من NAD^+ وهو يظهر في ألفا كيتو غلوتارات دي هيدروجيناز و السلسلة المتفرعة لألفا كيتوأسيد ديهيدروجيناز وهذين الإنزيمين النازعين للهيدروجن لهما نفس عمل بيروفات ديهيدروجيناز حيث تعمل كلها على نزع الكربوكسيل .

أنزيمات ألفا كيتوغلوتارات ديهيدروجيناز تتوسط تفاعلات تحول ألفا كيتو غلوتارات إلى سكسنيل كو A .

أما المعقد (E3) والذي يرتبط بالسلسلة المتفرعة لألفا كيتو أسيد ديهيدروجيناز يعمل على أكسدة السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية (فالين – لوسين – إيزولوسين) لتحرر منها الطاقة عندما تتواجد بشكل مفرط لاصطناع البروتين حيث أنه وبعد نقل الأمين من هذه الأحماض الأمينية فإنها تعطي الأحماض ألفا كيتونية الموافقة والتي هي على التوالي (إيزوبوتيريل COA – إيزوفاليريل COA – ألفا متيل بيوتيريل COA) على التوالي .

وبشكل تال فإن أكسدة الأحماض الدسمة تنتج أسيتيل COA أو بروبيونيل COA من هذه التفاعلات الوسيطة أما البروبيونيل COA يتحول إلى سكسنيل COA .

وبالتالي فإن معقد ديهيدروجيناز يؤثر بآلية نزع الكاربوكسيل التأكسدي ليحرر co_2 ويحول NAD^+ إلى $NADH$.

2-1-5-2- تفاعلات نقل الكيتول المتواسطة بإنزيمات نقل الكيتول: [15,36,35]

تحفز تفاعل طريق بنتوز فسفات المسؤول عن توليد السكاكر الخماسية بشكل خاص لأجل اصطناع الأحماض النووية .

يعتمد التفاعل الأساسي على أن إنزيم نقل الكيتول يحفز نقل ذرتي كربون من ذرة سكر فسفاتي إلى آخر النتيجة هي تطاول في سلسلة الكربون لأحد السكاكر المفسفرة:اكزايلول 5-

فسفات (C5) + ريبوز 5 – فسفات (C5) يعطي غليسر ألدهيد 3- فسفات (C3) + سيدوهيبتولوز 7- فسفات (C7) .

- حيث يفعل طريق البنتوز بشكل خاص في النسيج الشحمي – قشرة الكظر – وبشكل أقل في الكبد .
- يوجد إنزيم نقل الكيتول في معظم الأنسجة وأنماط الخلية كما أنه يتواجد في تراكيز عالية (10%) من البروتين الكلي المنحل في القرنية .
- طريق بنتوز فسفات الأعلى نشاطاً يتواجد في الكريات الحمر وهو ضروري جداً لتوليد $NADPH$ بسرعة وإنقاص مستويات غلوتاتيون المؤكسد في الوسط .
- تنظم أنواع الثيامين التعبير الجيني من أجل بعض إنزيمات الثيامين ثنائي الفوسفات التي يعد الثيامين لها تمامة إنزيم كإنزيم نقل الكيتول وأيضاً من أجل تحت الوحدة بيتا من إنزيم بيروفات نازعة الهيدروجن ولكن ليس من أجل إنزيم ألفا كيتو غلوتارات ديهيدروجيناز .

2-1-6- مصادره (Sources): الأرز– (الأرز المقشور لا يحتوي على هذا الفيتامين و كذلك الطحين الأبيض) – اللحوم - إضافة لتواجده في خلاصة خميرة البيرة [10,11,12].

2-1-7- الأمراض الناجمة عن عوز فيتامين B1 وحالات الخطر المرتفعة:

يحدث عند الإنسان الذي يعاني عوز فيتامين B1 خلل في التفاعلات الحيوية في الجسم والتي يدخل فيها كتميم إنزيم للإنزيمات المسؤولة عن القيام بهذه التفاعلات وذلك بسبب توقف التفاعلات المعتمدة على ثيامين بيروفسفات وتراكم ركائز التفاعلات (الأحماض ألفا كيتونية) للأحماض الأمينية ذات السلاسل المتفرعة وبيروفات ويؤدي ذلك بمجمله لنقص إنتاج ATP وضعف الوظائف الخلوية [17] .

ومن هذه الأمراض (Diseases):

2-1-7-1- بري - بري عند الأطفال:[9] يحدث بسبب تناول أطعمة غنية بالكربوهيدرات وفقيرة بالثيامين بعد الفطام أو بسبب نقصه في حليب الثدي عند الرضيع حيث يتسبب بحدوث:

- الوذمة أو قصور القلب في الجانب الأيمن [15] .
- خلل وظيفي في الطريق المعدي المعوي مع فقد الشهية (loss of appetite) .
- إقياء (Vomiting) وإسهال (Diarrhea)

- حدوث اختلاجات (convulsion)
- قلة في التبول (oligouria) .

2-1-7-2- بري – بري الرطب عند الأطفال والبالغين (Wet Beri - Beri):

يكون فيه وذمة الأقدام والرئة والقصور القلبي شائعين كما يتوقع حدوث حالات اكتئابٍ واضطراباتٍ وعائية [9] .

2-1-7-3- بري - بري الوبيل (pernicious):

وهو الشكل الحاد لبري – بري أو ما يعرف بري – بري شوسين والذي كان يتسبب بحوالي ستا وعشرين ألف وفية في العام في اليابان في العشرينيات من القرن الماضي حيث لوحظ فيه حدوث قصور قلبي وارتفاع لمستويات حمض اللبن الدوراني [9].

2-1-7-4- بري – بري الجاف (Dry Beri - Beri):[9]

ينجم عن عوز في فيتامين B1 بسبب فقر النظام الغذائي به وهذا النمط يصيب الجملة العصبية حيث يتسبب بحدوث التهاب أعصاب محيطي صاعد متناظر (symmetrical ascending peripheral polyneuritis) دون حدوث أعراض قلبية كما يتسبب أيضاً بحدوث الوهن (weakness) والخدر (numbness) وهو حدوث نمل في الأطراف [15] .

2-1-7-5- متلازمة كوساكوف – فرنكيه (Kosakov syndrome):

عند الكحوليين الذين يحدث لديهم اعتمادٌ كحوليٌّ[18] مزمنٌ يترافق ذلك بشكل متكرر مع اعتلال دماغي فرنكيه (Wernicks encephalopathy) (ذهان كوساكوف) حيث أن الكحوليين يتناولون أنظمةً غذائيةً فقيرة، وبالتالي هناك انخفاضٌ في تركيز الثيامين لأن الكحول يقلل امتصاص الثيامين في المخاطية المعوية[18] .

يعتمد التشخيص في الاعتلال العصبي فرنكييه التقليدي على وجود الرنح (ataxia) كما يلاحظ شلل حركة العين، والوظيفة الحركية الشاذة في حال فقدان الذاكرة (aminsia)، أو الخمول (apathy) ، والخرف (confabulation) .

2-1-7-6- الزهايمر(Alzheimer):[16] الترافق المحتمل بين عيوب ثيامين المعتمد على الإنزيم وأمراض التنكس العصبي (neurodegenerative) كالزهايمر وأمراض الباركنسونية تكون متوقعة .

حوالي (18% - 21%) النقص الحاصل في مستويات ثيامين ثنائي فسفات لوحظ في دراستين حول الزهايمر (الخرف الشيخي الدماغي المبكر) . لوحظ أن من آليات حدوث هذه الأمراض وجود خلل في عمل الثيامين كتميم لإنزيم ألفا كيتو غلوتارات ديهيدروجيناز والذي يتسبب بحدوث تلف بشكل كبير في الخلايا الدماغية في حالات الزهايمر والباركنسون وأمراض تنكسية دماغية أخرى .

2-1-7-7- من الأخطار الأخرى:

أذيات دموية ناجمة عن انخفاض مستوى ثيامين بيرو فسفات في الكريات الحمر تحت (140 nmol/L) حيث أن التركيز الأساسي لثيامين بيرو فسفات في الكريات الحمر يتراوح بين nmol/L (150 – 140) يتسبب بزيادة مستويات بيروفات ولاكتات في الدم و قد وجدت في (16%) من الحالات في دراسة أجريت على 225 حالة عمرها فوق 65 سنة إضافةً إلى ملاحظة ذلك بعد التمارين الرياضية و بعد تحميل الغلوكوز[17] .

2-1-8- الأعراض المبكرة لعوزB1: (Early symptoms of deficiency):[17]

- اعتلال الأعصاب المحيطة.
- القهم.
- الإنهاك.

والتي تترقى إلى وذمة و تنكس قلبي وعائي وتنكس عضلي .

2-1-9- الجرعة الدوائية و السمية لفيتامينB1(Dosage drug, toxicity): [13]

يتم التزود به ضمن الأشكال الصيدلانية للوقاية من العوز بجرعة mg/day (5 - 1).

أما لمعالجة العوز فنقتصر على جرعة تتراوح بين mg/day (35 - 10) .

أما بالنسبة لفيتامين B1 كمحتوى إفرادي فيصل في جرعته حتى 300mg/day .

مرض بري – بري: يعالج بجرعة تتراوح بين mg/day(100 - 50). بشكل تكراري يعطى حقن عضلي أو وريدي لمدة 7 – 14 يوم ثم تتبع بجرعة مداومة .

في حالة متلازمة فرنكيه يعطى فموياً جرعةٌ من ثيامين بروبيل ثنائي الكبريت تقدر بحوالي 50mg/day .

الجرعات العالية من فيتامين B1 المعطاة وريدياً قد تتسبب بتوسع وعائي وهبوط في الضغط - تباطؤ في ضربات القلب (bradycardia) – اضطراب في النظم (arrhythmia) – اضطراب تنفسي (respiratory depression) كما أنه قد يحدث إخماد للنقل في الوصل العصبي العضلي (neuromuscular junction) – غثيان – ألم بطني – تأق (anaphylaxia) – حكة (Itch) .

لكن في الإعطاء الفموي لم تسجل حالات عن تجاوز الحد .

2-1-10- الحاجة اليومية: **(Dietry Reference Intake)** وترمز **(DRI)** [13]

تقدر الحاجة اليومية من فيتامين B1 عند حديثي الولادة (Infants) من عمر يوم حتى عمر ستة أشهر (0.2mg/day).

من عمر سبعة أشهر وحتى عام (0.3mg/day).

من عمر عام وحتى ستة أعوام (0.4mg/day).

من عمر سبعة أعوام وحتى عشرة أعوام (0.5mg/day).

عند البالغين تقدر الحاجة اليومية بحوالي (1mg/day)عند الذكور أما عند الإناث فتقدر بحوالي (0.9mg/day).

أما في حالات الحمل و الإرضاع فتصل الحاجة اليومية إلى (1.2mg/day) . كل هذه القيم مقدرة حسب الجمعية الأمريكية (US. Diatry reference intake) .

2-2- فيتامين B6 (بيريدوكسين):

2-2-1- لمحة تاريخية: قام العالم (Gyorgy) بتحديد فيتامين B6 كعامل مميز عن فيتاميني B2 وعن B3 حيث عزل من قبل Gyorgy و Lepkovetsky [23,22].

2-2-2- الصيغة والتسمية لفيتامين B6 (Structure and nomenclature):

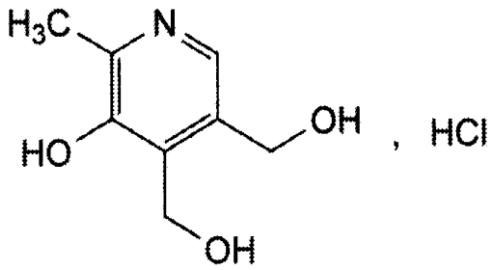
2-2-2-1 التسمية الشائعة: بيريدوكسين هيدروكلوريد وهو الشكل الأكثر استخداماً ضمن الأشكال الصيدلانية كما يوجد شكلين آخرين هما البيريدوكسال والبيريدوكسامين[84] .

2-2-2-2- التسمية الكيميائية:[24,82] 3,4 pyridindimethanol,5 hydroxy – 6 –) (methyl, hydrochloride

2-2-2-3- الصيغة الجزيئية (molecular formula): $C_8H_{11}NO_3,HCl$ [83]

2-2-2-4- الوزن الجزيئي (molecular weight): 205.6 [83]

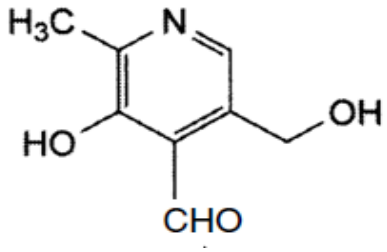
2-2-2-5- الصيغة المفصلة:



الشكل (4): صيغة بيريدوكسين [83]

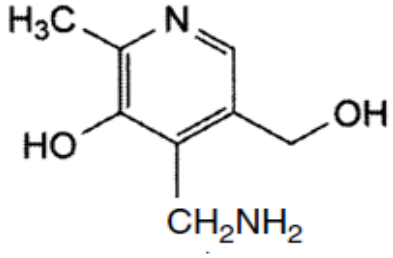
نلاحظ أنه يشتق من حلقة البيريدين وكذلك كل المشتقات العائدة له .

بيريدوكسال وله الصيغة:



الشكل (5): صيغة بيريدوكسال[83]

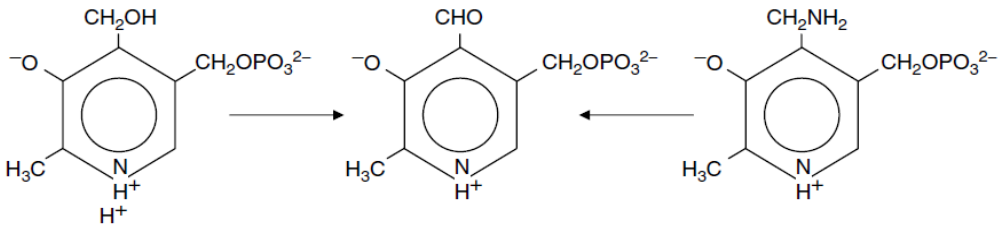
بيريدوكسامين ويملك الصيغة:



الشكل (6): صيغة بيريدوكسامين[83]

في الجسم لا يوجد إلا مفسفراً في الموقع 5 من حلقة البيريدين والشكل الأكثر فعالية له هو

بيريدوكسال فسفات وله الصيغة [24] **:**



الشكل (7):للشكل الفعال التحول للفيتامين B6

حيث نلاحظ من الصيغ السابقة أن الصيغة الأكثر فعاليةً حيويةً والتي تتحول إليها كل الأشكال هي صيغة البيريدوكسال - 5 - فسفات ويتم هذا التحول بفعل إنزيمين هما كيناز وأوكسيداز حيث يقوم كيناز بفسفرة مجموعة هيدروكسي ميتيل لكل الأشكال الفيتامينية لفيتامين B6، أما إنزيم أوكسيداز فيحفز تفاعل أكسدة بيريدوكسين – 5 – فسفات (PNP) وبيريدوكسامين – 5 – فسفات (PMP) إلى بيريدوكسال – 5 – فسفات الشكل الفعال (PLP).

يتم نزع الفسفات من المركبات الثلاثة بفعل إنزيم الفسفاتاز الموجود في الأمعاء .

2-2-3- الخواص الفيزيائية (physical properties):

2-2-3-1- المظهر (Appearance): مسحوق بلوري أبيض أو أبيض في العموم .[84]

2-2-3-2- الذوبانية (solubility): يذوب جزء منه بخمس أجزاء من الماء (يذوب بسهولةٍ جداً في الماء) وجزء إلى 90 جزء إيتانول (قليل الذوبان في الإيتانول) غير ذواب عملياً في الكلوروفورم والإيتر قليل الذوبان جداً بالأسيتون .[84,83]

2-2-3-3- درجة الانصهار: ينصهر بدرجة 205 °C .[82]

2-2-3-4- pH و pK_a:

pK_a (N): 5 و pK_a (OH): 9 .[82]

pH: يعطي محلول تركيزه 5% من بيريدوكسين هيدروكلوريد قيمة pH بين (2.4- 3) .[82]

2-2-3-5- طيف امتصاص بيريدوكسين هيدروكلوريد: لوحظ أنَّ قمة الامتصاص الأعظمي له تظهر عند طول موجة حوالي 290nm [83,84] في محلول حمضي pH (2.4- 3).

2-2-4- الحرائك الدوائية لفيتامين B6 (Pharmacokinetics):

2-2-4-1- الامتصاص (Absorption):[24]

يحدث امتصاص فيتامين B6 بشكلٍ تالٍ لحلمهة الأشكال المفسفرة في لمعة الأمعاء حيث كان يعتقد في السابق أن الامتصاص كان يحدث بآلية الانتشار البسيط أما الدراسات الحديثة فقد أكدت على أن الامتصاص يتم بآليةٍ متخصصةٍ لامتصاص فيتامين B6 هي آليةٌ معتمدةٌ على $(Na^+ - dependent\ carrier\ mediated)$) وبما أن بيريدوكسين هو الشكل الأكثر استخداماً لفيتامين B6 فقد لوحظ أنّ إعطائه الفموي أقلُّ فعاليةً من الإعطاء الوريدي حيث ينتشر وريدياً بسرعةٍ في حجم توزعه فهو لا يرتبط ببروتينات البلازما الدموية لذا فهو يملك ثابتة معدل إطراحٍ كبيرة .

2-2-4-1-1- العوامل المؤثرة في امتصاص فيتامين B6:[24]

1- متطلبات فيزيولوجية تعتمد عل الجنس والعمر.
2- حجم الجسم .
3- مدى الفعالية الفيزيولوجية .
4- البروتين المتناول في النظام الغذائي .
5- الأدوية الموصوفة فموياً المترافقة بتأثيراتٍ جانبيةٍ سريريةٍ والتي عادةً تكون مترافقةً بالحمل .

2-2-4-2- الاستقلاب (Metabolism):[19,31]

يستقلب الشكل الفعال لفيتامين B6 المتناول دوائياً(بيريدوكسين هيدروكلوريد) وهو بيريدوكسال فوسفات إلى (4PA بيريدوكسيك أسيد)[31] وهو المستقلب المؤكسد الأخير له ضمن الكبد عن طريق (NAD) المرتبطة بنازعة الهيدروجن أو (FAD) المرتبطة بمؤكسد الألدهيد في كبد الإنسان فقط وهذا الانقلاب غير عكوس حيث أن (4PA) هو الشكل الذي ينطرح عن طريق البول و الذي يعد مؤشراً هاماً لعوز فيتامين B6 حيث تناقص مستواه المطروح بولياً لأقل من 3mmol/day هو دلالة على العوز[31] .

2-2-4-2-1- على مستوى الكريات الحمر(Red blood cells):[19] يعد تركيز البيريدوكسال ومشتقه الفوسفاتي في الكريات الحمر أعلى منه في البلازما الدموية ويفسر هذا بسهولة اختراق (PL) لغشاء الكرية الحمراء وألفته العالية للخضاب الدموي أكثر من الألبومين

البلازمي. حيث يصنَّع الشكل المفسفر له في الكرية الحمراء وتكون ألفته للارتباط بالخضاب أعلى منها في (PL) ومن ثم يحدث انتقال لهذين الشكلين الفعالين للفيتامين B6 إلى كل الأنسجة بعد الاستقلاب الكبدي .

2-2-4-2-2- في العضلات (Muscles):

يتواجد فيتامين B6 بشكل بيريدوكسال فسفات (PLP) في العضلات مرتبط بالغليكوجن فسفوريلاز حيث تعد العضلات العضو التخزيني لهذا الفيتامين [24] .

2-2-5- الوظائف الحيوية لفيتامين B6 (Biological functions of B6):[20,24]

2-2-5-1- يعد بيريدوكسال فسفات تميم إنزيم (Co Enzyme) للعديد من الإنزيمات التي تدخل في التفاعلات الحيوية في الجسم ومنها:[21]

1- عائلة إنزيم نقل الأمين للأحماض الأمينية .
2- عائلة إنزيم اصطناع تربتوفان .
3- عائلة إنزيم راسيماز ألانين .
4- عائلة إنزيم فسفرة غليكوجن (غليكوجن فوسفوريلاز) .

يلعب هذا الفيتامين دوراً كبيراً فهو (تمامة إنزيم) قي تفاعلات نقل الأمين حيث تعتبر ناقلات الأمين إنزيمات ثنائية الركيزة بحيث يرتبط بالإنزيم ركيزتان في الوقت نفسه إحداها حمض أميني NH_2والثانية حمض كيتوني $(= \mathrm{C} = \mathrm{O})$.

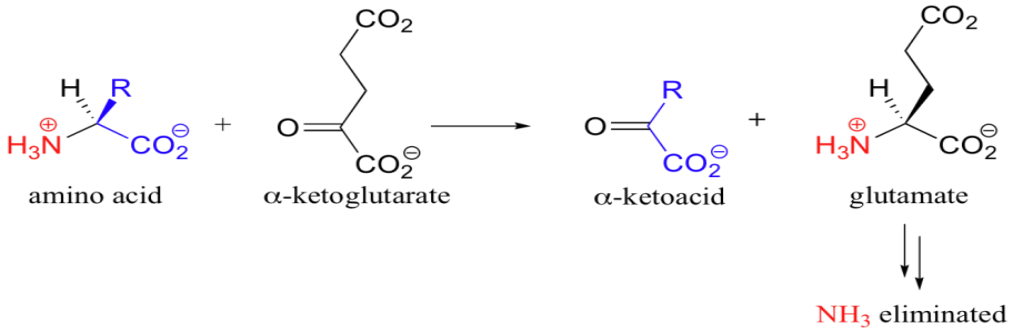
يأتي الإنزيم بمساعدة PLP ويأخذ الزمرة الأمينية من الحمض الأميني ويعطيها للكيتون .

مثال1: إنزيم غلوتامات-أوكسالوأسيتات ترانس أميناز GOT:[21,35,36]

حيث يساهم بمساعدة التمامة (بيريدوكسال فسفات) PLP بنقل الزمرة الأمينية من أسبارتات إلى ألفا كيتوغلوتارات فيتحول الأخير إلى حمض أميني هو غلوتامات و أسبارتات إلى أوكسالو أسيتات .

مثال2: إنزيم غلوتامات-بيروفات ترانس أميناز GPT:[21,35,36] ينقل الزمرة الأمينية من آلانين إلى ألفا كيتو غلوتارات محولاً آلانين إلى بيروفات وألفا كيتو غلوتارات إلى غلوتامات

)



الشكل (8): الآلية الحيوية لعمل B6 [21]

2-2-5-2- من وظائف فيتامين B6 الحيوية إضافة لما سبق:[24,25]

- استقلاب الأحماض الأمينية .

- استحداث السكر واصطناع الأحماض الدسمة .

- تصنيع نياسين من تربتوفان ويسهم في اصطناع الهيم والأحماض النووية .

2-2-6- مصادره (Sources):[12,27]

خميرة البيرة - الحبوب – اللحم – الفواكه – الخضار(وتتناقص مستوياته في الأغذية المجمدة والمعلبة [28]).

2-2-7- المظاهر السريرية لعوزB6 (clinical appearances of deficiency):

يحدث العوز عندما يكون تركيز فيتامين B6 البلازمي أقل من 10mmol/L ومن مظاهره:

- تدهورٌ وضعفٌ في النمو الجسدي .
- بيلاغرا (مرض الحصاف) داء الذرة (Pellagra) [29].
- التهاب جلدي (dermatitis)[29] .
- قهم (anorexia) .
- فقر دم في كل حالات العوز[34] .
- التهاب الأعصاب المحيطية [33] .

لكن الأعراض الأكثر وضوحاً هي تلك التي تتعلق بالجهاز العصبي وتتضمن:[33]

- الرنح (Ataxia) .
- فرط الهيوجية (Hyper Irritability) .
- ضعف الانتباه (Impaired alertness) .
- حركات الرأس غير الطبيعية .
- اختلاجات (Convulsions) .

2-2-7-1- عند الأطفال والرضع (Children and Infants):[29]

أجريت دراساتٌ سريريةٌ من قبل العالم سيندرمان على دراسة تطور عوز فيتامين B6 لوحظ وجود ارتباطٍ سريريٍّ بين الأطفال الذين لديهم اختلاجات مع عوز فيتامين B6 والتي يتم تلطيفها بالإعطاء الوريدي لفيتامين B6 (بيريدوكسين) وقد بينت الدراسة أنَّ سبب هذا العوز يعود إلى عملية تعقيم حليب الأطفال بالحرارة أو بسبب استخدام مانعات الحمل الفموية من قبل الأم خلال فترة الإرضاع مما يجعل حليبها فقيراً بفيتامين B6 .

2-2-7-2- عند النساء:[29]

يحدث العوز عند النساء إما بسبب أدوية مانعات الحمل الفموية أو بسبب حالات القيْ المفرط في بداية الحمل أو لوجود أدويةٍ تترافق مع فترة الحمل كل هذا متعلق بالتحريض (induction) الهرموني لتربتوفان (2,3) دي أكسيجيناز ولذلك فإنّ تربتوفان المعدل يستقلب بشدة .

2-2-7-3- زمرٌ دوائية تسبب عوز فيتامين B6:[30]

يمكن أن تتسبب بعض الأدوية مثل البنسلين والستيروئيدات القشرية والأدوية المضادة للتدرن كالإيزونيازيد والسيكلوسيرين (دواءٌ مستخدمٌ في معالجة السل) بحدوث حالات عوزٍ في فيتامين B6 حيث بينت الدراسات أن المعالجة الطويلة للسلّ تسببت بحدوث التهاب أعصاب محيطي .

2-2-8- الجرعة العلاجية لفيتامين B6 (Therapeutically dosage):[32]

تقدر الفعالية العلاجية لفيتامين B6 بالتزويد اليومي بجرعة تقدر بحوالي 50mg منه حيث تكون هذه الجرعة فعالة حتى في حالة المظاهر العصبية الناتجة عن عوز هذا الفيتامين أما بالنسبة للسمية فلم تظهر إلا بعد تجريع مقدار 1g من الفيتامين بشكل يومي ولمدة عدة أعوام . كذلك الحال في معالجة عوز الفيتامين الناتج عن الإقياءات (Vomiting) المفرطة في بداية الحمل أو عند النساء اللاتي يستخدمن مانعات الحمل الفموية أو أدويةٍ هرمونيةٍ معينةٍ حيث يتم

التصحيح بجرعةٍ من الفيتامين تقدر بحوالي 50mg يومياً ، كما أنه يعطى بحذر في حال تناول بعض الأدوية كأدوية باركنسون (ليفودوبا) .

2-2-9- الحاجة اليومية منه DRI عند الأطفال 0.9mg لكل 1.1 kg،عند الذكور البالغين 2mg لكل1.6 kg ، وكذلك عند الإناث[26] .

2-3- فيتامين B12:

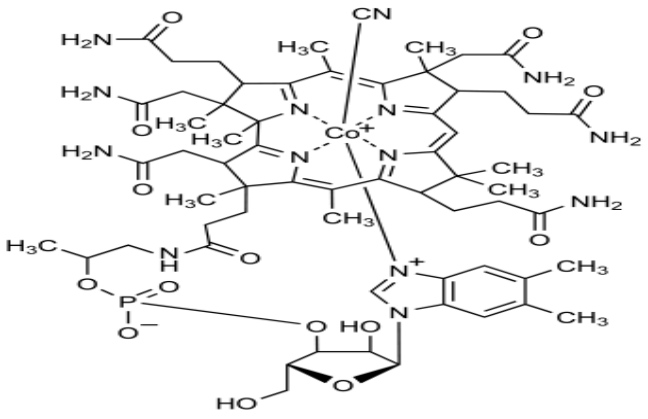
آخر الفيتامينات المكتشفة عام 1948 عزل بشكل نقيٍّ من قبل Karl A. Folkers (USA) و Alexander R. Todd (UK)[40] .

2-3-1- الصيغة والتسمية (Structure and nomenclatural): [83,82]

2-3-1-1- التسمية الشائعة: سيانوكوبالامين (cyanocobalamin)

2-3-1-2- الصيغة المجملة: $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ - الوزن الجزيئي: 1355 g.

2-3-1-3- الصيغة المفصلة:



الشكل (9): صيغة سيانوكوبالامين[84]

نلاحظ أنه يتألف من حلقة معقدة هي الكورين (تتألف من 4 حلقات بيرولية في مركزها شاردة كوبالت ثلاثي التكافؤ حيث ترتبط مع ذرات آزوت النوى البيرولية وهي شبيهة بالهيموغلوبين حيث أن حلقة الكورين تشبه البرفرين) كما ترتبط شاردة الكوبالت مع ثنائي متيل بنز إيميدازول وسكر مفسفرهو ريبوز – 3 فسفات (النكليوتيد) و أخيراً هناك رابطةٌ بين الكوبالت والجذر R. يملك هذا الفيتامين 4 أشكال تختلف حسب R [49] :

- هيدروكسي كوبالامين .

- سيانو كوبالامين .

- متيل كوبالامين .

5- هيدروكسي أدينوزيل كوبالامين .

الشكلين الأخيرين هما الشكلين الفعالين للفيتامين .

2-3-2- الخواص الفيزيائية (Physical properties): [83]

2-3-2-1- المظهر: مسحوق بلّوري لونه أحمر قاتم أو بلّورات بلون أحمر قاتم .

2-3-2-2- الذوبانية (Solubility): يذوب بشكل قليل في الماء والإيتانول ، غير ذوابٍ عملياً في الأسيتون[83] والشكل اللامائي منه يكون مسترطباً جداً[84] .

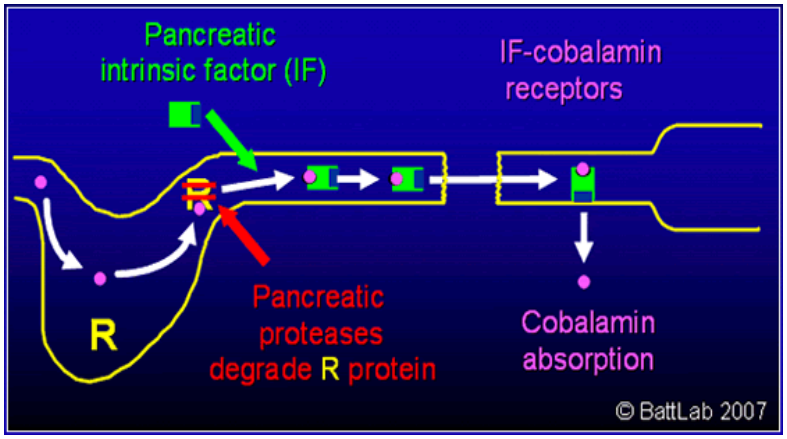
2-3-2-3- طيف امتصاص B12: يظهر طيف امتصاصٍ أعظميٍّ عند طول موجة 278nm و 361nm و 558nm) [83,84].

2-3-3- الحرائك الدوائية لفيتامين B12 (Pharmacokinetics):

2-3-3-1- امتصاصه (Absorption):[44]

هناك آليتين لامتصاصه الأولى بالنقل الفعال والثانية بالنقل المنفعل حيث يحرَّرُ الفيتامين بدايةً من معقداتٍ بروتينيةٍ بواسطة أنزيمات العصارة المعدية بواسطة الوسط الحمضي حيث يقترن مع البروتين اللعابي الرابط وهو من الهابتوكورينات ومن ثم يهضم هذا البروتين(R) بواسطة التربسين في الجزء العلوي للأمعاء الدقيقة فيحرِّرُ B12، والذي ينتقل إلى البروتينات السكرية المعوية الممثلة بالعامل الداخلي (IF) المنتج بواسطة الخلايا الجدارية في المعدة المسؤولة عن إنتاج الحمض وهو بروتينٌ سكريٌّ وزنه الجزيئي 45000 دالتون ينتج في الشبكة البطانية الداخلية أو في ميكروزوم الخلايا الجدارية (wall cells) في المعدة (stomach)،ومن ثم يجري امتصاصه عن طريق مواضع مستقبلة في اللفائفي (Jejunum) متطلباً أيونات الكالسيوم وقيمة pH قريبةٍ من الاعتدال ومن ثم ينتقل إلى البلازما الدموية ليرتبط ببروتين بلازمي ناقل (Transporter).

بينت الدراسات أن حوالي 50% من الجرعة المعطاة فموياً من B12 تمتص .



الشكل (10): يوضح آلية امتصاص B12 وارتباطه مع IF [44]

أما الامتصاص المنفعل لفيتامين B12 يمكن أن يحدث عبر الأغشية المخاطية الأخرى متضمنةً الفموية ويمتص حوالي (1 – 2)% من الجرعة الفموية بهذه الآلية،تصل التراكيز المصلية للفيتامين B12 إلى قيم تقدر بحوالي 200 بيكو غرام حيث أنَّه دون هذه القيمة سوف يكون هناك عوزٌ وقد أظهرت الدراسات أن تركيز الفيتامين B12 المصلي يصل إلى حوالي (200 – 900) بيكو غرام / مل .

2-3-3-1-1- العوامل المؤثرة على امتصاص فيتامين B12:[44]

- أمراض معينة تصيب الأمعاء كداء كراون (التهاب الأمعاء) .

- إزالة القسم اللفائفي من الأمعاء .

- الإسهال المداري وغير المداري .

- عدوى HIV المصحوبة بنقص المناعة المكتسبة (AIDS) .

- سوء الامتصاص التالي للمعالجة الإشعاعية للسرطانات في البطن أو المنطقة الحوضية .

- مواد دوائية كمضادات الحموضة والتي تضم مثبطات مضخة البروتون و خافضات السكر الفموية (Beguanids) المستخدمة بشكل مديد في المعالجة (Extended treatment).

2-3-3-2- النقل البلازمي لفيتامين B12 (Plasma transport of B12):[47]

- يوجد بروتينان أساسيان ناقلان له يتواجدان في البلازما هما الهابتوكريبتين وترانس كوبالامين حيث أن الهابتوكورين عرف سابقاً بناقل الكوبالامين وهو غليكوبروتين له

وزن 150000 دالتون ويختلف العمر النصفي لكل معقد من فيتامين B12 حيث يصل للترانس كوبالامين إلى أقل من ساعتين بينما يصل إلى حوالي 10 أيام للهابتوكورين .

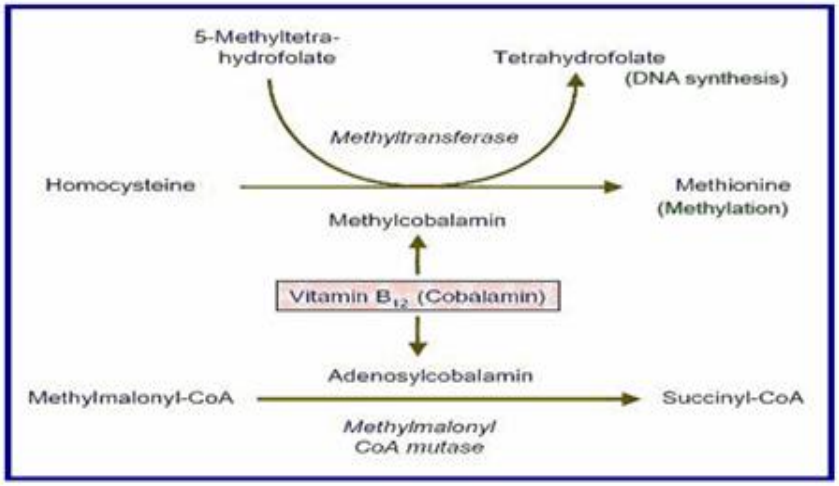
2-3-3-3 اختزانه وإطراحه: يطرح 80-100% من الجرعة الفموية عبر البراز ويخزن في الكبد مرتبطاً مع ناقل الكوبالامين حيث يخزن مقدار 2-5g في الجسم 50% منه في الكبد[45,46]

2-3-4- الوظائف الحيوية لفيتامين B12 (Biological functions of B12):

- هناك نمطين من التفاعلات الكيميائية الحيوية في الجسم تحتاج الشكل التمامي لفيتامين B12 [48,37,36]:

2-3-4-1- تفاعلات تتعلق بتحويل هوموسيستئين إلى ميتيونين بوجود ميتيل كوبالامين .

2-3-4-2- تفاعلات تتعلق بتحويل بروبيونيل كو إنزيم A عبر مركب متيل مالونيل كو A إلى سكسنيل كو A الذي يحتاج ديوكسي أدينوزيل كوبالامين كتمامة له.



الشكل (11): الآلية الحيوية لعمل فيتامين B12 [48]

2-3-5- المصادر التغذوية لفيتامين B12 (Nutritional sources of B12):

يتم الحصول عليه عن طريق الاصطناع البطيء بواسطة العضويات الدقيقة بدائيات النوى فالحيوانات المجترة تحصل عليه من الفلورا الطبيعية المعوية[43] المستوطنة في الجزء الأمامي من المعي أما عند الإنسان فإن المصدر الوحيد للفيتامين B12 هو الطعام ذو المنشأ الحيواني . توجد الكميات المرتفعة من B12 في الكبد والكلية حيث تصل إلى أكثر من 10µg/100g من الوزن الرطب كما أنه يتواجد في المحار والسمك والدجاج والبيض والحليب والتي تحتوي

كميات أقل من B12 حوالي (1-10) µg/100g من الوزن الرطب . تعد الفواكه و الخضروات خالية من الفيتامين B12 إضافةً إلى أنه يتخرب بالحرارة أثناء الطبخ [42,41] .

2-3-6- عوز فيتامين B12 (deficiency of vita B12):[50,51]

تتمثل المظاهر السريرية بحدوث فقر الدم الوبيل (فقر الدم ضخم الأرومات) وهو نقص اصطناع خلايا الدم في نقي العظم ناجم عن خلل اصطناع DNA الذي يمنع انقسام الخلايا وتشكل نوى الكريات الحمر الجديدة مع تراكم الأرومات الضخمة في النقي، وذلك لنقص العامل الداخلي (IF) بسبب قصور خلايا المعدة الجدارية عن إفرازه، أو استئصال المعدة .

مظاهر العوز تتمثل أيضاً بتأثيرات عصبيةٍ تتوضح بإزالة غمد النخاعين لكل من العصبونات المركزية و المحيطية .

يحدث العوز بسبب سوء امتصاص (Malabsorption) الفيتامين أو التناول الغذائي غير الكافي أو بسبب الخمول الكيميائي الناجم عن الغازات المخدرة أو أكسيد النتروزو .

يحدث أيضا العوز عند الأشخاص النباتيين (vegans) الذين يجتنبون تناول الأطعمة الحاوية على اللحوم أو قد يحدث عند أشخاص غير نباتيين لديهم نظام غذائي غير كاف .

تصل نسبة العوز عند كبار السن إلى 40% والناجم بشكل أساسي عن سوء امتصاص الفيتامين بسبب التهاب المعدة المزمن أو ضمورها (atrophy) أو بسبب طبيعة الطعام .

يحدث أيضاً العوز لدى الإصابة بالملتوية البوابية (Helicobacter pylori) التي تتسبب بالتهاب المعدة المزمن (chronic gastritis).

2-3-7- الحاجة اليومية منه DRI: عند الأطفالµg: 1.5 لكل 1kg من وزن الجسم - أما عند البالغين كانوا ذكوراً أم إناثاً: فتقدر الحاجة اليومية منه ب µg 3.0 لكل 2kg من وزن الجسم .قدرت بـ (2-3µg/1kg/day) حسب USA و (1.5µg/day) حسب UK [37,38] .

الفيتامينات الذوابة بالدسم وندرس منها (Fat soluble vitamins):

2-4- فيتامين A (الريتينول):

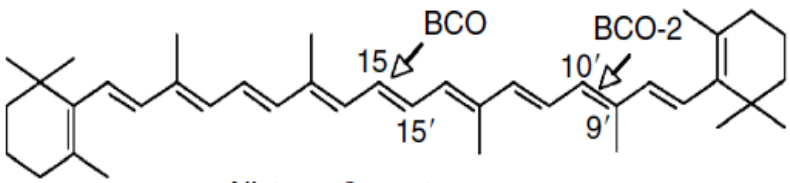
2-4-1- لمحة تاريخية:[52]

اكتشف فيتامين A عام 1900 بواسطة Mc Colum وزملائه في جامعة Wis consin وبشكل مستقل في جامعة Yale في ولاية New Haven بواسطة Mandel و Osborne كلا الفريقين عملا على إجراء دراسة تأثيرات الأنظمة الغذائية من البروتينات النقية و مصادر السكريات كالكازئين و دقيق السكر على الجرذان الفتية الحية حيث لوحظ توقف النمو وموت الحيوان ما لم يتم تدعيم النظام الغذائي بالزبدة أو زيت السمك حيث جرى عزل هذه المواد من الأغذية السابقة ولم تكن معروفة من قبل فقط سميت (fat soluble A) .

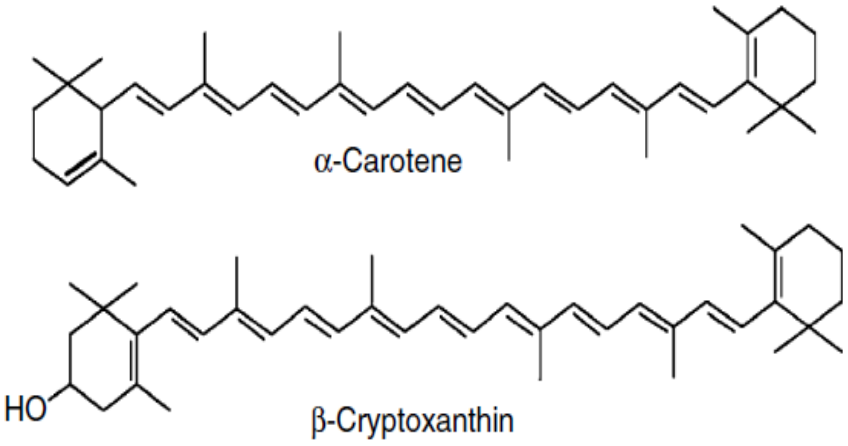
2-4-2- الزمرة (Group): يتبع زمرة كاروتينوئيدات وبالتحديد ريتينوئيدات حيث يتواجد ضمن الأغذية بشكلين الأول هو تواجده بشكل ريتينيل إيستر أو ريتينول والشكل الثاني هو تواجده بشكل كاروتينوئيدات مثل بيتا كاروتين أو ألفا كاروتين أو بيتا كريبتو كزانثين والتي تعزل من البرتقال والخضروات وبعض الفواكه .

حيث أن:

1- طليعة هذا الفيتامين في النباتات هي β كاروتين وهو الصباغ (Dye) ذو اللون الأصفر والمؤلف من جزيئتين من الريتينال .
2- الدور الأساسي لهذا الفيتامين في الجسم يتعلق بمركب يدعى ريتينول وهو موجود بشكلين .



All-*trans*-β-carotene



الشكل (12): صيغ طلائع فيتامين A [60]

نلاحظ أن كاروتينوئيدات هي صف من الهيدروكربونات (كاروتينات) ومشتقاتها المؤكسجة (كزانتوفلين) تتكون من ثماني وحدات إيزوبرينوئيدات ترتبط ببعضها البعض وفق نظام معين ينقلب هذا النظام في مركز الجزيء وكل الكاروتينوئيدات مشتقة من الصيغة ($C_{40}H_{56}$) .

2-4-3- الصيغة والتسمية لفيتامين A (Structure and nomenclatural):[83]

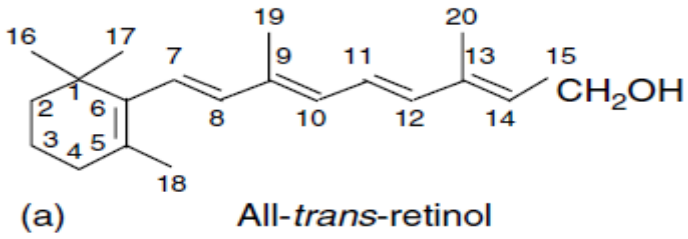
2-4-3-1- التسمية الشائعة: ريتينول (الشكل الغولي) - ريتينال (ألدهيد) كما قد يتواجد بالشكل الحمضي ريتينوئيك أسيد .

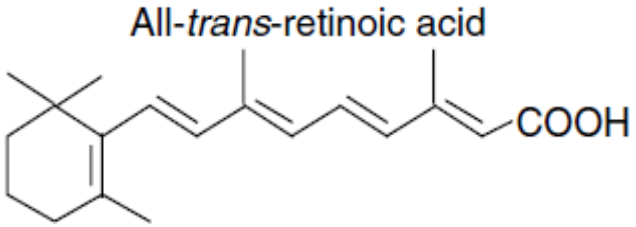
2-4-3-2- التسمية الكيميائية:

3,7- dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1- enyl)nona-2,4,6,8- - tetraen-1-ol

2-4-3-3- الصيغة المجملة: $C_{20}H_{30}O$

2-4-3-4- الصيغة المفصلة:





الشكل (13): صيغ تواجد فيتامين A [60]

نلاحظ أن فيتامين A بكل أشكال تواجده هو عديد إيزوبرين يرتبط بحلقة سيكلوهكسينيل ويعتبر الشكل All-*trans*-retinoic acid هو الشكل الأكثر فعاليةً حيويةً من أشكال فيتامين A .

2-4-4- الخواص الفيزيائية (Physical properties): [83]

2-4-4-1- المظهر (appearance): مسحوق بلوري لونه أصفر شاحب إذا كان بشكل أسيتات أما إذا كان بشكل بروبيونات فله قوام سائل زيتي لونه بني مائل للحمرة أما إذا كان بشكل بالميتات فهو إما أن يكون ذو قوام زيتي أصفر فاتح أو أن يكون بقوام صلب شبيه بالشحم لونه أصفر ساطع ينصهر بدرجة حرارة 26 °C .

حساس جداً لتأثيرات الضوء والهواء والحرارة والحموض والعوامل المؤكسدة بكل أشكاله .

2-4-4-2- درجة انصهار ريتينيل أسيتات (Melting point): 60 °C تقريبا .[83]

2-4-4-3- الذوبانية (solubility): غير ذواب بكل أشكاله عملياً في الماء، ذواب أو ذواب جزئياً في الإيتانول (قليل الذوبان في الإيتانول) ، ذواب في ميتيلين كلورايد .[83]

2-4-5- الحرائك الدوائية لفيتامين A (Pharmacokinetics):

2-4-5-1- النقل والاستقلاب (Transport and metabolism):

يتم نقل كاروتينوئيدات و ريتينيل إيستر بواسطة البروتينات الشحمية [62] أما اختزانها فيكون ضمن الأنسجة الشحمية (80-90)% - (10-20)% في الخلايا الكبدية [64].

أما ريتينول وريتينال وحمض ريتينوئيك فإنها تتواجد ضمن البلازما والخلايا مصحوبة ببروتينات رابطة لريتينوئيد (RBP) حيث أن هذا الارتباط يجعل منها قابلةً للانحلال بالماء ولكن المهم لنا هو ارتباط ريتينول بالبروتين حيث ينتقل ريتينول البلازمي بواسطة بروتين ربط

ريتينول (Rhitinol binding protein) حيث تتشكل هذه البروتينات في الكبد والأنسجة الشحمية (Adipose tissues) وفي الغدد الدمعية (Lachrymal) [63].

أما حمض الريتينوئيك فيجول في البلازما محمَّلاً على الألبومين [63] .

2-4-5-4-2- التوافر الحيوي لفيتامين A (Bioavailability of A):[62]

يمتص بكل أشكاله عبر جدار الأمعاء حيث يعطي توافراً حيوياً لبيتا كاروتين حوالي (9 – 17) % داخل القناة اللمفية – 11% لكاروتينوئيدات – (3 – 22)% لريتينيل إيستر .

2-4-5-4-3- الامتصاص (Absorption):[63,64]

بينت كل الدراسات أنه لابد من تواجد الشحوم الغذائية من أجل امتصاص فيتامين A وطليعته حيث أنّ هذه المواد الشحمية تحرض أنزيم البانكرياتين وتحرض أملاحاً مسهلةً بذلك تشكيل المذيلات الضرورية لامتصاص أشكال فيتامين A وطلائعه حيث يحدث الامتصاص في الخلايا المعوية ويتعزز بواسطة التزويد بالمواد الشحمية في الدقائق الكيلوسية المعوية .

2-4-5-4-3-1- العوامل المؤثرة على امتصاص فيتامين A:[62]

- الأنظمة الغذائية الفقيرة بالشحوم والتي تحتوي أقل من (5 – 10) غ في اليوم .
- حالات مرضية كالتي تسبب الإسهال الدهني (Steatorrhea) .
- وجود أذيات معوية .

2-4-5-4- التخزين (Storage): يختزن هذا الفيتامين ضمن الخلايا النجمية في الكبد ويختلف الاختزان حسب العمر حيث تصل النسبة المختزنة منه حتى 50% حيث [64,63] يصل

إلى 4µg/g عند حديثي الولادة ليصل إلى 83µg/g عند الأطفال (2 – 9) سنوات لتصل إلى 89µg/g عند البالغين .

يختزن فيتامين A في النسيج الشحمي أيضاً على شكل مؤستر حيث تتشكل رابطة إسترية بين نهايات السلسلة الجانبية للفيتامين مع حمض البالميتيك ويشكل إستر ريتينيل بالميتات الذي يختلط بالدقائق الكيلوسية وتحت تأثير ليباز البروتين الشحمي في البلازما تتحول الإسترات إلى ريتينول الذي يرتبط ببروتين ربط ريتينول RBP [63]حيث يحميه هذا الارتباط من الأكسدة إلى حمض ريتينوئيك .

2-4-5-5- الإطراح (Elimination):

الجرعة الممتصة من فيتامين A والكاروتينوئيدات اليومية المقدرة بحوالي (5%- 20%) ،(20%) منها تتأكسد وتطرح في الصفراء عن طريق البراز و 17%منها تطرح بولياً [62] .

2-4-6- آلية تشكل فيتامين A في الجسم (Mechanism product of A):

يخضع بيتا كاروتين الممثل لطليعة فيتامين A في الجسم لأكسدة في الخلايا المخاطية المعوية بفعل بيتا كاروتين دي أوكسيجيناز وبوجود الأوكسجين و الأملاح الصفراوية أو الحموض الصفراوية معطياً جزيئتين من فيتامين A (ريتينال) وهو الشكل الألدهيدي للفيتامين A الذي يخضع للأكسدة مرة أخرى بفعل NAD – FAD معطياً حمض الريتينوئيك،كذلك يمكن أن يرجع ريتينال إلى ريتينول بفعل أنزيمات ريدكتاز [59,60] .

2-4-7- الوظائف الحيوية لفيتامين A (Biological functions of A):

1- له دور في عملية الإبصار [56,57] :

الخلايا العصوية الموجودة في محيط شبكية العين تحوي في طبقتها الخارجية على رودوبسين المؤلف من قسمين الأول بروتيني هو أوبسين والثاني مشتق من ريتينال وهو عبارة عن الفيتامين المقرون .

- تعد العصيات مسؤولة عن الرؤية الظلامية .

2- يسهم في صيانة الخلايا الظهارية من خلال قيامه تحت شكل ريتينول بعملية اصطناع البروتينات السكرية خاصة المخاطية فيحمي بذلك الخلايا والنسيج من الجفاف والأذى [58].

3- له دور مضاد أكسدة بالإضافة لدوره في تمايز الخلايا الظهارية ومسؤولٌ عن إعادة النمو وهذا الدور عائدٌ للشكل All-*trans*-retinoic acid كما أن له دوراً هاماً في الحماية من المواد المسرطنة المولدة للطفرات ، حيث تتلخص آلية الحماية بأن هذا الفيتامين وخاصة طليعة بيتا كاروتين تلتقط الجذور الحرة عبر السلاسل الجانبية كما أن لهذا الفيتامين وظائفاً مشابهة لوظائف الهرمونات الستيروئيدية حيث ينتقل ريتينول من الدم إلى الخلايا المستهدفة وكما ذكر فهو يرتبط ببروتين ناقل RBP فعند الوصول إلى سطح الخلية الهدف حيث توجد مستقبلات نوعيةٌ لهذا الناقل يدخل ريتينول دون البروتين إلى السيتوبلازما ثم يدخل النواة ويؤثر على DNA [58] .

- يعبر عن الفعالية الحيوية لفيتامين A في النظام الغذائي بالمكافئ أكثر من الوحدات الكتلية حيث يتعلق المكافئ بالشكل: All-trans-retinol حيث اقترحت منظمة الصحة العالمية WHO ومنظمة الغذاء العالمية FAO استبدال الوحدة الدولية كوحدة لفعالية فيتامين A الحيوية بمكافئ الريتينول (RE) حيث أن(1RE) يعبرعن 1µg All-trans-retino أو 6µg من بيتا كاروتين في الطعام أو 2µg بيتا كاروتين منحل بالزيت أما دراسة 2001 US Institute of Medicine اقترحت وحدة جديدة هي (RAE) حيث 1REA تعادل 1µg ريتينول ، 12µgبيتا كاروتين طعامي ، 1.2µg منحل في الزيت [53] .

2-4-8- عوز فيتامين A (deficiency of vita A):[61]

- خلل في الرؤيا وخاصة الظلامية مسبباً ما يدعى العشي الليلي وهو أول الأدلة على وجود عوز لهذا الفيتامين .
- استنزافه في الكبد يؤدي لخلل في تشكل البروتينات السكرية المخاطية وتظهر حالة من التقرن والتجفاف في الملتحمة (Exophthalmia).
- تقرن في البراعم الذوقية وبالتالي فقدان في الشهية .
- شذوذات في الهيكل العظمي لأن عديدات السكريد المخاطية ضروريةٌ لنمو غضاريف العظام .
- حؤول حرشفي (squamus metaplasia) في الأنسجة المخاطية والظهارية .

2-4-9- الحاجة اليومية من فيتامين A (DRI):[54]

تقدر الحاجة اليومية من فيتامين A عند حديثي الولادة بـ (400µg / day)، وعند الأطفال من عمر (1 – 3) سنوات تقدر الحاجة اليومية بـ 300µg/day، ومن (3 – 9) سنوات 400µg/day .

(9 – 13) سنة 600µg/day، وفوق 13 سنة 700µg/day عند النساء الحوامل تقدر الحاجة اليومية بحوالي (750 – 770) µg/day، أما في حالة الإرضاع فتقدر الحاجة اليومية منه بـ (1200 – 1300) µg/day .

2-4-10- المصادر الغذائية لفيتامين A (Food sources of vita A):[55]

- الكبد (4 – 20) ملغ ريتينول / 100غ
- الأطعمة المقوية مثل مساحيق المشروبات المتناولة مع الإفطار (3 – 6) ملغ / 100غ .

- الحبوب الجاهزة للأكل (0.7 – 1.5) ملغ / 100غ .
- ولكن أعلى نسبة من طليعة الفيتامين A تتواجد في الجزر، والبطاطا الحلوة، واليقطين واللفت، والسبانخ، (5 – 10) ملغ / 100غ .

2-5- فيتامين E (α توكوفيرول):

يدعى بالفيتامين (و) أو (هـ) وهو من عائلة مركبات تدعى التوكوفيرولات .

2-5-1- لمحة تاريخية:[65,66]

عزل هذا الفيتامين عام 1922 من قبل Evans and Katharine Herbert McLean Scott Bishop من رشيم القمح أو من بذور القمح المنتشة (Evans) وسمي هذا العامل بألفا توكوفيرول وهو اسم مشتق من اليونانية (Tokos) عزل منه أيضاً بيتا توكوفيرول وغاما توكوفيرول إلا أن ألفا توكوفيرول هو الأكثر أهميةً من الناحية الحيوية، Glady Anderson Emerson 1935 أول من عزله بشكل نقي في جامعة كاليفورنيا .

2-5-2- التسمية والصيغة (Structure and nomenclatural):[82,83]

2-5-2-1- التسمية الكيميائية: 2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4*R*,8*R*)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydro-2*H*-1-benzopyran-6-ol

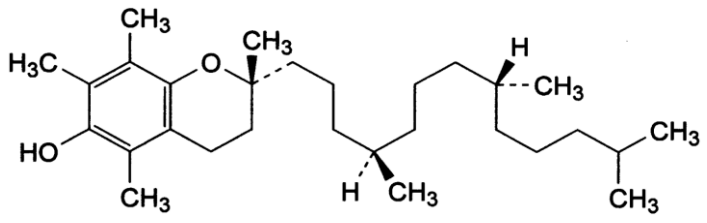
2-5-2-2- التسمية الشائعة: ألفا توكوفيرول أو فيتامين E.

2-5-2-3 الصيغة المجملة:

2-5-2-3-1- الصيغة المجملة لألفا توكوفيرول: $C_{29}H_{50}O_2$.

2-5-2-3-2- الصيغة المجملة له بشكل أسيتات: $C_{31}H_{52}O_3$ ويسمى ألفا توكوفيريل

2-5-2-4- الصيغة المفصلة:



الشكل (14): صيغة فيتامين E(α توكوفيرول) [83]

نلاحظ أن التوكوفيرولات (Tochopherols) مكونة من مركبات تدعى 6- هيدروكسي كرومانات مستبدلة الإيزوبرينوئيد (جملة حلقتين سداسيتين ترتبط بهما بعض الزمر الميتيلية بالإضافة لسلسلة جانبية هي نفسها سلسلة الإيزوبرينوئيد للفيتامين k) .

تختلف التوكوفيرولات عن بعضها البعض بعدد الزمر الميتيلية الجانبية وأشهرها ألفا توكوفيرول الحاوي على ثلاث زمر ميتيل في المواقع 5 ، 7 ، 8 أما بيتا وغاما فتحوي على دي ميتيل ودلتا يحوي على مونو متيل[67] .

2-5-3- الخواص الفيزيائية (Physical properties):[82,84,83]

2-5-3-1- المظهر(Appearance): سائل زيتي لزج لونه بني مصفر أو عديم اللون[82]

2-5-3-2- الذوبانية (Solubility): غير ذواب عملياً في الماء يذوب بحرية في الأسيتون والإيتانول اللامائي و الميتانول و في كلوريد الميتيلن وفي الزيوت الدسمة .[83]

يعطي قمة امتصاص أعظمي عند طول موجة 284nm [84]

2-5-4- الحرائك الدوائية لفيتامينE (Pharmacokinetics):

2-5-4-1- الامتصاص (Absorption):[79,80]

- يتم الامتصاص من لمعة المعي حيث يلعب البانكرياتين إيستراز دوراً هاماً لتحرير الحموض الدسمة من التري غليسيريد الغذائية كما أن هذا الأنزيم ضروريٌّ للحلمهة الانشطارية لإيسترات التوكوفيرول الموجودة في الأنظمة الغذائية .
- تعد كل من الحموض الدسمة الحرة و الحموض الصفراوية و وحيدات الغليسيريد مركباتٍ هامةً لتشكيل المذيلات .
- العمر النصفي لفيتامين E درس بالوسم المشع بالديتيريوم حيث بينت الدراسة أن العمر النصفي (Half life) لألفا توكوفيرول 57 ± 19 ساعة .

2-5-4-2- الاستقلاب (Metabolism):[81]

يملك مستقلباتٍ عديدةٍ مثل ألفا توكوترينولز 2,5,7,8 تيترا ميتيل – 2 (2 – كربوكسي إيتيل – 6 هيدروكسي كرومان) .

كما يظهر فيتامين E مستقلباً مماثلاً لكسينوبيوتيك التي تكون متواجدة في الأوميغا المؤكسدة بواسطة Cp450، يستقلب ألفا توكوفيرول بسرعة (9 – 12) ساعة في الجسم .

2-5-4-3- الإطراح (Elimination):

ترتبط المستقلبات وتطرح في البول أو الصفراء (Bile)[81] حيث أن الطرح الأكبر له يتم عن طريق البراز فالطرح الكبدي له من خلال الصفراء متواسط ب transporter ABC .

2-5-4-4- النقل (Transport):[80,79]

ينتقل مع الدقائق الكيلوسية التي توزعه لمختلف أنحاء الجسم والتي تحتوي ليباز البروتين الشحمي ومن ثم إلى الكبد ومن ثم تنتقل من الكبد وتختزن في النسيج الشحمي بواسطة VLDL.

2-5-5- الوظائف الحيوية لفيتامين E (Biological functions of vita E):

- أهم مضاد أكسدةٍ في الجسم (Antioxidant) [70] .
- يحمي المواد الدسمة من الأكسدة [74] .
- يحمي الأغشية الخلوية من الأكسدة [74] .
- يدخر في النسيج الشحمي والبروتينات الشحمية ويحول الجذور الحرة إلى مواد غير مؤذيةٍ للمادة الحية يتطلب عمله وجود الفيتامين C لأن الفيتامين E عندما يتفاعل مع الجذور الحرة(free radical) يتأكسد ويصبح غير مفيد فيعيده الفيتامين C للشكل الفعال وهذا ما يسمى التآزر(synergism) بين الفيتامينات - يحسن المناعة ويقي من السرطانات[72] .
- يثبط ألفا توكوفيرول بروتين كيناز (PCK)[73] وبالتالي يثبط انقسام الخلية العضلية الملساء ويثبط تكدس الصفيحات والتصاقها [73]كما يقلل من إنتاج الإنترلوكين B1 عن طريق تثبيط 5 – ليبوأكسجيناز كما أنه يقلل إنتاج السيتوكينات (Cytokines) السابقة للالتهاب و الكيموكينات (إنترلوكين 8 وبلازمينوجن) [73] .
- كما أنه يقلل من البروتين المنشط C لدى المرضى الذين لديهم خطر أمراضٍ قلبيةٍ وعائيةٍ (دراسة سريرية عام 2007)[75] .

2-5-6- فعالية الجرعات (Efficacy of dosages):

بينت الدراسات أن جرعة مقدرة بحوالي 600IU/day تقلل خطر الموت بالأمراض القلبية الوعائية (Heart vascular) بنسبة 24% وعند النساء فوق 65 سنة بنسبة 49% .

المعالجة بمضادات الأكسدة تبطئ تطور التصلب العصيدي (Atherosclerotic) في البطانة لكل من الشريان التاجي (coronary) والسباتي (carotid) في حالات فرط كولسترول الدم كما أن الدراسات بينت أن له دور في إنقاص خطر الأمراض القلبية الوعائية والتصلب العصيدي[75] .

- بينت دراسة حديثة عام 2013 أن 613 شخصاً لديهم تطوراً لطيفاً للزهايمر عند إعطائهم جرعات من الفيتامين E IU/day(400 – 500) كان ذلك مقروناً بإنقاص اختطار تقدم حالة الإصابة بالزهايمر[67].

2-5-7- عوز فيتامين E (deficiency of vita E): يحدث بسبب سوء امتصاص الدسم (fat malabsorption) كما قد يحدث العوز بسبب:

2-5-7-1- عيوبٍ جينيةٍ (Genetic defects) في اصطناع الليبوبروتين وينجم عنه:

- ارتشافٌ جنينيّ (fetal resorption) .
- حثلٌ عضليّ (muscular dystrophy)[77] .
- تلينٌ في الدماغ (Encephalomalcia)[78] .

2-5-8- مصادر فيتامين E الطعامية (Food sources of vita E):[76]

- الزيوت النباتية الصالحة للأكل حيث يحتوي زيت عباد الشمس وزيت فول الصويا وزيت الذرة على غامّا توكوفيرول كما أنَّ زيت النخيل وزيت بذور القطن يحتوي على ألفا وغاما توكوفيرول بنسبٍ متساويةٍ .
- رشيم القمح .
- العصفر .

2-5-9- الحاجة اليومية منه DRI: [69]

- RDA من الفيتامين E هي للذكور 15 وحدة دولية وللنساء 12 وحدة دولية في اليوم،ترتفع حتى 19 وحدةً دولية في اليوم في حالات الحمل والإرضاع .

الفصل الثاني

التحليل الطيفي الضوئي الاشتقاقي

(Derivative Spectrophotometery)

1- مقدمة عن التحليل الطيفي الضوئي

1-1 آلية التحليل الطيفي

1-2 طرائق تفسير الطيف المعقد

1-3 الطرائق الحديثة في تفسير الطيف المعقد

2- الاشتقاق (Derivative)

2-1 لمحة تاريخية عن الاشتقاق

2-2 الاشتقاق والطيف الاشتقاقي

2-3 معالم الطيف المحلل

2-4 التحليل الطيفي الاشتقاقي

2-5 قيمة (Amax) للعصابة التحليلية

2-6 تداخل الإشارات

2-7 فقد المعلومات يقود إلى زيادة الفصل

2-8 الطيف الحقيقي والضجيج

2-9 طرائق تقييم الطيف الاشتقاقي

2-10 تقييم مساحة القمة المدروسة و التحديد الكمي في التحليل الطيفي الاشتقاقي

1- مقدمة عن التحليل الطيفي الضوئي (Analytical spectrophotometric):

يعد التحليل الطيفي الضوئي واحداً من الطرق الفيزيائية المهمة في التحليل وهو أقدم هذه الطرق اعتُمِد فيه على تقسيم المجال الطيفي في UV و VISIBLE إلى 3 مناطق أساسية هي: [87,1]

- منطقة طيف الأشعة فوق البنفسجية القريبة: (10 ⟵ 200) nm.
- منطقة طيف الأشعة فوق البنفسجية البعيدة: (200 ⟵ 380) nm.
- منطقة الطيف المرئي visible: (380 ⟵ 780) nm.
- منطقة الطيف القريب جداً من الأشعة تحت الحمراء وهي (very near IR) ومجالها (700⟵1100)nm .

هذا التقسيم قاد إلى عملية البحث في التحليل الطيفي من أجل دراسة المواد الكيميائية والدوائية وتحديدها كمياً و كيفياً .

- فمن الناحية الكمية: اعتمد على طريقة الامتصاصية المئوية $A_{1\mathrm{cm}}^{1\%}$ أو على قانون لامبيرت - بيير حيث يتم تحديد التركيز للمادة المدروسة بتحديد الامتصاصية لها عبر الأجهزة المستخدمة في التحليل الطيفي وبتطبيق العلاقة المحددة للنفاذية وهي العلاقة الأساسية في التحليل الطيفي:[87]

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$A = -logT$$

$$A = \varepsilon . l . c$$

حيث I: هي شدة الشعاع الضوئي الخارج من العينة المحللة .

I_0 :هي شدة الشعاع الضوئي الوارد إلى العينة المحللة .

ε: هو عامل الامتصاص المولي والذي يختلف من مادة لأخرى .

C: التركيز ويحسب من العلاقة الأخيرة المحددة لقانون لامبيرت - بيير.

- أما من الناحية الكيفية: فيتم تحديد المادة المدروسة عن طريق تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي لهذه المادة بإجراء مسحٍ لها ضمن مجالٍ محدد .

ومن ثم العمل على مقارنة λ_{max} التي حصلنا عليها مع λ_{max} لمادة معيارية موجودة في مكتبة الكترونية على الحواسيب تحتوي على قيم λ_{max} لموادٍ معيارية .

أما بالنسبة لمجال الأشعة تحت الحمراء (IR) فهو الأكثر أهميةً في التحديد الكيفي أو ما يعرف بالاستعراف حيث أن لكل مادةٍ محللةٍ طيفياً في مجال IR طيفٌ محددٌ يعرف باسم finger print (بصمة الإصبع) .

لذا عندما نريد تحديد هوية مادة نعمل على مسح طيف IR لها ومقارنة عصابة الامتصاص الناتجة مع عصابات الامتصاص لأطياف المواد المعيارية الموجودة ضمن مكتبة إلكترونية.

1-1- آلية التحليل الطيفي (mechanism of spectrophotometric analysis):[87,1]

يعتمد مبدأ عمل أجهزة التحليل الطيفي في المجالين (المرئي وفوق البنفسجي UV) على إصدار فوتوناتٍ عبر منبعٍ ضوئيٍّ تحمل طاقةً معينةً عندما تصل إلى العينة المحللة فإنها تعمل على تحفيز الالكترونات السطحية لذرات الجزيئات الموجودة ضمن الحليلة .

يؤدي تحفيز هذه الالكترونات لانتقالها من سويةٍ طاقيةٍ أدنى إلى سويةٍ طاقيةٍ أعلى وينتج عن هذا الانتقال عصابة امتصاص عند طول موجةٍ معينٍ أكثر تمييزاً للاختلافات في مستويات الطاقة للأجزاء الممتصة وهذا صحيحٌ بالنسبة للذرات أما:

1-1-1- الجزيئات المحرضة بالفوتونات تملك 3 أنماطٍ طاقيةٍ هي:[87,1]

الطاقة الإلكترونية – الطاقة الاهتزازية – الطاقة الدورانية. إن حدوث تعديل في الطاقة الإلكترونية للجزيء نتيجة امتصاص الطاقة الناجمة عن الفوتونات التي تعرض لها يؤدي لحدوث تبدل في الطاقتين الدورانية والاهتزازية لهذا الجزيء:

حيث أنّ الطاقة الميكانيكية الحركية هي $E_{total} = E_{elc} + E_{vib} + E_{rot}$

$$E_{elc} > E_{vib} > E_{rot}$$

- تختلف الجزيئات الموجودة في العينة المحللة عن بعضها من حيث الطاقة اللازمة للتحفيز وذلك لأن هذه الجزيئات تحتوي أنماطاً مختلفةً من الروابط فالجزيئات التي تحتوي على رواب σ تحتاج إلى طاقةٍ أعلى من تلك التي تحتوي على روابط π لتحفيزها[1].

1-2-1- تفسير آلية التحليل الطيفي (explanation mechanism of spectro analysis):[87]

- جرى تفسير آلية التحليل الطيفي بواسطة ميكانيك الكم $hv = E1 - E0 = h.c/\lambda$

نلاحظ أن الأشعة الضوئية (الفوتونات) التي لها طولٌ موجيٌّ قصيرٌ تملك طاقةً عاليةً أما التي لها طولٌ موجيٌّ كبيرٌ فهي تملك طاقةً منخفضةً، وهذا هامٌّ لتحديد المجال المستخدم للتحليل فالأشعة فوق البنفسجية تملك أطوالاً موجيةً قصيرةً، وبالتالي لها طاقةٌ عاليةٌ أما في المجال المرئي نلاحظ أن الضوء المستخدم له طول موجةٍ عالٍ أي يملك طاقةً منخفضة .

- في التحليل الطيفي في المجالين (UV) و(visible) اعتمد على تحليل عيناتٍ وحيدة المادة وهذا التحليل سهلٌ ولكن في بعض الحالات تحدث مشاكل أثناء إجراء المسح الطيفي في المجالين UV – visible كأن تظهر قمةٌ غير واضحة المعالم أو أن تظهر قمةٌ متداخلةٌ مع مادةٍ أخرى قد تكون سواغ أو محل وفي هذه الحالة لا يمكن أن يظهر λ_{max} للقمة المدروسة وكذلك لا يمكن تحديد A_{max} لها لذا لن يكون من السهل تحديدها كيفياً وكمياً.

كذلك الحال عندما يكون هنالك أكثر من مادةٍ محللةٍ في العينة يحدث تداخل لقمم هذه المواد فيصبح من الصعب تحديدها كمياً وكيفياً لذا كان لابد من إيجاد تقنيةٍ جديدةٍ تمكننا من حل هذه المشاكل والصعوبات التي واجهت عملية التحليل الطيفي وبعد دراساتٍ عديدة ظهرت طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

- قبل أن تظهر طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي كانت هناك عدة طرق تحليلية طيفية لحل مشكلة الطيف المعقد وهي:

2-1- الطرق القديمة في تفسير الطيف المعقد:(old methods that explain complex spectrum)

1-2-1- الطرق الضوئية (البصرية):(Optical methods)[1]

اعتمدت هذه الطرق بشكل أساسي على شق مستوحد اللون معتبرةً أنه المحدد لعرض العصابة الطيفية لمصدر الضوء وبالتالي فإن تصغير الشق يؤدي لزيادة خطية الفصل الطيفي والعكس صحيح ولكن ذلك يترافق بتناقص طاقة الضوء ومن مساوئها أنها تعطي مشتق رتبة أولى فقط .

1-3- الطرق الحديثة أو الحاسوبية (computation methods) وتتضمن:[94]

1-3-1 التحليل متعدد المكونات الرقمي (Numerical Multicomponent Analysis):

يفترض وجود ثلاث قممٍ تحليليةٍ متراكبةٍ فوق بعضها البعض وطيف امتصاص معياري لكل مادةٍ من المواد المتداخلة بشكلها النقي معروفاً وبالتالي بتطبيق قانون لامبيرت- بيير يتم حساب قيمة الامتصاصية لأي طولٍ موجيّ لكل مركبٍ مفرد .

التعبير الرياضي:[95]

بشكل عملي هناك طريقتان شائعتان لتحليل المركبات متعددة المكونات:

1- عدد الأطوال الموجية المقيسة وعدد المعادلات المستخدمة مساوٍ لعدد المواد المحللة .
2- عدد الأطوال الموجية المقيسة وعدد المعادلات المستخدمة يزيد على عدد المواد المحللة

وفي كلا الحالتين يمكن الحصول على نتائج مضبوطةٍ عندما يتم اختيار أفضل قياس .

1-3-2- تحليل فوريير(Fourier Analysis):[97,96]

استخدمت هذه التقنية كبديلٍ عن الطريقة الرقمية لحل الإشارات المعقدة للعينات المحللة وهي بصورةٍ عامةٍ تعتمد على حساب النسب المثلثية للإشارات المولدة التجريبية وفق المعادلات:

$$f(x) = a0 \sum_{n=1}^{\infty} (an \cos nx + bn \sin nx)$$

تحسب معامل فوريير a,b بالعلاقة:

$$an = \frac{1}{m} \sum_{i=0}^{2m-1} Yi \cos \frac{ni}{m} : n = 1,2 \dots m$$

$$bn = \frac{1}{m} \sum_{i=0}^{2m-1} Yi \sin \frac{ni}{m} : n = 1,2 \dots m-1$$

ولكن هذه الحسابات المثلثية تتطلب عدد هائل من البيانات ليتم حسابها .

1-3-3- الاشتقاق (Derivatization):

وهو موضوع بحثنا.

2- الاشتقاق (Derivatization):

2-1- لمحة تاريخية عن التحليل الطيفيّ الضوئيّ الاشتقاقيّ:

- بدأ العمل بهذه التقنية منذ عام 1953 من قبل العالمين سينغلتون وكولير عندما قاما بتصنيع أول جهاز للتحليل الطيفي الاشتقاقي.[88]

- في نفس العام قام العالم موريسون بإجراء دراسات على جهاز تحليل طيفي اشتقاقي واستطاع تحديد المشتق الأول والثاني.[90]

- في العام 1968 كانت نقلة نوعية في مجال التحليل الطيفي الاشتقاقي حيث استطاع موري تصنيع جهاز للتحليل الطيفي الاشتقاقي مزود ببرنامج حاسوبي يعطي المشتق ممن الرتبة 1 وحتى الرتبة 4، ويبين أن المشتقات في الرتب الأعلى تعطي فصلاً أوضح للقمم .[92]

- عام 1978 كان العام الأكثر أهميةً في ما يتعلق بمجال التحليل الطيفي الاشتقاقي فقد جرى تصميم جهاز تحليلٍ طيفيٍّ اشتقاقيٍّ مزودٍ ببرامج تعطي المشتق من الرتبة 1 ⟵ 9 ، حيث استخدم بوتلير طريقةً حاسوبيةً رقميةً تعطي قيم مخططاتٍ اشتقاقيةٍ لكل من المشتق السادس والثامن .

- أما ساساكي فقد قام باستخدام الطريقة الرقمية لدراسة مخطط الطيف الاشتقاقي المركب حتى الرتبة الثالثة عشر.[91]

ومن الملاحظ أنه في الأعوام الأخيرة فقد تطورت أجهزة التحليل الطيفي الضوئي الاشتقاقي بشكلٍ كبيرٍ جداً وفي الوقت الحالي أصبحت هذه الأجهزة التجارية مزودةً على الأقل بنظام الاشتقاق من الرتبة الثانية ولكن معظمها تصل حتى الرتبة الرابعة وبعضها يعطي حتى الرتبة السادسة والبعض الآخر وصل حتى الرتبة التاسعة وهذا جعل بالإمكان تطبيق هذه التقنية ليس فقط في الأبحاث المختبرية و إنما أيضاً في العمليات التحليلية اليومية[98] .

- بصورة عامة تعتمد هذه التقنية على اشتقاقات متعددة للإشارات الكهربائية وهي طريقة مثلى لحل الطيف المعقد النهائي وإزالة التداخل غير المرغوب به .

2-2- الاشتقاق والطيف الاشتقاقي (Derivatization and Derivative spectrum):

تعتمد هذه الطريقة بشكلٍ أساسيٍّ على اشتقاقٍ للمنحني الأساسي الممثل لطيف المادة المدروسة وذلك من خلال تحديد الميل على كامل مسار المنحني الطيفي بنفس الطريقة من أجل تسهيل

عملية اشتقاق الطيف الضوئي [98,1]، في التحليل الطيفي بصورةٍ عامة تكون القيمة المقيسة هي معدل شدة الضوء بعد خروجه من العينة إلى شدة الضوء الداخل للعينة .

$$T = I/I_0$$

حيث I: هي شدة الشعاع الضوئي الخارج من العينة المحللة .

I_0 :هي شدة الشعاع الضوئي الوارد إلى العينة المحللة .

ومن الملاحظ أن النقص الحاصل في شدة الضوء النافذ عبر العينة المتجانسة الشفافة ليس خطياً

تحدد العلاقة بين I, C لكل عينةٍ منحلةٍ شفافةٍ متجانسةٍ أو صلبةٍ بالمعادلة:

$$\frac{I_\lambda}{I_{0\lambda}} = e^{-cl\varepsilon_\lambda} = T_\lambda$$

بأخذ اللوغاريتم الطبيعي للمعادلة:

$$lnI_\lambda - lnI_{0\lambda} = -cl\varepsilon_\lambda$$

باشتقاق المعادلة [98,87]من الرتبة الأولى وبما أن I_0 ثابتة عادة نجد أن:

$$\frac{\mathrm{dlnI}}{\mathrm{d}\lambda} = -\frac{cld\varepsilon}{d\lambda}$$

$$\frac{dlnI}{d\lambda} = \frac{dI}{d\lambda}.\frac{1}{I}$$

$$\frac{dI}{d\lambda}.\frac{1}{I} = -cl\frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

نلاحظ أن المشتق من الرتبة الأولى متناسب مع التركيز في كل طول موجي .

الرتبة الثانية: [98,87]

$$\frac{d^2I}{d\lambda^2}.\frac{1}{I} = c^2l^2(d\varepsilon/d\lambda)^2 - cl\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}$$

يكون أيضاً المشتق من الرتبة الثانية متناسباً بشكلٍ مباشرٍ مع التركيز وبشكلٍ آخرٍ ليس هناك علاقة خطية موجودة .

وكذلك الأمر بالنسبة للمشتق من الرتبة الثالثة:[98,87]

$$\frac{d^3I}{d\lambda^3}\cdot\frac{1}{I} = -cd\,\frac{d^3\varepsilon}{d\lambda^3} + 3\,c^3d^2\,\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2} - c^3d^3\left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^3$$

يكون مشتق الرتبة الثالثة متناسباً مع التركيز خطياً عندما تكون القيمة $\frac{d\varepsilon}{d\lambda}$ مساويةً للصفر .

وكذلك الأمر بالنسبة للمشتق الرابع:[98,87]

$$\frac{d^4I}{d\lambda^4}\cdot\frac{1}{I} = -cd\,\frac{d^4\varepsilon}{d\lambda^4} + 4\,c^2d^2\left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)\frac{d^3\varepsilon}{d\lambda^3} + 3\,c^2d^2\,\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2} - 6c^3d^3\,\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}(d\varepsilon/d\lambda)^2 + c^4d^4\left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^4$$

يكون مشتق الرتبة الرابعة متناسباً مع التركيز خطياً عندما $\frac{d\varepsilon}{d\lambda}$ و $\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}$ تساوي للصفر .

لهذا السبب لوحظ أنه في التحليل الطيفي الاشتقاقي نادراً ما يستخدم الاشتقاق بالنسبة للنفاذية بالرغم من إمكانية قياس النفاذية مباشرةً في التحليل الطيفي الضوئي .

بالنسبة للتحديدات الكمية الأخرى كالامتصاص A، $logA$، أوالتركيز C تكون مشتقة كمياً وتحسب من العلاقة الأساسية للنفاذية [98]:

$$\mathrm{A} = \log\frac{\mathrm{I}_0}{\mathrm{I}}$$

$$A = log\ 1/T$$

$$A = l\,c\,\varepsilon^-$$

حيث أن ε: معامل الامتصاص المولي

$$\varepsilon^- = \varepsilon / 2.303$$

وبالتالي فإن المشتق من الرتبة الأولى:

$$dA/d\lambda = cl\, d\varepsilon^{-}/d\lambda$$

مشتق الرتبة الثانية:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = cl\ \frac{d^2\varepsilon^{-}}{d\lambda^2}$$

وبالنسبة للمشتق من الرتبة n: [87]

$$\frac{d^nA}{d\lambda^{\mathrm{n}}} = cl\ \frac{d^n\varepsilon^{-}}{d\lambda^{\mathrm{n}}}$$

من الملاحظ أنه في كل الحالات يكون الاشتقاق بالنسبة للامتصاصية متناسباً خطياً مع التركيز وهذه ميزةٌ هامةٌ جداً في الطرق الحاسوبية للتحليل الطيفي الاشتقاقي .

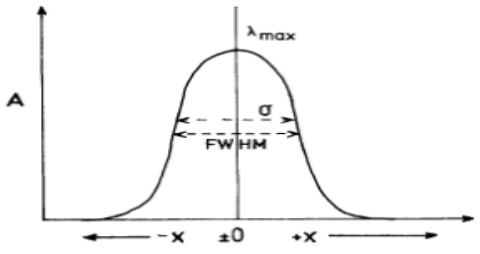
3-2- معالم الطيف الضوئي المحلل (Parameters of analytical spectrum):

هناك معالم لطيف الامتصاص الناتج عند تحليل مادة ما لابد من معرفتها وتشمل:

1- $FWHM$ (full width on half spectrum): عرض عصابة الامتصاص في منتصف القمة الظاهرة.

2- σ: عرض عصابة الامتصاص عند نقطتي الالتواء وهما النقطتان اللتان تقعان فوق النقطتين المحددتين للعرض عند المنتصف .

بالنسبة للعصابات التحليلية المحددة تناظرياً يكون هناك تناظر بين طرفي العصابة التحليلية اليميني واليساري .[98]



الشكل (15): معالم أساسية في الطيف الضوئي [98]

تحدد قيمة نقطة الالتواء بالعلاقة:

$$X\sigma = \sqrt{1/2c}$$

تحدد قيمة نقطة العرض عند منتصف الطيف المدروس بالعلاقة:

$$Xfwhm = \sqrt{ln2/c}$$

تحدد قيمة $Cfwhm$ بالعلاقة: $Cfwhm = 4ln2/Xfwhm$

تحدد قيمة $C\sigma$ بالعلاقة : $C\sigma = 2/\sigma^2$

من الملاحظ دوما أن : $Xfwhm > X\sigma$

في القمم المتناظرة يكون:

$$C\sigma = 0.5\sigma$$

$$Cfwhm = 0.5fwhm$$

نستنتج من ذلك أن:

$$Xfwhm/X\sigma = \sqrt{2ln2}=1.177$$

4-2- التحليل الطيفي الاشتقاقي (Derivative spectroscopy):[87,1]

المبدأ: يعتمد التحليل الطيفي الاشتقاقي على حساباتٍ معينةٍ بواسطة معالجةٍ رياضيٍّةٍ للأطياف الناجمة عن الرتبة صفر وتكون هذه المعالجة الرياضية عبارة عن عملية تفاضل لمعادلة كثير الحدود المعبرة عن عصابة امتصاص الرتبة صفر بصورةٍ أساسيةٍ ويتم اللجوء إليه عندما [86,85]:

1- تكون عصابة امتصاص المادة المحللة غير ظاهرةٍ بوضوح في العصابة الطيفية الامتصاصية الممثلة لكامل المزيج (مكونات كامل المزيج) .
2- أو عندما تملك المركبات الموجودة في العينة المحللة من مواد فعالةٍ أو سواغاتٍ أطياف امتصاصٍ متقاربةٍ جداً لا تنفصل عن بعضها في طيف الرتبة صفر أو تتداخل مع بعضها البعض بشكلٍ كبيرٍ فلا تظهر المواد المحللة مفصولة عن بعضها.

3- أو عندما تكون العينة المحللة محتويةً على مادةٍ وحيدةٍ فعالةٍ ولكن مخطط طيف امتصاص هذه المادة يظهر وجود كتف للعصابة الامتصاصية يجعل من الصعب تحديد هذه المادة بشكل كميٍّ من المخطط الطيفي في الرتبة صفر .

2-4-1- ميزات الطريقة الطيفية الاشتقاقية في التحليل (Advantages):[4]

1- استخدامها في مجال التحليل متعدد المكونات .

2- أسهمت في اتساع مجال تطبيقات التحليل الطيفي لتشمل العديد من المجالات التحليلية خاصة الأشكال الصيدلانية والتحاليل السريرية والكيمياء الحيوية وفي مجلات التحاليل العضوية وغير العضوية .

3- تحديد توازن التفاعل وحساب الثوابت الفيزوكيميائية .

4- التحقق من حركيات التفاعل .

5- إمكانية استخدام معياري داخلي في التحليل بالطريقة الطيفية الاشتقاقية الأمر الذي يزيد من دقة ومضبوطية المقايسة لأنه يمكن فصل المعياري الداخلي عن المادة المحللة بالاشتقاق على العكس من التحاليل الطيفية العادية .

6- أهم ميزة لهذه الطريقة أنها اقتصاديةٌ جداً مقارنةً مع الكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز خاصةً فيما يتعلق بثمن الجهاز التحليلي وعدم الاستخدام الضخم للمحلات وبالتالي فإن التحليل باستخدام هذه التقنية يكون أقل كلفةً بكثير من التحليل بالطرق الكروماتوغرافية .

2-4-2- مجالات تطبيق الطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية (Applications):[4]

1- تحليل المركبات العضوية حيث استخدم دستور الأدوية البريطاني (1993,260[4]) هذه الطريقة (اشتقاق من الرتبة الثانية لتحديد آثار البنزن في الإيتانول 96%) .

2- استخدام الطريقة في مجال التحليل متعدد المكونات للمواد الدوائية ضمن أشكالها الصيدلانية.

3- استخدامها أيضاً في مجال تحليل الأغذية ومواد التجميل فيما يتعلق بتحليل الملونات والمواد الحافظة الموجودة فيهما .

4- التحاليل البيئية كتحري المبيدات الحشرية المختلفة في المياه الجوفية والتربة أو في عينات النباتات المدروسة .

5- استخدمت في مجال التحاليل للمواد غير العضوية كتحليل الشوارد الموجبة والسالبة الموجودة في الطبيعة .

2-4-3- مساوئ طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي (Dis advantages):[4]

تتميز هذه الطريقة بتناتجيةٍ منخفضةٍ وهذا ناتج عن:

1- الاعتماد على متثابتاتٍ جهازيةٍ كسرعة المسح وعرض الشق المنفذ للضوء والتي تملك تأثيراتٍ قويةٍ على شكل المخططات الطيفية في الرتبة صفر مما يجعل لها تأثيراً هاماً على شكل المخططات الاشتقاقية .

2- ليست متينة فيما يتعلق بالمتثابتات الاشتقاقية .

2-4-4- أنواع العصابات التحليلية المدروسة (Type of analytical bands):

نميز نوعين من العصابات التحليلية المدروسة:[98]

- عصابات امتصاص من نمط غوص (Gaussian) وتعطى معادلته على النحو:[102,103,107]

$$An = S\,.\frac{A_{max}}{\sigma^n}\,.\exp\left(\frac{-z^2}{2\sigma^2}\right)P$$

حيث أن:

P : كثير الحدود الممثل لمعادلة الطيف

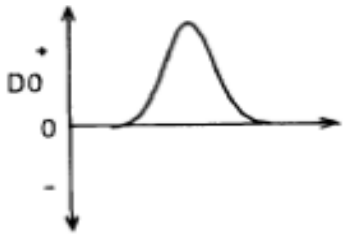
S: الإشارة – أو +

$z = \lambda - \lambda_{max}$

σ : العرض للعصابة التحليلية عند نقطة الالتواء

n : رتبة الاشتقاق

A_{max} : قمة الامتصاص الأعظمي عند طول موجة امتصاص أعظميλ_{max}



الشكل (16) يوضح تابع توزع غوص Gaussian [107]

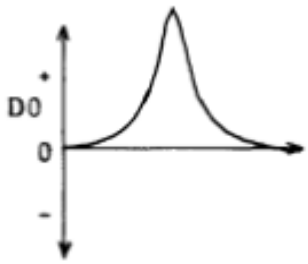
- أما النوع الثاني للعصابات التحليلية التي نميزها فهي عصابة امتصاص من نمط لورنتز حيث تعطى معادلة تابع توزع لورنتز(Lorentzian) بالعلاقة:[104]

$$An = \frac{A_{max}\ b0}{m^{n+1}\sigma^{n}}[1 - b1x + b2x^{2} - b3x^{3}b4x^{4} - b5x^{5}]$$

$$\frac{z^{2}}{z\sigma^{2}} = x:$$

$$1 + \frac{z^{2}}{2\sigma^{2}} = m$$

$b1, b2, b3 \ldots$: معاملات كثير الحدود



الشكل (17): يوضح مخطط تابع توزع لورنتز Lorentzian [104]

من العلاقتين نستنتج أن:

$$Xl = \frac{z^{2}}{2\sigma^{2}}$$

$$Xg = \frac{z^{2}}{\sigma^{2}}$$

من العلاقتين نجد أن تابع لورنتز يعطي قيم $Xl < Xg$ بالتالي فإن المنحني العائد لتابع توزع لورنتز(Lorentz) يعطي منحنيات أكثر ضيقاً من تلك التي تعود لتابع غوص (Gaussian) أي أن عصابات الامتصاص الأساسية الممثلة لطيف الرتبة صفر العائدة لتابع توزع غوص تكون أعرض وتمتد نحو الخارج بشكل أكبر من رتبة $\pm 3.5\sigma$ في حين أن المنحنيات العائدة لتابع توزع لورنتز تكون أقرب للمركز من رتبة $\pm 1.5\sigma$ [98,4] كما هو موضح في الشكلين .

وبالتالي بالمقارنة بين قمم الاشتقاق العائدة لتابع توزع غوص (Gaussian) وقمم الاشتقاق العائدة لتابع توزع لورنتز(Lorentz) لوحظ حدوث تداخل أقل في مخططات الاشتقاق من النمط لورنتز منها في مخططات الاشتقاق من النمط غوص (Gauss) .

وبالتالي تظهر لنا هذه النتائج أن القمم المعبرة عن تابع توزع لورنتز أكثر ملائمةً للتعبير عن الطيف التحليلي في تقنيات IR [101] والرامان [102] ،بينما تكون القمم المعبرة عن تابع توزع غوص أكثر ملائمةً للتعبير عن الطيف التحليلي في تقنيات التحليل الطيفي في المجالين UV و visible، أما NIR فتستخدم كلا التابعين في دراسة العصابات الامتصاصية .

2-4-5- اشتقاق العصابات التحليلية المدروسة في مجالي المرئي وفوق البنفسجي:

تطلق تسمية العصابات التحليلية على عصابات الامتصاص (أو ما يسمى بالمخطط الطيفي) أو العصابة الطيفية للمادة المحللة .

وبما أننا ذكرنا سابقاً أن أفضل تعبير للطيف المدروس في مجالي فوق البنفسجي والمرئي هو باستخدام معادلة طيف من النمط غوص والتي تعطى بالمعادلة:

$$A_\lambda = A_{max} e^{-cx^2}$$

بإجراء الاشتقاق من الرتبة الأولى:

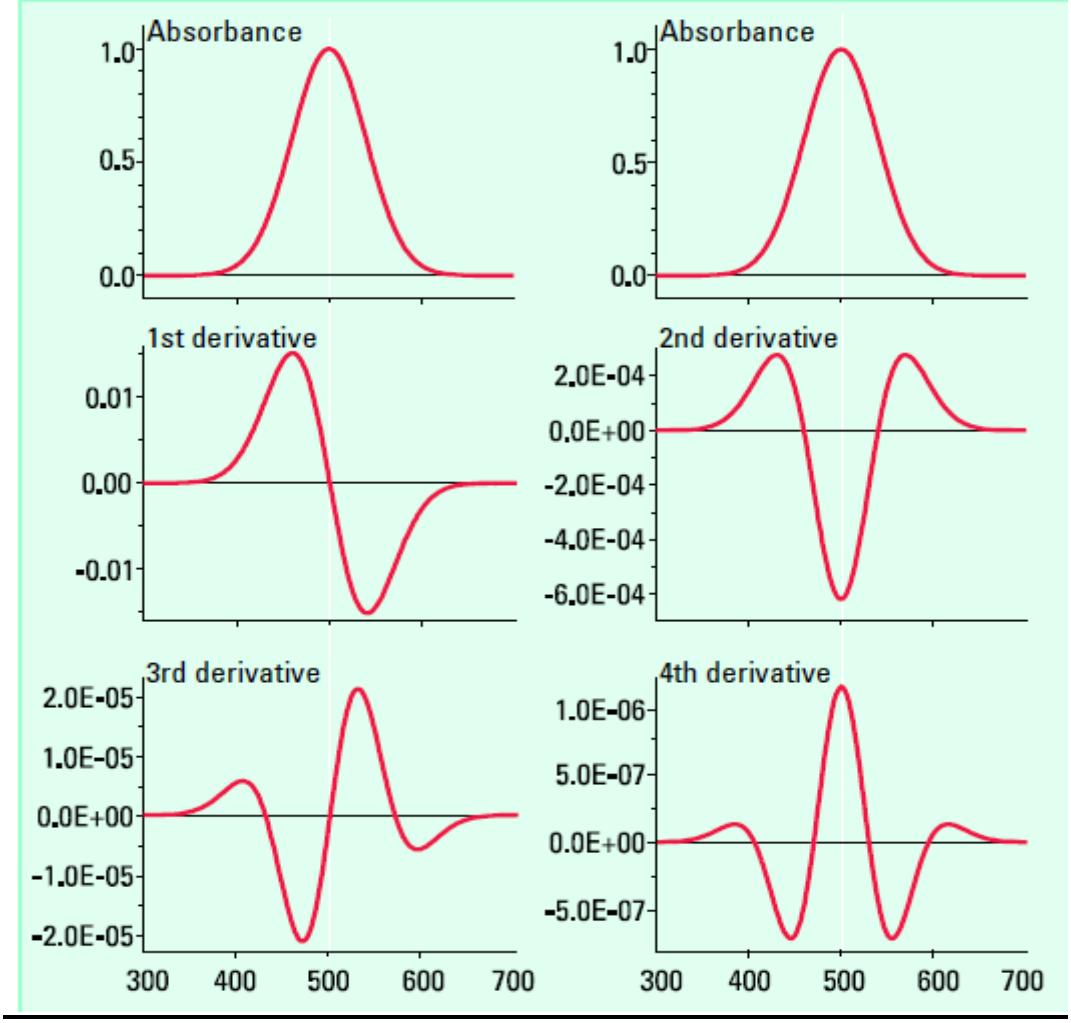
$$\frac{dA_\lambda}{d\lambda} = d^1 = -2cxA_\lambda$$

وبالاشتقاق من الرتبة الثانية:

$$\frac{d^2A_\lambda}{\mathrm{d}\lambda^2} = d^2 = -2c(2cx^2 - 1).A_\lambda$$

نلاحظ في الاشتقاقات العائدة للعصابة التحليلية بالنسبة ل A أنه مهما زادت رتبة الاشتقاق فإن A_λ تبقى ثابتة ولكن الذي يتغير هو كثير الحدود مع الأخذ بعين الاعتبار كل معالم الطيف المحلل التي ذكرت سابقاً في فقرة معالم الطيف التحليلي [98] .

6-4-2- تفسير الطيف الاشتقاقي (Explanation *of* derivative spectrum):



الشكل (18): يوضح الرتب الاشتقاقية من الأولى حتى الرابعة [87]

من الشكل السابق يمكن أن نستنتج ما يلي:[103]

1- بالنسبة للمشتقات من الرتب الفردية أي (الرتبة الأولى ،الرتبة الثالثة ،الرتبة الخامسة .....إلخ) فإن القمة الأعظمية الممثلة بالامتصاص الأعظمي A_{max} للطيف الامتصاصي الأساسي تكون مارةً بالقيمة صفر في المخطط الطيفي الاشتقاقي .

2- القيمة σ الممثلة لنقطة الالتواء للمنحني الأساسي تكون ممثلةً للحدود الأعظمية في المخطط الاشتقاقي .

3- في الرتب الزوجية تكون الحدود الأعظمية لقمم المنحنيات الأساسية تمثل الحدود الأعظمية في المنحني الاشتقاقي .

4- في رتبة الاشتقاق الزوجي من النمط $4nth$ فإن قيمة الامتصاص الأعظمي A_{max} تكون في الاتجاه الموجب للمخطط .

5- أما إذا كانت رتبة الاشتقاق الزوجي من النمط $th(4n-2)$ فإن الحد الأعظمي للطيف الامتصاصي في الطيف الأساسي يظهر عند الحد الأعظمي السالب في الطيف المشتق .

6- نقاط الالتواء في الرتب $4nth$ تعطي قيم أصغرية في الاتجاه السالب أما في الرتب $th(4n-2)$ فتعطي قيم الالتواء قيماً أصغرية في الاتجاه الموجب .

7- كلما زادت رتبة الاشتقاق أدى ذلك إلى زيادة حدة القمة الناتجة في المخطط الاشتقاقي .

8- كلما زادت رتبة الاشتقاق كلما زاد عدد النهايات في المخطط الاشتقاقي حيث أن عدد النهايات في الطيف المشتق يكون مساوياً لـ$n+1$: n يمثل رتبة الاشتقاق .

يظهر لنا من المخططات السابقة أن زيادة رتبة الاشتقاق أدت لزيادة في حدة القمة الناتجة حيث لوحظ أن قيمة العرض عند منتصف القمة في المشتق الأول تكون أقل بـ 53%[4] منها في الطيف الأساسي وقد تم التعبير عن هذه القيمة بمتثابت سمي بالعرض النسبي عند منتصف القمة والذي يعطى بالعلاقة:

$$\%Pn = \frac{FWHM_n}{FWHM_0} * 100$$

$\%Pn$: العرض النسبي عند منتصف القمة .

$FWHM_n$: العرض عند منتصف القمة المشتقة. n: رتبة الاشتقاق .

$FWHM_0$: العرض عند منتصف القمة العائدة للقمة الأساسية لطيف الرتبة صفر.

من العلاقة السابقة نستنتج أنه كلما زادت رتبة الاشتقاق حصلنا على فصلٍ أفضلٍ بين القمم وذلك بسبب انخفاض $FWHM_n$ وبالتالي تصبح قيمة $\%Pn$ أصغر.

2-5- القيمة الحقيقية للحد الأعظمي لامتصاص العصابة الطيفية أو عصابة الامتصاص التحليلية(A_{max}):[98]

يتم تحديد القيمة الحقيقية ل A_{max} بما يدعى معدل التوافر النسبي للقمة $Rn\%$ والذي يعطى بالعلاقة:

$$\%Rn = \frac{S_n}{A_0} * 100$$

$\%Rn$: معدل توافر القمة النسبي .

S_n: ارتفاع القمة الاشتقاقية التابعة .

A_0: ارتفاع القمة الاشتقاقية الأساسية لمشتق مخطط طيف الرتبة صفر.

لوحظ أن زيادة رتبة الاشتقاق تنتج زيادة قيمة $Rn\%$ وذلك بسبب تناقصS_n وبالتالي نستنتج مرة أخرى أن زيادة رتبة الاشتقاق تؤدي لتحسين عملية الفصل للقمم المتداخلة .

2-6- تداخل الإشارات (overlapping of signals):[105]

عندما يكون هناك تداخل لقمم المواد المحللة أو المادة الوحيدة المحللة مع السواغات في المنحني الطيفي الأساسي (عصابة امتصاص الرتبة صفر) فإننا كما ذكرنا باللجوء إلى عملية الاشتقاق نقوم بفصل طيف الرتبة صفر إلى مكوناته الأساسية ونلاحظ ما يلي من اعتبارات:

- إذا كان هناك قمتين متناظرتين متداخلتين فإن إجراء عملية الاشتقاق لهما سوف يؤدي إلى فصلهما إلى قمتين منفصلتين .
- إذا كان هناك قمتين غير متناظرتين متداخلتين نميز الحالتين:

1- إذا كانت قيمة المسافة بين قيمتي الحد الأعظمي A_{max} لكل قمتين متقاربتين في المخطط الطيفي الأساسي أصغر من قيمة $FWHM$ للمخطط الطيفي الأساسي فإننا نحصل بذلك على ما يسمى قمة وكتف حيث يمر الحد الأعظمي لامتصاص الكتف (A_{max}) بنقطة انثناء القمة الظاهرة في المخطط الطيفي المشتق أي $DC <$ $FWHM$.

2- إذا كانت قيمة المسافة بين قيمتي الحد الأعظمي A_{max} لكل قمتين متقاربتين في المخطط الطيفي الأساسي أكبر من قيمة $FWHM$ للمخطط الطيفي الأساسي فإننا

نحصل بذلك على قمتين منفصلتين في المخطط الطيفي الاشتقاقي بشكل واضح ($DC > FWHM$).

3- تدعى المسافة بين قيمتي الحد الأعظمي A_{max} لقمتين متداخلتين أو قمة مع كتفها بالمسافة الحرجة CRITICAL DISTANCE وترمز DC.

7-2- الطيف الحقيقي والضجيج (Real Spectra and Noise):[98,87]

لابد من دراسة نسبة الإشارة إلى الضجيج لأن لعملية الاشتقاق تأثيراً مهماً على طيف الضجيج الناتج في مخطط الطيف الأساسي (طيف الرتبة صفر) حيث تكون الإشارة المسجلة في جهاز التحليل الطيفي على شكل عصابة امتصاص هي عبارة عن مزيج بين الطيف الأساسي و الضجيج وسبب هذا الضجيج هو [98] :

1- الضوء المبعثر الذي يتم الحصول عليه بواسطة القاطع الذي يعمل على قطع الضوء الصادر من المنبع الضوئي للجهاز وتوجيهه إلى العينة والمعياري في الأجهزة ثنائية الحزمة الضوئية .
2- التيار الكهربائي المتناوب المار عبر وحدة الجهاز .
3- وحدة الاشتقاق الموجودة ضمن الجهاز .
4- تغير في سعة الشق الذي يمر عبره الضوء من المنبع الضوئي .
5- تغيرات في درجات الحرارة التي تجري ضمنها دراسة العينة ضمن الجهاز التحليلي .

بشكل عام يعطى معدل الإشارة للضجيج بالعلاقة [87]:

$$SNR = \frac{A_S}{A_{DS}}$$

حيث أن:

A_S: معدل توافر الإشارة الاشتقاقية .

A_{DS}: معدل توافر الإشارة المتوزعة .

وبعبارة أخرى فإن معدل الإشارة للضجيج سوف يتناقص كلما زادت رتبة الاشتقاق وذلك بسبب زيادة توزع الإشارة على القمم الاشتقاقية أي أنّ الاشتقاق يعطي عدة قمم حسب الرتبة الاشتقاقية كما مر معنا سابقاً (عدد القمم الاشتقاقية يساوي رتبة الاشتقاق مضافاً لها 1).

فتكون بذلك قيمة A_{DS} مرتفعة فيحدث انخفاض قيمة SNR وبالتالي يمكن أن نستنتج أن SNR يتناسب مع النقص الحاصل في قيمة $FWHM$ حيث كلما زادت قيمة النقص الحاصل في العرض عند منتصف القمة (أي بزيادة رتبة الاشتقاق) انخفض معدل الإشارة إلى الضجيج وبالتالي يمكن القول أن معدل الإشارة للضجيج يعتمد بشكل أولي على قيمة $FWHM$ ويعبر عن ذلك بالعلاقة:[107]

$$SNR \sim \frac{1}{FWHM^n} c$$

حيث: n رتبة الاشتقاق .

2-7-1- كيفية التخلص من الضجيج (How can we eliminated noise?):[98]

1- إما باستخدام مراشح خاصة في الجهاز تعمل على تصفية الضوء المنبعث من المنبع الضوئي .
2- أو باستخدام ترانزستورات تتحكم في مرور التيار الكهربائي المتناوب المار عبر جهاز التحليل الطيفي حيث تعمل هذه الترانزستورات على تخفيف أثر الضجيج الناتج عن التيار الكهربائي المتناوب بتحويل نبضة التيار إلى نبضة وحيدة الاتجاه مخفضة بذلك أثر الضجيج الناتج عنه .
3- الحفاظ على درجة حرارة ثابتة ضمن الجهاز أثناء إجراء التحليل .

2-8- تقييم الطيف الاشتقاقي (Estimation of derivative spectrum):

يتم تقييم الطيف الاشتقاقي بعدة طرق تتضمن:

2-8-1- الطرق الشائعة (Common method): وتشمل:

2-8-1-1- طريقة peak – peak (P –P method:[103])

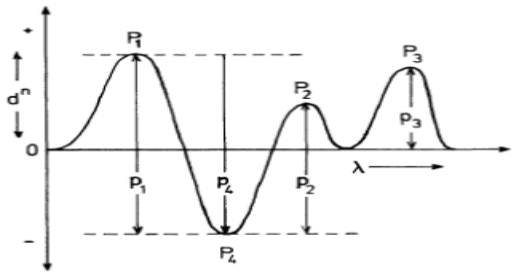
تستخدم هذه الطريقة في تحديد العصابة الطيفية لكل مادة من المواد المتداخلة والتي تكون معروفة حيث نلجأ لتقييم تراكيز هذه المواد بعد إجراء الاشتقاق ومن أجل الحساب فإن:

$$d^n = \frac{d^n A}{d\lambda^n} = l.c.\frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n}$$

حيث نلاحظ أن $A1$ للقمة $P1$ تتناسب مع تركيز المادة التي تعود لها القمة. في هذه الطريقة ضمن منحنيات الامتصاص الاشتقاقية تكون المسافة من الحد الأعظمي إلى الحد الأصغري للقمة المشتقة متناسبة مع التركيز للمادة التي تعبر عنها القمة .

الأسباب الأساسية للجوء لهذه الطريقة:

1- وجود قمم غير منفصلة بشكلٍ كافٍ في الطيف الأساسي .
2- وجود عصابات تابعة (satellite) في الطيف الأساسي مشوشة له.
3- غياب الخطية أي عدم إمكانية تطبيق قانون لامبيرت- بيير.

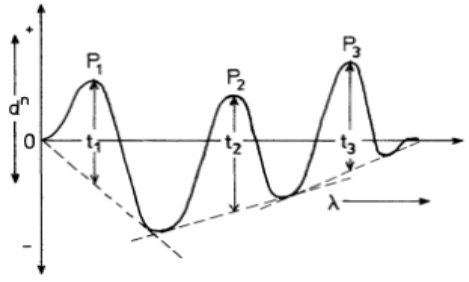


الشكل (19): يوضح طريقة PEAK METHOD في تقييم الطيف الاشتقاقي[103]

2-1-8-2- طريقة Peak – TANGENT (P – T method):[98]

في هذه الطريقة يرسم الميل الشائع بين قمتين متجاورتين في الحد الأعظمي أو الأصغري والمسافة لقيمة الحد الأعظمي المتوسط تقاس بالتوازي مع المحور الرأسي (t1,t2,t3) في الشكل (18).

تطبق هذه الطريقة بشكلٍ مرضٍ في حال كانت هناك خلفيةٌ خطيةٌ موجودةٌ ولكن في معظم الأحيان تكون هذه الطريقة هي المفضلة لتحري فيما إذا كانت الرتب الاشتقاقية العليا ستعطي نتائج أكثر مضبوطية .

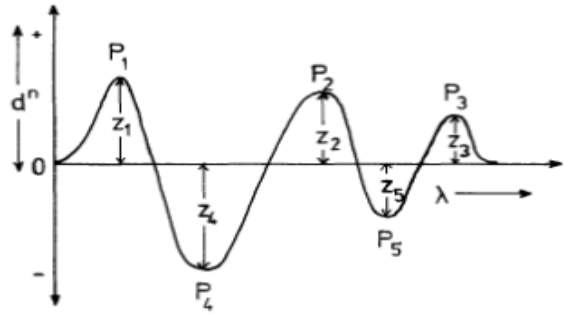


الشكل (20): يوضح طريقة Peak – TANGENT في تقييم الطيف المشتق[98]

2-8-1-3- طريقة PEAK – ZERO (P – Z method):[108]

تستخدم للتقييم في حالاتٍ خاصةٍ حيث يقاس الخط العمودي الممثل لبعد الحد الأعظمي للقمة A_{max} الممثل لقيمة الامتصاص للقمة عن خط الصفر والذي يتناسب مع القيمة المطلقة للاشتقاق .

تعد هذه الطريقة ملائمةً للاشتقاقات العليا التي تملك إشاراتٍ متناظرةٍ متقاربةٍ . كما تقترح هذه الطريقة لتقييم القمم المتداخلة الإفرادية في الحالة غير المشوهة حيث أن هذه القمم تكون متداخلة في الرتبة صفر فيصار للاشتقاق وبعدها يتم اللجوء لتقييم كمي لكل قمةٍ اشتقاقيةٍ حيث يكون طول موجة الامتصاص الأعظمي لها معروفاً بحيث تظهر بوضوح في مكانها على المخطط الطيفي الاشتقاقي، وتمثل المسافة بين 0 و A_{max} (Zn) وهذه القيمة تتناسب مع تركيز المادة في العينة المحللة .



الشكل (21): يوضح طريقة PEAK – ZERO في التقييم[108]

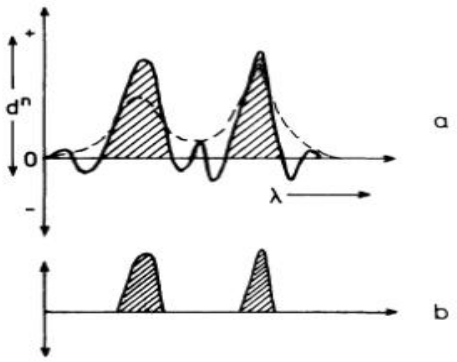
2-8-1-4- طريقة PEAK – PEAK RATIO(P – P RATIO method):

تعد هذه الطريقة مهمةً من أجل التقييم الكمي للطيف الاشتقاقي المحلل في الرتبة صفر لمزيج موادٍ أو لموادٍ متداخلةٍ مع المادة الأساسية المحللة باعتبار أن المادة الأساسية معياريّ وبالتالي تعد هذه الطريقة مفيدةً عندما نبحث عن الاختلافات الصغيرة في الطيف الاشتقاقي المعقد والتي تعود للتداخلات في الإشارة للمادة الأساسية مع مكونات ثانوية [110,109].

2-8-2- طرق خاصة من أجل دراسة الطيف الاشتقاقي تشمل:

2-8-2-1- طريقة HALF WAVE GRAPHICAL ILLUSTRATION: تعتمد هذه الطريقة على دراسة نصف الموجة الظاهرة في المخطط الاشتقاقي من نقطة $FWHM$ حتى الحد الأعظمي للقمة الممثل بـ A_{max} في الاتجاه الموجب للمحور بالنسبة للرتب $4nth$

وبالاتجاه السالب بالنسبة للرتب $(4n-2)th$ أي هذه الطريقة تتعامل فقط مع المخططات الاشتقاقية الطيفية الناتجة عن الاشتقاقات الزوجية [111].



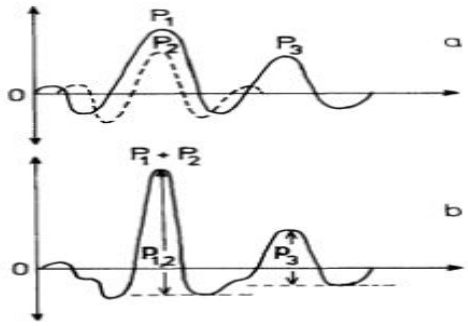
الشكل (22): يوضح HALF WAVE في تقييم الطيف الاشتقاقي[111]

حيث يمثل الشكل a المناطق الموجبة أو السالبة للقمم المحددة اشتقاقياً من مخطط الرتبة صفر.

يمثل الشكل b المنطقة بين $FWHM$ حتى الحد الأعظمي للقة الممثل ب A_{max} .

2-2-8-2- طريقة EXTENDED PEAK – PEAK RATIO (E – P-method):

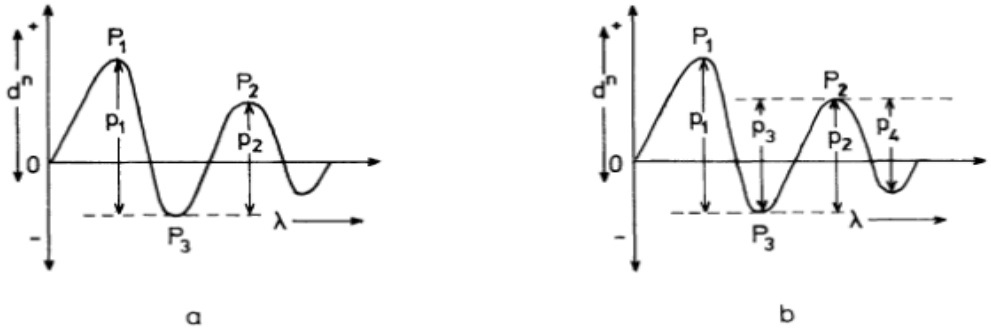
تستخدم عندما يعطي المخطط الاشتقاقي للقمم المتداخلة قمماً ثلاثاً (P3،P2،P1) حيث تعود كل من القمتين (P3،P1) لنفس المادة (P2،P1) كل منها تعود لمادة ولكن المخطط الاشتقاقي أظهر تداخل بين (P2،P1) حيث يتم اللجوء لتحديد P3 التي هي نفسها P1 ومن ثم الناتج لمجموع القمتين (P1+P2) تطرح منه القيمة P3 التي هي نفسها P1 فنحصل على P2 .[103]



شكل (23): الشكل a يمثل الإشارتين لإشارات مشتقة .[103]
الشكل b يمثل تراكب الإشارتين في الشكل a .

2-8-2-3- طريقة SIDE PEAK – SIDE RATIO (SP – SR method):

تعتمد تقنية (SPSR) في تحديد القمة الناجمة عن الاشتقاق على أخذ معدل الإشارات لقمتين متجاورتين ، وبالمقابل فإن (PPR) تعتمد على قمة وحيدة .[98]



شكل (24): يوضح الشكل a طريقة PPR حيث تحسب كل مادة على حده [98]

الشكل b يوضح طريقة SPSR حيث بالنسبة للقمة P2 تحسب من معدل P3,P4 والقمة P3 هي معدل القمتين P1,P2 .

2-8-3- الطرق الحاسوبية لتقييم الطيف الاشتقاقي (Computational Methods):

تعد أبسط الطرق المستخدمة لتقييم الطيف الاشتقاقي وعملية الاشتقاق كما تعد هذه الطرق سريعةً تتعامل مع أكثر الأطياف تعقيداً وتعمل على تحديد الاختلافات الصغيرة في الطيف الاشتقاقي والتي تعود إلى تداخلاتٍ معينةٍ [112] ، وتتضمن هذه الطرق كلا من:

2-8-3-1- طريقة الطرح أو الإضافة (Additive or Subtractive Methods):

إذا كان المخطط الطيفي الأساسي (مخطط الرتبة صفر) العائد لمادتين محللتين فيه تداخلٌ بين قمم هذه المواد فإنه لابد من اللجوء لعملية الاشتقاق لفصل قمم هاتين المادتين عن بعضها البعض وبتطبيق قانون لامبيرت – بيير نجد:[98,87]

لأجل المادة رقم 1:

$$A_1 = \varepsilon_1 . c_1 . l$$

لأجل مادة رقم 2:

$$A_2 = \varepsilon_2 . c_2 . l$$

بتطبيق عملية الاشتقاق على المخطط الطيفي الأساسي سوف تخضع المعادلتين السابقتين للاشتقاق فنحصل على علاقتين توضحان بالشكل:

$$\frac{d^n A_1}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} = \mathrm{c}_1 . l . \frac{d^n \varepsilon_1}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}}$$

$$\frac{d^n A_2}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} = \mathrm{c}_2 . l . \frac{d^n \varepsilon_2}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}}$$

بالجمع والطرح على الترتيب للمعادلتين المشتقتين نحصل على:

$$\frac{d^n (A_1 \pm A_2)}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} = l . \left[c_1 \frac{d^n \varepsilon_1}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} \pm c_2 \frac{d^n \varepsilon_2}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} \right]$$

من المعادلة نلاحظ أن مجموع الأطياف المشتقة لمادتين أو أكثر بشكلها المفرد يجب أن يكون مساوياً لمشتقات مزيج كل هذه المواد مع بعضها البعض وهذا هامٌّ في الدراسات التحليلية عندما يتم تحديد كل عياريٍّ عائدٍ لمادةٍ ما على حده في طيفٍ اشتقاقيٍّ ومن ثم أخذ مزيج هذه المواد ضمن عينةٍ واحدةٍ وإجراء الاشتقاق لها حيث يجب أن يكون الطيف المشتق لكل مادة بشكلها المفرد مساوياً للطيف المشتق لمزيج المواد مع بعضها .

بالإضافة لتقنية المجموع لمشتقين أو أكثر يمكن أن نستخدم تقنية طرح مشتق ما من المشتق الأساسي المحدد لمشتقات كل المواد الموجودة لنحدد بذلك مشتق أحد هذه المواد أي:

$$A = A_1 + A_2$$

$$A_1 = A - A_2$$

وبالتالي هذه الطريقة ملائمةٌ لفصل طيفٍ مشتقٍ غير معروفٍ من المجموع المشتق وجعله مشتقاً معروفاً بشكلٍ جيد .

2-8-3-2- طريقة القسمة (Partitive Method):[98]

المعدل لإشارتي قمتين كما الحال في SPSR أحد القمم مستقلة عن التراكيز للمواد المعينة .

ومع ذلك من السهل أن نقوم بتقسيم أحد الأطياف على الآخر .

تعطي هذه الطريقة نتائج خطية مثالية كما تعمل هذه الطريقة على تحديد الأطياف التي تعاني من انحرافات بسبب تلوث الطيف الاشتقاقي بالضجيج أو بسبب اضطرابات أخرى بالإضافة لذلك اختلافات مميزة لمواد مختلفة يمكن أن تحدد بوضوح .

$$P_1 = \frac{d^n A_1}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} = \mathrm{c}_1 . l . \frac{d^n \varepsilon}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}}$$

$$P_2 = \frac{d^n A_2}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}} = \mathrm{c}_2 . l . \frac{d^n \varepsilon}{\mathrm{d}\lambda^{\mathrm{n}}}$$

وبالتالي نجد:

$$\frac{P_1}{\mathrm{P}_2} = \frac{\mathrm{c}_1}{\mathrm{c}_2} = constant$$

وهذا المعدل ثابت على كامل منطقة الطيف وهو مستقل عن طول الموجة .

وبالتالي فإن هذه الطريقة ملائمة بشكل خاص من أجل ضبط الجودة والتحديد للاختلافات الصغيرة في الأطياف أو في منحنياتها .

9-2- تقييم وحساب مساحة القمة (evaluation of peak area):[87]

قديماً اعتمد في تقييم مساحة القمة في الطيف المشتق على مقترحاتٍ خاصةٍ عندما يكون شكل الإشارات ليس متناظراً .

هناك طريقةٌ اعتمدت على تقسيم رقعة القمة المدروسة إلى مربعات صغيرة باستخدام ورق رسم بياني مقسم بشكل مربعات وإحصاء عدد المربعات التي تشمل مساحة القمة المدروسة .

ولكن في هذه الأيام جرى تطوير أجهزة تحليلٍ طيفيٍّ تحتوي على برامج حاسوبيةٍ تُجري عملية الاشتقاق للطيف المحلل المعقد الناتج في الرتبة صفر و تصحح الإشارات المتداخلة كما أن هذه الأجهزة التحليلية تعمل على تصحيح الخط القاعدي إضافةً إلى قيام هذه البرامج بعد إجراء الاشتقاق للطيف الأساسي بحساب المساحة تحت سطح المنحني للقمة المشتقة الناتجة وبالتالي التحديد الكمي لها حيث لوحظت أهمية هذه الأجهزة في التحليل من خلال إجراء عملية الاشتقاق والتحديد الكمي للمواد المفصولة خلال فترة زمنية قصيرة مقارنةً مع أجهزةٍ تحليليةٍ أخرى .

الفصل الثالث

مصدوقية الطريقة التحليلية

1- مصدوقية الطريقة التحليلية Analytical methods validation

- **1-1- تعريف المصدوقية:**[82]
- هي العملية التي يثبت من خلالها عن طريق الدراسات المختبرية أن الخاصيات الأدائية (performance characteristics) للإجراء تلبي متطلبات التطبيقات التحليلية المقصودة

1-2- الدلائل الإرشادية للمصدوقية (Validation guidelines):[113]

1- **ICH Q2B:** مصدوقية الإجراءات التحليلية ، المنهجية Methodology (حزيران 1997) .

2- **ICH Q2A:** مصدوقية الإجراءات التحليلية ، التعاريف والاصطلاحات Definitions and terminology (آذار 1995)

3- **FDA:** المرشد في الصناعة (Guidance for Industry): الإجراءات التحليلية ومصدوقية الطرق .

4- **دساتير الأدوية:** USP , EuPh , BPh

1-3- أنماط الإجراءات التحليلية التي يجرى لها اختبارات المصدوقية:[113]

1- اختبارات الاستعراف – تعيين الهوية – (Identification test) .

2- الاختبارات الكمية لمحتوى الشوائب (Quantitative tests for impurities content) .

3- الاختبارات الحدية لمراقبة الشوائب (Limit test of control of impurities) .

4- الاختبارات الكمية للجزء الفعال في عينات المواد الدوائية أو المنتجات الدوائية أو مكونات أخرى مختارة في المنتج الدوائي (Quantitative tests of the active moiety in samples of drug substances or drug product or other selected components in the drug product) .

5- إجراءات تحليلية أخرى مثل اختبار الذوبان للمنتجات الدوائية (Dissolution testing for drug products) أو تعيين حجم جسيمات المادة الدوائية (Particle size determination for drug substance) .

1-4- المتثابتات التحليلية للمصدوقية: (Analytical parameters) التي يجب أخذها بعين الاعتبار وهي:[82,113]

- المضبوطية (Accuracy).
- الدقة (precision).

- النوعية (specificity).
- حد الكشف (Detection limit).
- حد الكم (Quantitation limit).
- الخطية (Linearity).
- المتانة (Robustness).

1-4-1- المضبوطية (Accuracy): مدى تقارب نتائج اختبار الطريقة المدروسة من القيمة الحقيقية .

1-4-2- الدقة (precision): تعبير عن مدى توافق وتناغم نتائج الاختبارات التحليلية الإفرادية فيما بينها عند تطبيق الطريقة عدد من المرات على المادة باعتيان متكرر لعينة متجانسة ونميز في تعيين الدقة المفاهيم التالية:

1-4-3- التناتج (Reproducibility): مقدار استعادة النتائج نفسها في مختبرات مختلفة .

1-4-4- الدقة الوسطى (Intermediate Precision): مدى الاختلاف في النتائج لدى تطبيق الطريقة نفسها في المختبر نفسه في أيام مختلفة (عدة أسابيع) أو من قبل محللين مختلفين أو أجهزة مختلفة .

1-4-5- التكرارية (Repeatability): مدى تكرار النتائج نفسها ضمن المختبر نفسه بعد فترة زمنية قصيرة لكن بوجود نفس المحلل ونفس الأجهزة .

1-4-6- النوعية (specificity): قابلية الطريقة التحليلية لمقايسة المادة المراد تحليلها بدقة ومضبوطية مناسبتين بالرغم من وجود مركبات محتملة كالشوائب أو منتوجات التخرب أو السواغات .

1-4-7- حد الكشف (Detection limit): هو صفة مميزة للاختبارات الحدية وهو أقل كمية يمكن كشفها من المادة المراد تحليلها في العينة إنما ليس من الضروري تعينها كمياً .

1-4-8- حد القياس الكمي (Quantitation limit): الكمية الأقل من المادة المراد تحليلها في العينة والتي يمكن قياسها بدقة و مضبوطية مقبولتين بشروط تجريبية معينة .

1-4-9- الخطية (Linearity): قابلية الطريقة التحليلية لإعطاء نتائج متناسبةٍ طرداً مع تركيز المادة المحللة في العينة ضمن المجال المعطى لها إما بشكل مباشر أو بعد إجراء بعض التحويلات الرياضية المعروفة .

1-4-10- المتانة (Robustness): قدرة الطريقة على البقاء غير متأثرةٍ بالمتغيرات الصغيرة الموضوعة بشكل متعمَّد في معايير هذه الطريقة وبيان ما يثبت أن الطريقة التحليلية مصدوقة النتائج خلال الاستخدام العادي الروتيني كتغير طفيف في الباهاء (pH) ، سرعة أو معدل التدفق (Flow Rate) ، درجة حرارة العمود (column Temperature) ، طول الموجة التي يتم عندها الكشف .

جدول(1) متثابتات مصدوقية الطريقة التحليلية حسب دستور الأدوية الأمريكي [82]

خصائص الأداء التحليلي	الفئة 1	الفئة 2 تحديد كمي	الفئة 2 تحديد كيفي	الفئة 3	الفئة 4
المضبوطية (Accuracy)	نعم	نعم			لا
الدقة (precision)	نعم	نعم	لا	نعم	لا
النوعية (specificity)	نعم	نعم	نعم		نعم
حد الكشف (Detection limit)	لا	لا	نعم		لا
حد القياس الكمي (Quantitation limit)	لا	نعم	لا		لا
الخطية (Linearity)	نعم	نعم	لا		لا
المجال (Range)	نعم	نعم			لا

- الفئة 1: إجراءات تحليلية للتعيين الكمي للمكونات الأساسية للمادة الدوائية الصرفة أو المكونات الفعالة (بما فيها المواد الحافظة) في المنتجات الصيدلانية النهائية .
- الفئة 2: إجراءات تحليلية للتعيين الكمي للشوائب في المواد الدوائية الصرفة أو منتجات التدرك في المنتجات الصيدلانية النهائية ، ولهذا الإجراء نوعين من الاختبارات (مقايسة كمية – اختبارات حدية) .
- الفئة 3: إجراءات تحليلية لتعيين الخصائص الأدائية (مثل الذوبان – إطلاق الدواء)
- الفئة 4: اختبارات الاستعراف .

الفصل الرابع

الدراسات السابقة

1- الدراسات التحليلية الطيفية الاشتقاقية السابقة لمزائج الفيتامينات المدروسة:

توجد دراسةٌ تحليليةٌ اشتقاقيةٌ واحدةٌ لدراسة فصل مزيج فيتاميني AوE عن بعضهما و مقايسة المكونات المفصولة كما توجد دراسةٌ واحدةٌ فقط لفصل ومقايسة مكونات مزيج فيتامينات B1,B6,B12 و تتلخص الدراسات التابعة لكل مزيج في الجدول التالي:

الجدول (2): يوضح الدراسات السابقة الطيفية الاشتقاقية للأمزجة المدروسة

الفيتامين	المحل	الجهاز	المكشاف	الوسط	رتبة الاشتقاق	طول الموجة لكل فيتامين بعد الاشتقاق
مزيج A بالميتات وE أسيتات 1991[114]	بروبانول -2	HP 8415A	Diod-Array Spectro	المحافظ الجيلاتينية	الرتبة الثالثة	فيتامين A 313nm فيتامين E 290nm
مزيج B1,B6,B12 2002 [115]	حمض كلور الماء 0.1N	Philips PU 8700	UV – VIS Spectro	مضغوطات	الرتبة الثانية	فيتامين B1 228nm فيتامين B6 308nm فيتامين B12 361nm

2- الدراسات الكروماتوغرافية السابقة في فصل ومقايسة مزائج الفيتامينات المدروسة:

توجد دراساتٌ كروماتوغرافيةٌ كثيرةٌ لتحليل الفيتامينات إما بشكلٍ مفردٍ أو بشكلٍ مزائج كما في المزائج التي سندرسها اعتمدت على طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز (HPLC) مستخدمةً النظام المدروج في الشطف في معظمها أما فيما يتعلق بدراسة المزائج المحتوية كلا النمطين من الفيتامينات الذوابة بالماء والذوابة بالدسم فاعتمدت الدراسات بدايةً على القيام باستخلاص الفيتامينات الذوابة بالماء عن الفيتامينات الذوابة بالدسم وبعد ذلك يتم تحليل كل مزيج من هذه المزائج على حده .

و يمثل الجدول التالي الدراسات السابقة في فصل و مقايسة مزائج الفيتامينات الذوابة بالماء والذوابة بالدسم:

الجدول (3): يوضح الدراسات الكروماتوغرافية السابقة لفصل ومقايسة الفيتامينات

المزيج المدروس	الطور المتحرك	العمود المستخدم	معدل التدفق	المكشاف	الوسط
مزيج فيتاميني A وE 1999[116]	ميتانول 100% نظام متساير	LiChrospher RP, C18,(125×4 ,5µm)	1.5ml/min	UVD , 300nm	الأشكال السائلة
مزيج فيتامينات B1,B6,B12,B9 2005[118]	ميتانول+5mMصوديوم هبتانو سلفونات مع 0.1%تري إيتيل أمين pH=2.8 (75+25) أما B12 ميتانول+ماء (78+22) نظام تساير لكلا التحليلين B12 وB1,B6,B9	Supelcosil ABz العمود المستخدم ل suplex-) B12 PKB-100 (150×4.6,5µm	1ml/min	UV-VISI Watres M484-290nm أما B12 يتم تحريه عند 550nm	مضغوطات ملبسة
مزيج فيتامينات B1,B6,B2,B3 2003[119]	ميتانول+1%حمض خل ثلجي مع 7mM صوديوم هكسانو سلفات (20+80) بالنظام المتساير	Waters M pondapak C18(300×3.9,10µm)	1ml/min	UFLC 20 AB UV-detector 280nm	مضغوطات ملبسة
مزيج فيتامينات B1,B6,B12, B3,B2 A(palmitate), E(Acetate), D3 2000[117]	إجراء استخلاص للفيتامينات الذوابة بالماء من الشكل الصيدلاني باستخدام المذيبات العضوية لاستخلاص الفيتامينات الذوابة بالدسم (Cartridge C18) حيث يبدأ الشطف بالميتانول لسحب الفيتامينات الذوابة بالدسم ومن ثم الماء HPLC لسحب الفيتامينات المائية ومن ثم العمل فصل أمزجتها ومقايستها باستخدام طور متحرك مزيج ميتانول:أسيتونتريل (95:5) بالنظام المتساير للفيتامينات الدسمة أما المائية فيستخدم طور متحرك (0.05Mخلات أمونيوم + ميتانول)وفق النظام المدروج حيث تتم مقايسة B1,B6,B3,B2 عند طول موجة 270nm و B12 بشكل مستقل عند 362nm	Nova-Pack C18(4µm,150×3.9)	1ml/min	U-V detector 270nm,362nm	مضغوطات ملبسة
مزيج فيتامينات B1,B6,B12 مع Alpha lipoic acid 2010[120]	0.05 M phosphate buffer to pH 2.5 and acetonitrile	X-Terra (RP-C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm)	1ml/min وفق النظام المدروج	PDA يتم العمل عند طول موجة 230nm لكل من B1,B6, Alpha lipoic أما B12 فيتم تحديده بشكل مفرد عند طول موجة	كبسولات متعددة الفيتامين

				320nm حيث يساعد في ذلك استخدام المتحري PDA الذي يسمح برنامجه بتغيير طول موجة القياس	

الباب الثاني

هدف البحث

Aim of study

تعتبر الفيتامينات من المتممات الغذائية التي شاع استخدامها بشكل واسع كأشكال صيدلانية في العالم بأسره وانتشارها في صيدليات المجتمع ضمن أشكال صيدلانية مختلفة والاستخدام الواسع لها من قبل مختلف الأعمار من سن الطفولة و حتى عند كبار السن وعند الحوامل والمرضعات لذا فقد هدف البحث إلى:

1- العمل على مركبات شائعة الاستعمال وتستخدم لأكثر من غرض حيث تم اعتماد الفيتامينات كنموذج لمواد دوائية تستخدم في حالات مرضية معينة وكمتممات غذائية على حدٍّ سواء، وتوضيح الدور والأهمية الحيوية لكل من الفيتامينات التي جرت دراستها وأهميتها .

2- تطوير طريقة تحليلية باستخدام التحليل الطيفي الضوئي الاشتقاقي لفصل ومقايسة مزائج الفيتامينات المدروسة (مزيج فيتاميني Aو E ومزيج فيتامينات B1,B6,B12) في الأشكال الصيدلانية المختلفة ومقايسة كل فيتامين مفصول بدقةٍ ومضبوطيةٍ مقبولتين دون الحاجة إلى الاستخلاص من مطرس (matrix) العينة وبحيث تكون الطريقة سريعةً وبسيطةً وغير مستهلكةٍ للوقت والمحلات.

3- تطوير طريقةٍ تحليليةٍ باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز للمزائج السابقة.

4- الوصول إلى حدود معينة في مقايسة فيتامين B12 ضمن المزيج مع كل من فيتاميني (B1,B6) في كلتا الطريقتين التحليليتين المدروستين (الطريقة الطيفية الاشتقاقية و طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز HPLC) حيث أن معظم الدراسات السابقة اعتمدت على مقايسة هذا الفيتامين بشكلٍ مفردٍ في المجال المرئي أو بعد إجراء الاستخلاص له من أمزجته بطريقة الكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز .

5- التحقق من مصدوقية الطريقتين التحليليتين المطورتين.

6- مقارنة النتائج التي جرى الحصول عليها بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي مع النتائج التي جرى الحصول عليها بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز HPLC .

الباب الثالث

الدراسة العملية

Practical study

الفصل الأول

المواد والطرق

Materials and Methods

1- فصل ومقايسة مزائج عدة فيتامينات كممزيج (A,E) ممثل عن الفيتامينات الذوابة بالدسم ومزيج فيتامينات (B1,B6,B12) كممزيج عن الفيتامينات الذوابة بالماء باستخدام طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز .

2- فصل المزائج السابقة بطريقةٍ تحليليةٍ مختلفةٍ هي الطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية

1- فصل ومقايسة مزائج عدة فيتامينات كمزيج (A,E) ممثل عن الفيتامينات الذوابة بالدسم ومزيج فيتامينات (B1,B6,B12) كمزيج عن الفيتامينات الذوابة بالماء باستخدام طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز .

1- المواد الكيميائية و الكواشف: Chemicals and Reagents:

- ميتانول (HPLC GRADE) شركة (Merck - Germany)
- أسيتونتريل (HPLC GRADE) شركة (Merck - Germany)
- ماء (HPLC GRADE) شركة (Merck - Germany)
- حمض خل ثلجي من شركة (Merck - Germany)
- كبريتات الهكسان الحامضية من شركة (Sigma Aldrich - Germany).

2- المعايرات والعينات (Standards and samples):

- معياري فتيامين A primary standard بشكل أسيتات من شركة Sigma Aldrich (Germany)- معياري فيتامين E ألفاتوكوفيرول بشكل أسيتات من شركة Sigma Aldrich.
- معياري فيتامين B1 ثيامين هدروكلورايد من شركة Sigma Aldrich.
- معياري فيتامين B6 بيريدوكسين هيدروكلورايد من شركة Sigma Aldrich
- معياري فيتامين B12 سيانوكوبالامين من شركة Sigma Aldrich
- كبسولات تحتوي على فيتامين A وفيتامين E تحت أسماء تجارية لشركات محلية تم الحصول عليها من صيدلية المجتمع تحتوي على فيتامين A أسيتات 30000 وحدة دولية و فيتامين E 80 mg .
- مضغوطات تحتوي على كل من فيتامينات B1 و B6 و B12 تم الحصول عليها من صيدلية المجتمع تحتوي على فيتامين B1 بكمية 100mg وفيتامين B6 بكمية قدرها 100mg و فيتامين B12 بكمية 1000µg .

3- الأجهزة والأدوات المستخدمة (Apparatus and materials):

- جهاز الكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز: نوع (HITACHI) ياباني الصنع مكون
- من مضخة نوع: (HITACHI – VWR/2130)
- مقتطع آلي نوع: (Auto sampler – L2200) نوع (HITACHI – Merck)
- عمود الطور العكوس (C18) نوع: (Nucleodur) (150mm * 4mm) (5µm) .
- عمود الطور العكوس (C18) نوع (Knauer) (150mm * 4mm) (5µm)
- مكشاف الأشعة فوق البنفسجية متغير طول الموجة (UV – VIS detector) نوع: (VWR – HITACHi) .
- جهاز الأمواج فوق الصوتية نوع: Grant ياباني الصنع .
- جهاز قياس الحموضة نوع:(Orion 410 A) أمريكي الصنع .
- مراشح 0.45µm نوع: (TPP) Spritzen و أخرى من شركة (Sartorius stadium).
- ميزان حساس نوع: (Sartorius).
- ميزان حساس نوع: (Shimadzu) ياباني .
- دوارق معايرة عاتمة لها الحجوم (100ml، 50ml ، 10ml) و ممصات معايرة بحجوم (0.5ml ، 1ml ، 2ml ، 4ml ، 5ml) و زجاجيات ذات حجوم مختلفة و micropipette مدرج من 1µl – 100µl.

4- تحضير المحاليل (Solutions):

4 -1- الطور المتحرك لفيتامينى A,E (Mobile phase):

- جرى تحضير طور متحرك بمزيج من الميتانول والأسيتونتريل الخاصة بجهاز HPLC بالنسب 95%، 5% على الترتيب أي أن كل 1 ليتر يحتوي على 950 ml ميتانول + 50ml أسيتونتريل

4-2- الطور المتحرك لفيتامينات B1,B6,B12(Mobile phase):

- جرى تحضير طور متحرك هو المزيج 730ml ماء HPLC + 260ml ميتانول HPLC + 10ml حمض الخل الثلجي يضاف للمزيج 1.4g كبريتات الهكسان جرى الحصول على محلول pH له 2.8

4-3- تحضير المحلول المعياري الأم لمزيج فيتامينى AوE (standard solution of A,E):

- جرى تحضير هذا المحلول فيتامين E أسيتات وهو بقوام زيتي وزنة تعادل 80mg .
- أما بالنسبة للفيتامين A فكانت كميته محددة بالوحدة الدولية لذا من أجل التجانس بين تحضير محلول العينة ومحلول المعياري جرى إجراء التحويل كل 1mg من المعياري تعادل 507 وحدة دولية من المعياري . وبالتالي فإن كل 30000 وحدة دولية تعادل جرى وزن59.2mg من الفيتامين A بشكل أسيتات وهو ذو قوام حثيري محمل على حامل ما يذاب بداية الفيتامين A ب 5ml ماء HPLC ضمن بيشر ثم يضاف له قليل من الميتانول HPLC .
- بينما يذاب الفيتامين E في بالون معايرة سعة 100mlبقليل من الميتانول ثم يضاف له محلول الفيتامين A ويكمل الحجم إلى 100ml ضمن دورق معايرة حجمي سعة 100ml بالميتانول HPLC وهذا هو المحلول المعياري الأم للفيتامين A و E الحاوي على 80mg E و59.2mg A/ 100ml.
- أي يحوي على 0.8mg فيتامين E /1ml و يحوي على 0.6mg تقريباً فيتامين A /1ml .

4-3-1- تحضير محلول العمل المعياري من المحلول المعياري الأم لفيتاميني A و E (Stock standard solution from standard solution of vitamin A,E).

- يؤخذ من المحلول السابق 6.250ml وتكمل إلى 100ml ضمن دورق معاير نحصل على محلول يحوي تركيز 1ml / 50µg من فيتامين E و1ml / 37.5µg فيتامين A.
- **4-4- تحضير المحلول المعياري الأم لفيتامينات B1 , B6 , B12(Vitamin B1,B6,B12 standard solution)**

- يتم تحضير هذا المحلول وفق الخطوات التالية:
- يوزن بدقة وزنة من المعياري لكل من فيتاميني B1 , B6 تقدر ب10 mg .
- تذاب بماء HPLC وتنقل إلى بالون معايرة سعة 50ml .
- يوزن بدقة وزنة من المعياري للفيتامين B12 تقدر ب 10mg وتذاب بالماء المقطر وتنقل حجمياً لبالون معاير سعة 50 مل ويكمل الحجم إلى خط العيار فنحصل على تركيز لفيتامين B12 قدره 1ml / 0.2mg .
- يؤخذ 1ml من المحلول السابق للفيتامين B12 ويكمل الحجم بالماء HPLC إلى 10mlيصبح التركيز 1ml / 20µg .
- يؤخذ 5ml من المحلول الأخير وتنقل حجمياً إلى البالون الحاوي على كل من فيتاميني B1 , B6 ويكمل الحجم إلى 50 مل (أي إلى خط العيار)
- يصبح المحلول الأخير حاويا على كل من B1 , B6 بتركيز 1ml / 0.2mg و B12 بتركيز 1ml / 0.002mg .

- أي إن تركيز B1 , B6 أعلى ب 100 ضعف من تركيزB12 وهو المناسب لما عليه في الشكل الصيدلاني .
- نحتفظ بالمحلول المعياري الأم للفيتامين B12 المحضر بتركيز1ml / 0.2mg لاستخدامه لاحقا .

-

- **4-5- تحضير محاليل العينات (samples solutions):**

4-5-1- تحضير محلول العينة المحتوية على فيتاميني A و E (sample solution of A,E):

- تؤخذ كبسولات تحتوي على فيتاميني A و E لإحدى الشركات المحلية X1.
- يوزن محتوى 20 كبسولة ويحسب الوزن الوسطي أي وزن محتوى 20 كبسولة مقسوماً على عددها فنحصل على الوزن الوسطي لمحتوى كبسولة واحدة .
- أخذ من الوزن السابق بعد مجانسته وزنة معادلة لمحتوى كبسولة واجدة .

أي وزن محتوى 20 كبسولة كان 6.312 غ .

الوسطي 6.312÷20 =0.3156 غ .

ينقل الوزن الوسطي لمحتوى الكبسولة إلى دورق معاير سعة 100ml ويذاب ب 5ml ماء HPLC حيث يرج باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية 5 دقائق ثم يكمل الحجم باستخدام الميتانول HPLC إلى 100ml.

نكون بذلك قد حضرنا محلول للعينة يحوي على تركيز فيتامين E 80mg / 100ml فيتامين A 59.2mg/ 100ml.

وهو نفس التركيز الذي حضر به المحلول المعياري الأم .

4-5-1-1- تحضير محلول العمل (stock sample solution):

- يؤخذ من المحلول الأم للعينة حجماً قدره 6.250 مل ينقل إلى دورق معاير سعة 100 مل ويكمل الحجم إلى 100 مل باستخدام الميتانول HPLC فنحصل بذلك على محلول يحوي على: فيتامين A 1ml / 37.5µg و فيتامين E 1ml / 50µg.

4-5-2- تحضير محلول العينة المحتوية على فيتامينات B1,B6,B12 (sample solution B1.B6,B12):

- يؤخذ 20 مضغوطة لأحد المستحضرات مصنعة محليا لشركة X2 .
- توزن 20 مضغوطة ويحسب الوزن الوسطي (وزن 20 مضغوطة 6.932 غ) يتم طحن المضغوطات وتحويلها إلى مسحوق يؤخذ من المسحوق وزنة معادلة للوزن الوسطي لمضغوطة واحدة (الوزن الوسطي لمضغوطة واحدة 0.3466 غ) .
- يحل بالماء HPLC وذلك بوضعها على جهاز الأمواج فوق الصوتية مدة 10 دقائق حتى تمام الانحلال ثم تنقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 100ml ويكمل الحجم إلى

100ml ماء HPLC فنحصل على التراكيز:

1ml / B12:0.01mg . 1ml / B6:1mg . 1ml / 1mg :B1

4-6- تحضير محاليل الخطية (Lnear solutions):

4-6-1- تحضير محاليل الخطية لفيتاميني A و E (Linear solutions A,E):

- جرى التحضير اعتباراً من محلول العمل المعياري لكل من الفيتامين A و E المحضر بتركيز 1ml / 50µg لفيتامين E و بتركيز 1ml / 37.5µg لفيتامين A .
- تحضر تراكيز بالنسب التالية: 80% -90%-100%-110%-120%-130% أي بتراكيز (للفيتامين E): 1ml / 20µg – 1ml / 22.5µg – 1ml / 25µg – 1ml / 27.5µg – 1ml / 30µg – 1ml / 32.5µg.
- فكانت تراكيز الفيتامين A في المحاليل المحضرة: 1ml / 15 µg – 1ml / 16.875µg – 1ml / 18.75µg – 1ml / 20.625µg – 1ml / 22.5µg – 1ml / 24.375µg.
- يتم تحضير هذه التراكيز بأخذ الحجوم التالية من محلول العمل المعياري لتحضير التراكيز السابقة على التوالي:
- محلول رقم 1: 4ml ويكمل الحجم بالميتانول إلى 10ml .
- محلول رقم 2: 4.5ml ويكمل الحجم بالميتانول إلى 10ml.
- محلول رقم3: 5ml ويكمل الحجم بالميتانول إلى 10ml .
- محلول رقم 4: 5.5ml ويكمل الحجم بالميتانول إلى 10ml.
- محلول رقم 5: 6ml ويكمل الحجم بالميتانول إلى 10ml .
- محلول رقم 6:6.5ml ويكمل الحجم بالميتانول إلى 10ml .

4-6-2- تحضير محاليل الخطية لفيتامينات: B1 , B6 , B12 (linear solutions B1,B6,B12):

- من المحلول المعياري الأم للفيتامينات B1 , B6 , B12 تحضر محاليل بتراكيز 80% 90% 100% 110% 120% 130%

- محلول رقم 1:تحضير التركيز 80% - 1ml / 20µg لكل من B1 , B6 .
- يؤخذ من المحلول المعياري الأم 2مل ويكمل الحجم إلى 10ml نحصل على التركيزB12: 4µg - B1 , B6 هو 2ml / 400µg ويكمل الحجم بالماء HPLC إلى 10ml فنحصل على تركيز 1ml / 40µg .
- يحضر من المحلول المعياري الأم للفيتامين ب12 الذي يحتوي على تركيز0.2mg/ml تركيزاً قدره 1ml / 40µg بأخذ 2ml من المحلول الأم ونقلها إلى دورق معاير سعة 10ml وإكمال الحجم إلى 10ml بالماء HPLC .
- يأخذ 5ml من المحلول المحضر بتركيز 1ml / 40µg ل B1 , B6 و B12 1ml / 0.4µg و 5ml من المحلول المحضر من B12 بتركيز1ml / 40µg وينقل الحجمان إلى دورق معاير سعة 10ml فنحصل على تركيز جديد هو B1 , B6 1ml / 20µg – 1ml / 20.2µg B12.

أي قمنا برفع تركيز الفيتامين B12 من أجل أن يتمكن المتحري من تحسس تركيزه.

- محلول رقم2:تحضير محلول بتركيز 90%:
- يؤخذ2.25 مل من المحلول المعياري الأم ويكمل الحجم إلى 10ml في بالون معاير سعة 10 مل فنحصل على تركيز 1ml / 45µg.
- يؤخذ 5ml من هذا المحلول ويوضع في بالون سعة 10mlيضاف له 5ml من محلول فيتامين B12 بتركيز 1ml / 40µg نحصل على محلول جديد يحتوي على فيتامين B1 , B6 بتركيز (1ml / 22.5µg) و فيتامين B12 (1ml /20.225µg) .

محلول رقم 3: تحضير محلول بتركيز 100%:

- يؤخذ من المحلول الأم المعياري حجما قدره 2.5 مل تنقل إلى دورق معايرة سعة 10ml ويكمل الحجم بالماء HPLC إلى 10ml فنصل على (1ml/50µg) B1 , B6 (1ml / 0.5µg) B12 .
- يؤخذ من هذا المحلول 5ml ويضاف له 5ml من محلول فيتامين B12 40µg / 1ml فنحصل على محلول يحتوي علىB1 , B6 (1ml / 25µg) B12 : 1ml /20.25µg

- محلول رقم 4: تحضير محلول بتركيز 110%:
- يؤخذ من المحلول المعياري الأم 2.75 مل (550µg)B1, B6إلى 10mlبالماء HPLC ضمن دورق معاير 10ml.

- ثم يؤخذ منه 5ml(275µg) توضع في دورق معاير سعة 10mlويضاف لها 5ml من محلول فيتامين B12 المعاير (1ml / 40µg) فنحصل على تركيز 1ml / 27.5µg B1, B6 فيتامين B12 (1ml / 20.275µg) .

- محلول رقم 5:تحضير محلول بتركيز 120 % .
- يؤخذ من المحلول المعياري الأم 3ml تنقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10ml يكمل الحجم بماء HPLC إلى خط العيار نحصل على تركيز فيتامين B1, B6 (60µg / 1ml) .
- يؤخذ من المحلول السابق 5ml ينقل حجماً إلى دورق معاير سعة 10ml ثم يضاف له 5ml من المحلول المعياري لفيتامين B12 تركيزه 1ml / 40µgفنحصل على محلول يحتوي على تركيز:B1, B6 1ml / 30µg و B12 1ml / 20.3µg.
- محلول رقم 6: تحضير محلول تركيزه 130%:
- يؤخذ من المحلول الأم للفيتامينات الثلاثة حجماً قدره 3.25ml ينقل إلى دورق معاير سعة 10 مل ويكمل الحجم ماء HPLC إلى 10ml نحصل على تركيز:65µg / 1ml B1 , B6 .
- يؤخذ منه 5ml (325µg B1 , B6) و تنقل لدورق معاير سعة 10ml.
- يؤخذ من المحلول الأم المعياري للفيتامين B12 1ml / 40µg 5mlوتنقل إلى الدورق السابق فنحصل على تركيز B1, B6 (32.5µg / 1ml)B12 (1ml / 20.325µg) .

4-7- تحضير محاليل المضبوطية (Accuracy solutions):

طريقة (spiking):

4-7-1- محاليل المضبوطية لفيتاميني AوE (Accuracy solutions)

جرى تحضير محاليل ثلاثة بتركيز 80 % من المعياري – ثلاثة منها بتركيز 100% من المعياري – ثلاثة منها بتركيز 120 % من المعياري وهو ما يتوافق مع التراكيز 1ml / 20µg – 1ml / 25µg – 1ml / 30µg للفيتامين E و 1ml / 15µg – 1ml / 18.75µg – 1ml / 22.5µg للفيتامين A على الترتيب وفق الخطوات التالية:

- تحضير محلول بتركيز 80%:
- يؤخذ محلول العمل المعياري للفيتامين A , E المحتوي على فيتامين A 37.5µg / 1ml و فيتامين E 50µg / 1ml .
- يؤخذ محلول العمل للعينة المحضر بتركيز 50µg/ml فيتامين E وفيتامينA 37.5µg / 1ml.
- من محلول العمل للعينة نحضر المحلول بتركيز 80% (20µg / 1ml) E .
(15µg / 1ml) A .
- يؤخذ 4ml من محلول العمل للعينة ينقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10mlويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml:

4ml تحوي فيتامين E: 4×50 = 200µ و فيتامين A: 37.5×4= 150µg

- يكمل الحجم إلى 10ml يصبح التركيز فيتامين E:20µg / 1ml

فيتامين A: 15µg / 1ml

وهذا يمثل التركيز 80% .

- تحضير التركيز 100% بطريقة spike:

فيتامين E:25µg / 1ml– فيتامين A: 18.75µg / 1ml .

- يؤخذ من محلول العمل المعياري 3ml تحتوي على فيتامين E (150µg) فيتامينA (112.5µg) يضاف لها 5ml من المحلول ذو التركيز 80% المحضر من محلول العمل للعينة فقط يحوي (فيتامينE 100µg، فيتامين A 75µg) .
- يوضع المزيج في دورق معاير سعة 10ml ويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml نحصل على محلول يحوي على فيتامين E 250 µg / 10ml و فيتامين A 187.5µg/ 10ml .أي بتركيز 25µg / 1ml فيتامين E 18.75µg / 1ml فيتامين A وهو الذي يمثل التركيز 100% من المعياري .
- تحضير التركيز 120% بطريقة spike:
- يؤخذ من محلول العمل المعياري حجم قدره 4ml ينقل حجمياً لبالون معاير سعة 10ml.
- يؤخذ من محلول التركيز 80% (المحضر من محلول العمل للعينة) حجماً قدره 5ml تضاف إلى الحجم السابق في دورق المعايرة يكمل الحجم إلى 10mlبالميتانول HPLC
- فنحصل على محلول يحتوي على فيتامين E (30µg / 1ml) فيتامين A (22.5µg / 1ml) وهو التركيز المقابل للنسبة 120% لكلا الفيتامينين .

4-7-2- تحضير محاليل المضبوطية لفيتامينات:B1,B6,B12

- تحضير محاليل بتراكيز(20 - 25 – 30) µg / 1ml لكل من B1,B6 .
- المحلول الأم للعينة حضر سابقاً يحوي على تراكيز 1mg / 1ml لكل من B1,B6 فيتامين B12 0.01mg / 1ml.
- المحلول الأم المعياري يحوي على: فيتامين B1: 200µg / 1ml و فيتامين B6: 200µg / 1ml و فيتامين B12: 2µg / 1ml.

تحضير محلول بتركيز 20µg / 1ml:

- يؤخذ من محلول العمل للعينة حجماً قدره 0.4ml باستخدام micropipette مدرج من 1الى 100 ميكرون .
- يوضع في دورق معاير حجمه 10ml ويكمل الحجم إلى 10ml بالماء HPLC نحصل على تركيز B1,B6 (40µg / 1ml) .
- يؤخذ من المحلول المعياري الأم الفيتامين B12 2ml (400µg) يكمل الحجم إلى 10ml ماء HPLC نحصل على تركيز (40µg / 1ml) .
- يؤخذ من كل محلول من المحاليل الأخيرة (5ml) من كل بالون توضع في دورق معاير سعة 10ml نحصل على B1,B6تركيز 20µg / 1ml وفيتامين B12 20.2µg/ml
- تحضير محلول بتركيز 25µg / 1mlبطريقة spike:
- من المحلول المعياري الأم لفيتامينات B1,B6,B12 يؤخذ 2.5ml وينقل حجمياً إلى بالون معاير سعة 10ml نحصل على تركيز فيتامين B1,B6 (50µg / 1ml) .
- يؤخذ 0.4ml من محلول الأم للعينة ينقل حجمياً إلى بالون سعة 10ml نحصل على تركيز 40µg / 1ml لكل من B1,B6 ، يؤخذ منه 5ml .
- يؤخذ 4ml من المحلول المعياري الأم للفيتامين B12 ويكمل الحجم في دورق معاير سعة 10ml باستخدام الماء HPLC نحصل على تركيز الفيتامين B12 80µg / 1ml .
- يؤخذ من كل دورق 5ml وينقل حجمياً إلى دورق سعة 10ml نحصل على تركيز 20µg / 1ml لكل من فيتاميني B1,B6 40.2µg / 1ml من فيتامين B12
- يؤخذ من الدورق الأخير 5ml فتحوي على 100µg (B1,B6) و B12 (201µg)

- ينقل حجمياً إلى دورق معاير سعة (10ml) ويضاف لها 3ml من محلول العمل المعياري (1ml / 50µg) B1,B6 ويكمل الحجم بماء HPLC إلى 10ml نحصل على تركيز: (ml / 25µg) لكل من B1,B6، فيتامينB12: (1ml / 20.25µg).

- تحضير محلول بتركيز 120% من المعياري بطريقة spike:

- بنفس الطريقة السابقة جرى أخذ 5ml من محلول العينة تحتوي B1,B6(100µg) B12 (201µg) وتنقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10ml يضاف إليه 4ml من محلول العمل المعياري نحصل على تركيز فيتامين B1 و B6 (1ml / 30µg) و فيتامين B12 (1ml / 20.3µg) .

- **4-8- تحضير محاليل الدقة:**

- **4-8-1- الدقة التكرارية (repeatability):**

4-8-1-1- الدقة التكرارية لفيتاميني A و E (repeatability A,E):

- من محلول العمل للعينة المحضر بتركيز (1ml / 50µg) للفيتامين E و (37.5µg / 1ml) للفيتامين A .
- يؤخذ من المحلول الأم 5ml ينقل إلى دورق معاير سعة 10ml ويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml . وبذلك نحصل على تركيز فيتامين E (25µg / 1ml) وتركيز فيتامين A (1ml / 18.75µg) ، وهذا التركيز يعبر عن التركيز 100% من التركيز المعياري .

4-8-1-2- تحضير محاليل الدقة التكرارية لفيتامينات B1,B6,B12 (repeatability):

- يؤخذ من المحلول الأم للعينة المحتوية على فيتامينات (B1,B6,B12) 0.5ml يكمل الحجم إلى 10mlماء HPLC ضمن دورق معاير سعة 10ml نحصل على تركيز لكل من (B1,B6) 1ml / 50µg وتركيز B12 0.5µg / 1ml.
- يؤخذ من المحلول السابق 5ml تنقل حجمياً إلى دورق سعة 10ml يضاف لها 5ml من محلول العمل المعياري للفيتامين B12 المحضر بتركيز ml / 40µg نحصل على تركيز (B1,B6) 1ml / 25µg و B12 20.25µg / 1ml.

4-8-2- تحضير محاليل الدقة الوسطى (Intermediate Precision):

4-8-2-1- تحضير محاليل الدقة الوسطى لمزيج فيتامينيA وE

(Intermediate precision):

- جرى تحضير 9 محاليل موزعة ضمن 3 مجموعات وذلك انطلاقاً من محلول العمل للعينة المحضر بتركيز 1ml / 50µg للفيتامين E و 1ml / 37.5µg للفيتامين A : يحتوي 3 منها على فيتامين E (1ml / 20µg) و فيتامين A (1ml / 15µg) .
- يحتوي 3 منها على فيتامين E (1ml / 25µg) و فيتامين A (1ml / 18.75µg).
- يحتوي 3 منها على فيتامين E (1ml / 30µg) و فيتامين A (1ml / 22.5µg) .

جرى التحضير على النحو التالي:

- المجموعة الأولى:
- يؤخذ 4ml من محلول العمل للعينة وينقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10ml ويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml نحصل على التراكيز التالية لكل من الفيتامين A و E على التوالي 1ml / 15µg و 1ml / 20µg وهذا يمثل التركيز 80 % من المعياري .
- المجموعة الثانية:
- يؤخذ 5ml من محلول العمل للعينة وينقل حجمياً لبالون معاير سعة 10ml ويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml نحصل على التراكيز التالية لكل من الفيتامين A و E على التوالي 1ml / 18.75µg و 1ml / 25µg وهذا يمثل التركيز 100 % من المعياري .
- المجموعة الثالثة:
- يؤخذ 6ml من محلول العمل للعينة وينقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10ml ويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml نحصل على التراكيز التالية لكل من الفيتامين A و E عل التوالي 1ml / 22.5µg و 1ml / 30µg وهذا يمثل التركيز 120 % من المعياري.

- **4-8-2-2- تحضير محاليل الدقة الوسطى لفيتامينات B1,B6,B12**

(Intermediate precision B1,B6,B12):

- جرى تحضير 9 محاليل موزعة ضمن 3 مجموعات وذلك انطلاقاً من محلول العمل للعينة المحضر بتركيز 1ml / 50µg.

- يحتوي 3 منها على (B1,B6) 1ml / 20µg .
- يحتوي 3 منها على فيتامين (B1,B6) 1ml / 25µg .
- يحتوي 3 منها على فيتامين (B1,B6) 1ml / 30µg .
- يؤخذ 0.4ml من المحلول الأم للعينة يحتوي على (B1,B6) 400µg تنقل إلى دورق معاير سعة 10ml ويكمل الحجم إلى 10ml ماء HPLC و يؤخذ من المحلول السابق 5ml تنقل إلى دورق معاير سعة 10ml.
- يؤخذ 5ml من المحلول العمل المعياري للفيتامين ب12 المحضر بتركيز 40µg / 1ml وتضاف إلى الدورق السابق فنحصل على محلول يحتوي فيتامين (B1,B6) بتركيز 1ml / 20µg و فيتامين B12 بتركيز 1ml / 20.20µg وهو التركيز الممثل ل80% من المعياري .
- المجموعة الثانية الحاوية على تركيز (B1,B6) 1ml / 25µ:
- يؤخذ 0.5ml من المحلول الأم للعينة ينقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10mlويكمل الحجم إلى 10mlماء HPLC .
- يؤخذ من المحلول السابق 5ml تنقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10ml يضاف له 5ml من محلول العمل المعياري للفيتامين B12 ذو التركيز 1ml / 40µg فنحصل على تركيز (B1,B6) 1ml / 25µg و B12 بتركيز ml / 20.25µg .
- المجموعة الثالثة:
- يؤخذ 0.6ml من المحلول الأم للعينة تنقل حجمياً إلى دورق معاير سعة 10 مل ويكمل الحجم بماء HPLC إلى 10ml.
- يؤخذ من المحلول السابق (5ml) ينقل إلى دورق معاير سعة 10ml يضاف له 5ml من محلول العمل المعياري من فيتامين B12 (1ml / 40µg) نحصل على محلول يحوي تركيز B1,B6 (ml / 30µg) و B12 (1ml / 20.3µg) وهو التركيز الممثل ل120% من المعياري .

4-9- تحضير محاليل الانتقائية (specificity solutions):

- جرى التحضير بطريقة spiking:

4-9-1- تحضير محاليل الانتقائية لفيتاميني A,E (specificity solutions A,E):

- المحلول رقم 1: محلول بتركيز (1ml / 25µg)فيتامين E و (18.75µg / 1ml)فيتامين A .

- جرى تحضيره بأخذ 5ml من محلول العمل المعياري ونقلها حجمياً إلى دورق معاير سعة 10ml ويكمل الحجم بالميتانول HPLC إلى 10ml فنحصل على تركيز فيتامين E (1ml / 25µg) وفيتامين A (1ml / 18.75µg) من المعياري أي بتركيز 100% من محاليل الخطية .
- المحلول يحضر بتركيز 1ml / 25µg فيتامين E و فيتامين A (1ml / 18.75µg) كما هو الحال في تحضير محلول التركيز 100%من محاليل المضبوطية أي بطريقة spike .
- **4-9-2- تحضير محاليل الانتقائية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12:**
- المحلول رقم 1: يمثل المحلول المحضر من المعياري الأم يحضر بتركيز 25µg / 1ml (B1,B6) كما هو الحال في تحضير المحلول رقم 3 من محاليل الخطية وتركيز 1ml / 20.25µg للفيتامين B12 .
- المحلول رقم 2: يمثل المحلول المحضر بتركيز(1ml / 25µg) لكل من B1,B6 و المحلول المحضر بتركيز 1ml / 20.25µg للفيتامين B12 بطريقة spike كما هو وارد في تحضير محاليل المضبوطية .

4-10- محاليل المتانة (Robustness solutions):

4-10-1- تحضير محاليل المتانة لفيتاميني AوE (robustness solutions A,E):

- حضر محلول (A و E) فيتامين A 1ml / 18.75µg و فيتامين E 1ml / 25µg من محلول العمل للعينة كما هو الحال في تحضير محلول الدقة التكرارية أو المحلول ذو التركيز 100% من المعياري في فقرة الدقة الوسطى ودرست المتانة عند تغيير معدل التدفق .

4-10-2- تحضير محاليل المتانة لفيتامينات B12,B6,B1 (robustness solutions):

أيضا كما هو الحال في تحضير محلول الدقة التكرارية لهذه الفيتامينات أو محلول ذو التركيز 100% من المعياري من محاليل الدقة الوسطى أيضا درست المتانة عند تغير معدل التدفق .

2- فصل المزائج السابقة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

1- المواد الكيميائية والكواشف: Chemicals and Reagents:

- ميتانول (HPLC GRADE) شركة (Merck - Germany).
- ماء (HPLC GRADE) شركة (Merck- Germany).
- حمض كلور الماء المركز 37% من شركة (Merck - Germany).
- بروبان – 2 – ول من شركة (Panereac)

2- المعياريات والعينات (Standards and samples):

- نفسها التي تم استخدامها عند العمل على جهاز (HPLC)

3- الأجهزة والأدوات المستخدمة (Apparatus and materials):

- جهاز الأمواج فوق الصوتية نوع: Grant ياباني الصنع .
- جهاز التحليل الطيفي الاشتقاقي نوع: (JASCOW -V- 630) ثنائي الحزمة الضوئية (double beam).
- محافد نوع (Quartz Qs) من أجل قراءة العينات المحضرة .
- **4- تحضير المحاليل (preparation of solutions):**

تم تحضير المحاليل كما هو الحال في التحضير عند العمل على جهاز HPLC مع استبدال الماء(HPLC) كمحل لمزيج فيتامينات (B1,B6,B12) بحمض كلور الماء Hcl 0.1N حيث تم تحضيره على النحو التالي:

4-1- تحضير محلول حمض كلور الماء 0.1N (solution HCL 0.1N):

جرى التحضير من حمض كلور الماء المركز 37% كما يلي:

37% تعني 37g / 100ml أو 370g / 1000ml .

عدد المولات = كتلة المادة ÷ الكتلة المولية = 370 ÷ 36.5مول

بما أن حمض كلور الماء وحيد الوظيفة .

هذا يعني أن 37.5\ 370 M Hcl هو نفسه 370/36.5 N

باستخدام القانون: $N1 * V1 = N2 * V2$

$V1$=? $N1$=370/36.5N

التركيز المطلوب تحضيره $N2$ = 0.1N

$$V2 = 1000ml$$

$$\frac{370}{36.5} * V1 = 1000 * 0.1$$

$$V1 = 100 * 36.5/370$$

يؤخذ 8.33 مل من 37% Hcl .

أما فيما يتعلق بتحضير محاليل مزيج (Aو E) فقد جرى العمل بداية على محل بروبان-2- ول كمذيب للفيتامينات A,E ولكن عند دراسة المخطط الطيفي لوحظ ظهور قمةٍ وحيدةٍ فقط عندها قمنا بالتحقق فوجد أن هذه القمة هي قمة فيتامين E فقط أي أنّ فيتامين A لم تظهر قمته بسبب عدم تحرره من حامله لذا لم نوفق في استخدام هذا المحل فكان لابد من القيام باختيار محل آخر فوقع الاختيار على الميتانول 95% والماء 5% كمزيج لكي نتمكن من جعل الفيتامين A يتحرر من حامله واستخدام مذيب Hcl (0.1N)في تحضير محاليل مزيج فيتامينات B1,B6,B12

- تحضير المحاليل الأم للمعياريات والعينات لكلا مزيجي الفيتامينات الذوابة بالماء والذوابة بالدسم وتحضير محاليل العمل منها كما هو الحال في التحضير عند العمل على جهاز HPLC واستبدال الماء HPLC بمحلول Hcl (0.1N)**في مزيج B.**
- جرى التحضير بنفس الطريقة لكل من المحاليل التالية:
- الخطية .
- المضبوطية .
- الدقة الوسطى .
- الدقة التكرارية .
- النوعية .

الفصل الثاني

النتائج

1- الفصل والمقايسة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

1-1 الدراسة الكيفية وتعيين الشروط الملائمة لفصل مزائج الفيتامينات المدروسة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

1-2 نتائج مصدوقية طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

2- الفصل والمقايسة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز.

2-1 الدراسة الكيفية وتعيين الشروط الملائمة لفصل مزائج الفيتامينات المدروسة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز .

2-2 نتائج مصدوقية طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز .

1- الفصل والمقايسة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

1-1- الدراسة الكيفية وتعيين الشروط الملائمة لفصل مزائج الفيتامينات المدروسة بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

تتميز هذه الطريقة بأنها لا تحتاج إلى ضبط شروطٍ معقدةٍ كضبطٍ لحجم الحقنة أو ضبط لدرجة الحرارة إلا إذا كانت المواد المدروسة تتأثر بها كما في حال العمل على جهاز الكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز وهذه ميزةٌ أخرى تضاف إلى هذه الطريقة التحليلية فقط نحتاج فيها إلى ضبط طول الموجة للمادة (المواد)المحللة كل على حده في الرتبة صفر وفي الرتبة الاشتقاقية أيّاً كانت الرتبة الاشتقاقية وذلك باستخدام مواد معيارية للمركبات المدروسة وتحديدها في الرتبة صفر وفي الرتبة الاشتقاقية التي تتم فيها الدراسة (حيث أن الدراسة تعتمد على إجراء مسح طيفي ضمن مجال UV 200nm – 400nm للمزائج المدروسة فنحصل على مخطط الرتبة صفر ومن ثم تحديد رتبة الاشتقاق التي سنعمل عليها لكل مزيج حيث جرى اشتقاق مزيج فيتاميني (EوA) من الرتبة الثالثة أما مزيج (B1,B6,B12) جرى اشتقاقه من الرتبة الثانية أي أننا عملنا على الدراسة لكلا النوعين من الرتب الاشتقاقية التي ذكرناها ضمن الدراسة النظرية أي الرتب الزوجية (2) والفردية (3).

1-2- نتائج مصدوقية طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي .

1-2-1- الخطية:

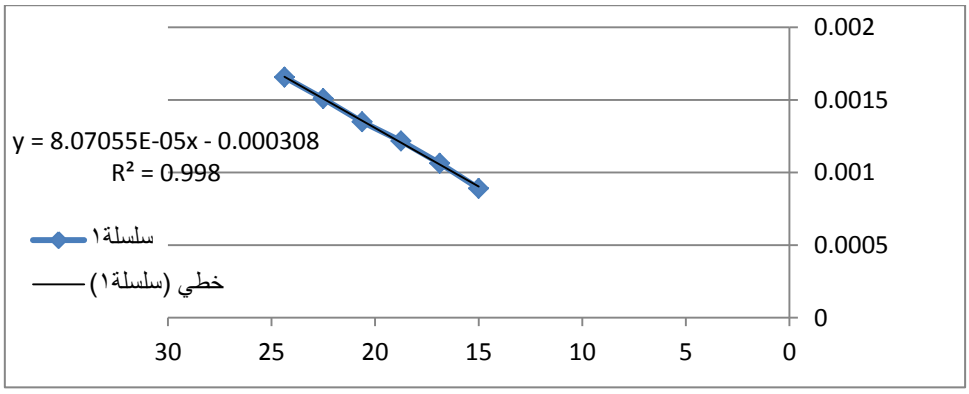
- جرى التحقق من خطية الطريقة التحليلية من خلال حقن المستويات الستة المحضرة سابقاً وكرر كل مستوى منها ثلاث مراتٍ ثم رسم الخط البياني الممثل للعلاقة بين مساحة قمة الفيتامين مع تركيزه كما نحدد هنا معادلة الارتداد الخطي (liner Regression Equation) والتي نستخدمها من أجل حساب التراكيز العملية .
- أما في حالة الفيتامين B12 فقد جرى تحديد المعادلة بين التراكيز العائدة للفيتامين ومعامل الاستجابة والذي حصلنا عليه من ناتج قسمة مساحة السطح تحت المنحني للفيتامين B12 بالتركيز المحضر فيه بعد رفعه بمقدار 20µg أي التركيز القاعدي مثلاً 20.2µg على مساحة السطح تحت المنحني لتركيز 20µg وترمز (RF) ويدعى (معامل الاستجابة).

1-1-2-1- نتائج الخطية بالطريقة الطيفية الاشتقاقية لفيتامين A:

الجدول (4):خطية فيتامين A بالطريقة الاشتقاقية

Level	Theo. Con	Area(A)	Mean
1		0.0008948	
1	15µg/ml	0.0008876	0.000891
1		0.0008906	
2		0.0010673	
2	16.875 µg/ml	0.0010594	0.00106361
2		0.00106412	
3		0.0012136	
3	18.75µg/ml	0.0012208	0.0012172
3		0.0012172	
4		0.0013478	
4	20.625µg/ml	0.0013512	0.0013492
4		0.0013486	
5		0.0015102	
5	22.5µg/ml	0.0015084	0.00150873
5		0.0015076	
6		0.00175112	
6	24.375µg/ml	0.0017603	0.001756773
6		0.0017589	

- مخطط الخطية لفيتامين A : يمثل هذا المخطط العلاقة بين مساحة السطح تحت المنحني لفيتامين A وتركيزه حيث تعطي هذه العلاقة كلا من:



الشكل (25): منحني التعيير لفيتامين A

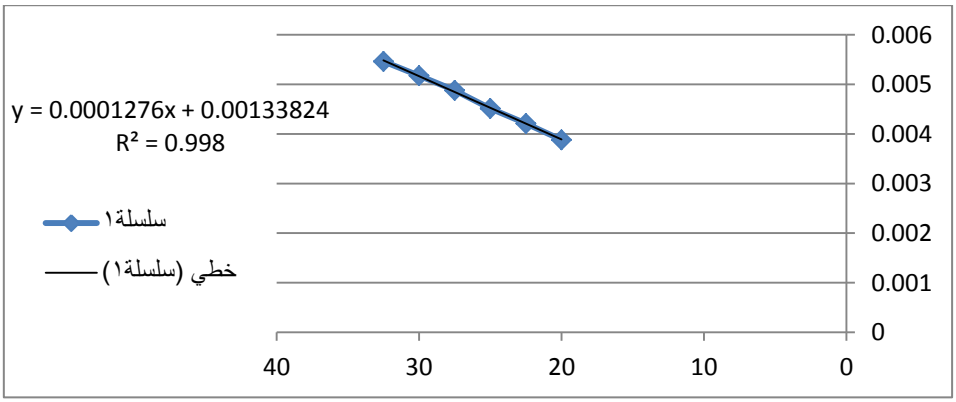
- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين A:

$$Y = 8.07055 * 10^{-5}X - 0.000307807$$

- قيمة معامل الارتباط الخطي: $R^2 = 0.998$

2-1-2-1- نتائج الخطية بالطريقة الطيفية لفيتامين E:

- منحني التعيير لفيتامين E:



الشكل (26): منحني التعيير لفيتامين E

- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين E:

$$Y = 0.000127585X + 0.00133824$$

- معامل الارتباط الخطي:

$$R^2 = 0.998$$

الجدول (5): نتائج خطية فيتامين E بالطريقة الاشتقاقية

Level	Theo. con	Area(E)	Mean
1		0.0038278	
1	20µg/ml	0.0039391	0.003883
1		0.0038821	
2		0.0042364	
2	22.5 µg/ml	0.0041871	0.0042101
2		0.0042068	
3		0.0045331	
3	25µg/ml	0.0044792	0.004513
3		0.0045267	
4		0.0049280	
4	27.5µg/ml	0.0048362	0.0048797
4		0.0048751	
5		0.0051632	
5	30µg/ml	0.0051728	0.005176
5		0.0051908	
6		0.0055560	
6	32.5µg/ml	0.0054217	0.005463
6		0.0054111	

3-1-2-1- نتائج الخطية لفيتامين B1:

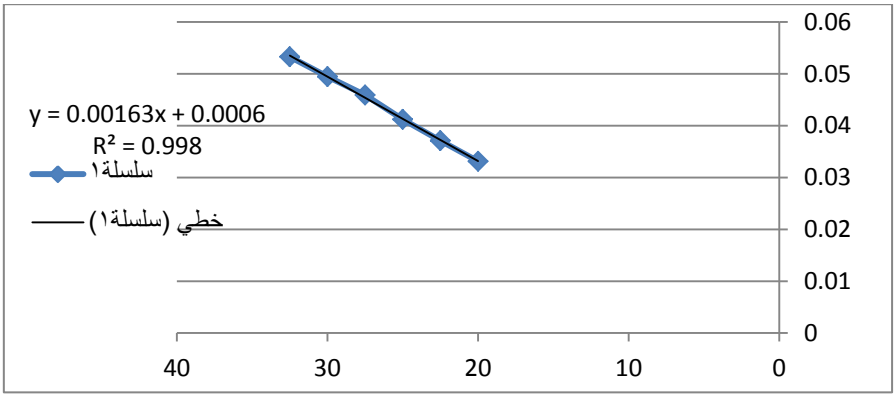
معادلة الارتداد الخطي لفيتامين B1:

$$Y = 0.001628744X + 0.00058752$$

- قيمة معامل الارتباط الخطي:

$$R^2 = 0.998$$

- مخطط الخطية لفيتامين B1:



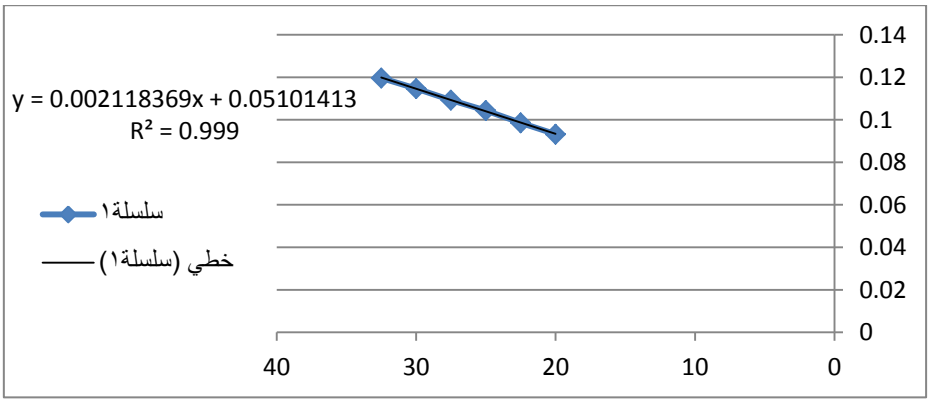
الشكل (27): منحني التعيير لفيتامين B1

الجدول (6):خطية فيتامين B1

Level	Theo. con	Area(B1)	Mean
1		0.0335974	
1	20µg/ml	0.0329863	0.003312
1		0.0327614	
2		0.0409996	
2	22.5 µg/ml	0.036924	0.037103
2		0.037525	
3		0.0409996	
3	25µg/ml	0.0417693	0.041207
3		0.0408552	
4		0.0449562	
4	27.5µg/ml	0.0451136	0.044981
4		0.044873	
5		0.0481176	
5	30µg/ml	0.0485156	0.048444
5		0.048412	
6		0.052136	
6	32.5µg/ml	0.05228	0.052273
6		0.05241	

4-1-2-1- نتائج الخطية لفيتامين B6:

- مخطط منحني التعيير لفيتامين B6:



الشكل (28): منحني التعيير لفيتامين B6

- معامل الارتباط الخطي لفيتامين B6:

$$R^2 = 0.999$$

- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين B6:

$$Y = 0.002118369X + 0.051014127$$

الجدول (7):خطية فيتامين B6

Level	Theo. Con	Area(B6)	Mean
1		0.092993	
1	20µg/ml	0.093731	0.0932303
1		0.093961	
2		0.0982118	
2	22.5 µg/ml	0.0986051	0.098566
2		0.0988813	
3		0.104162	
3	25µg/ml	0.104032	0.104354
3		0.104897	
4		0.19162	
4	27.5µg/ml	0.109349	0.109244
4		0.109221	
5		0.114093	
5	30µg/ml	0.115665	0.1146756
5		0.114329	
6		0.119931	
6	32.5µg/ml	0.119652	0.119658
6		0.119391	

5-1-2-1- نتائج خطية فيتامين B12 بالطريقة الاشتقاقية:

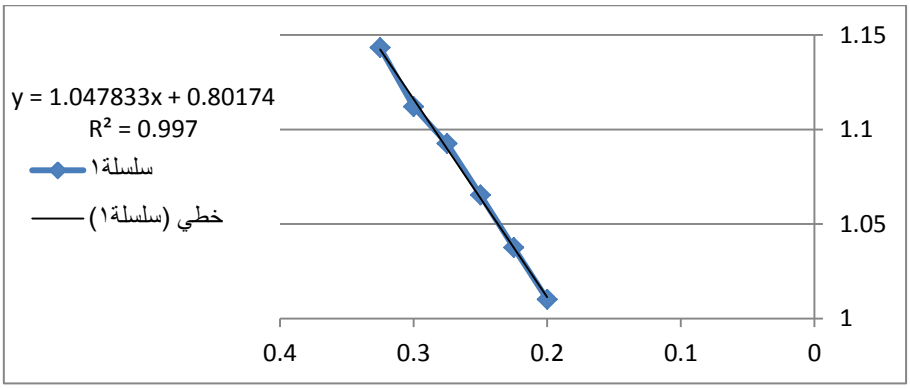
- معامل الارتباط الخطي لفيتامينB12:

$$Y = 1.047833X + 0.80174$$

- معامل الارتداد الخطي:

$$R^2 = 0.997$$

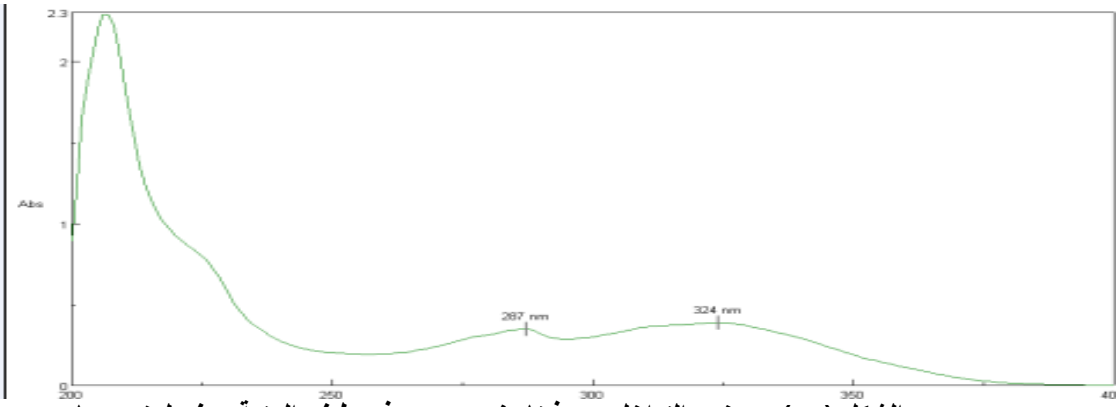
- منحني التعيير لفيتامين B12:



الشكل (29): منحني التعيير لفيتامين B12

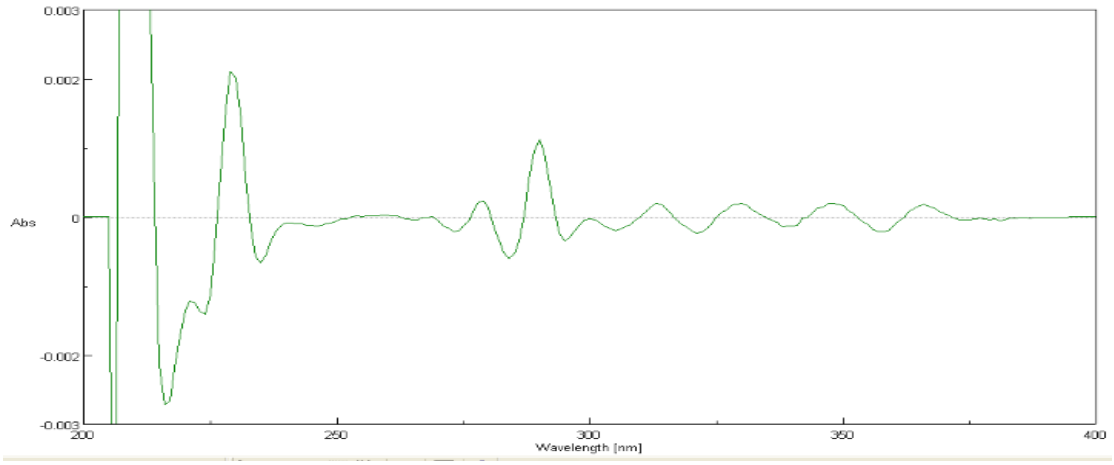
الجدول(8): خطية فيتامين B12 بالطريقة الاشتقاقية

Level	Theo. con	Area	Mean	RF=Auc/Auc20
1		0.034211		
1	0.2µg/ml	0.034602	0.0344	1.01007
1		0.034322		
2		0.034991		
2	0.225 µg/ml	0.035003	0.035043	1.037543
2		0.035136		
3		0.06139		
3	0.25µg/ml	0.035429	0.0359	1.065285
3		0.036013		
4		0.036917		
4	0.275µg/ml	0.036743	0.0369	1.092523
4		0.036027		
5		0.03785		
5	0.3µg/ml	0.037512	0.03756	1.112065
5		0.037318		
6		0.037998		
6	0.325µg/ml	0.038001	0.038	1.14328
6		0.037965		

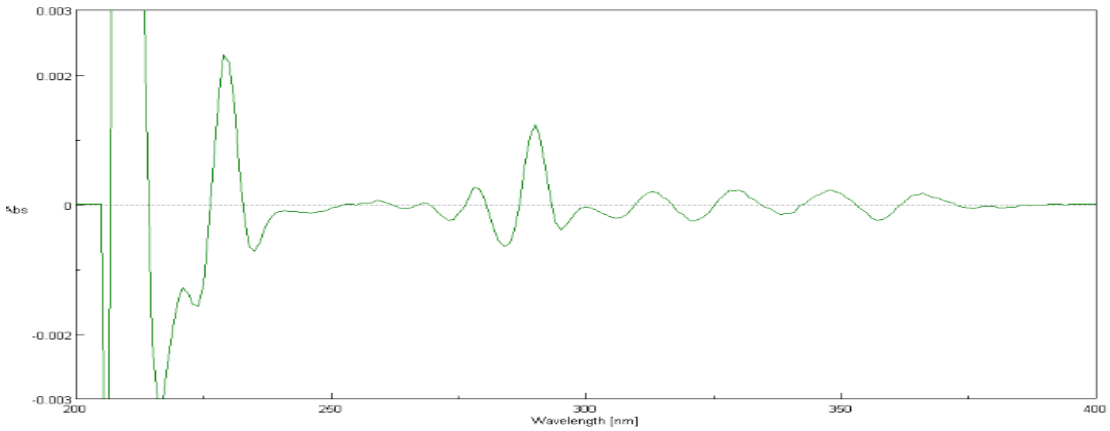


الشكل (30): يوضح التداخل بين فيتاميني A و E في طيف الرتبة صفر لمزيجهما

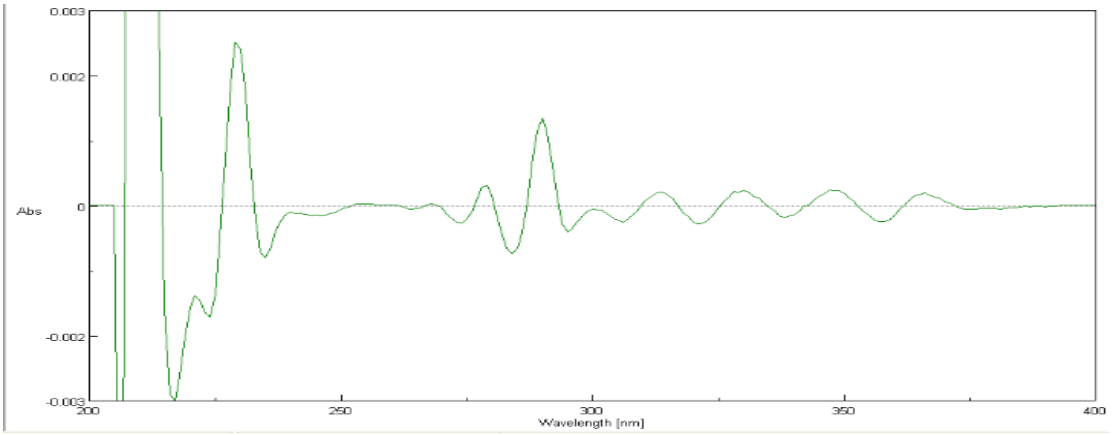
يوضح الشكل (30) التداخل الحاصل بين فيتاميني A وE في مخطط طيف الرتبة صفر حيث يظهر فيتامين E عند طول موجة 287nm وفيتامين A عند طول موجة 324nm.



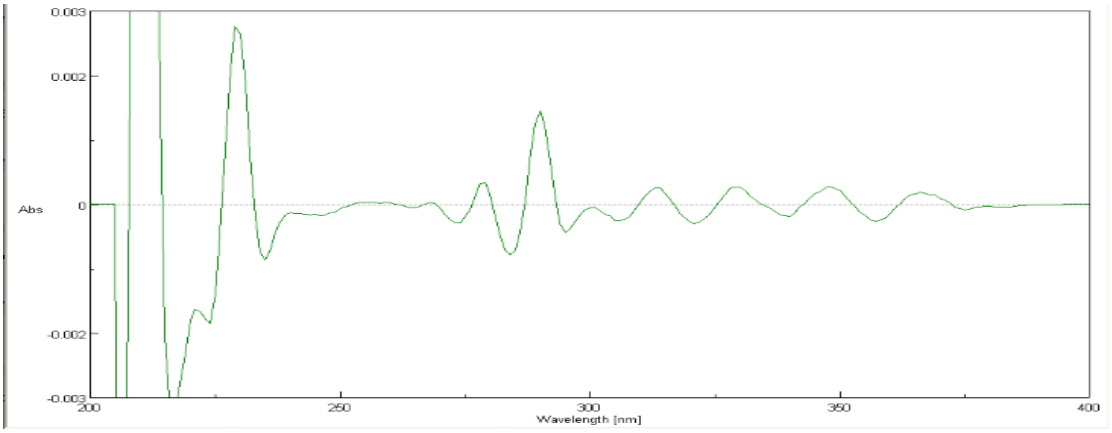
الشكل (31): يوضح مشتق الرتبة الثالثة لمزيج فيتاميني A,E بتركيز 80%



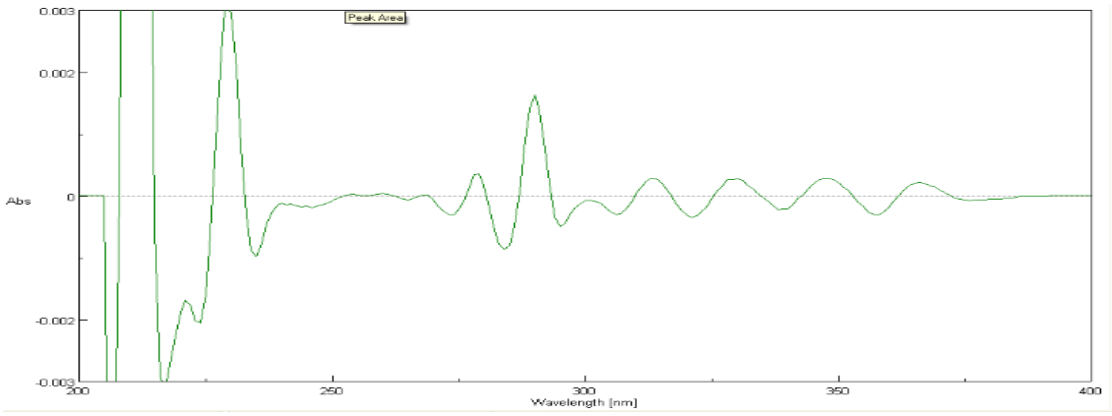
الشكل (32): يوضح المخطط الاشتقاقي لمزيج فيتاميني A,E بتركيز 90%



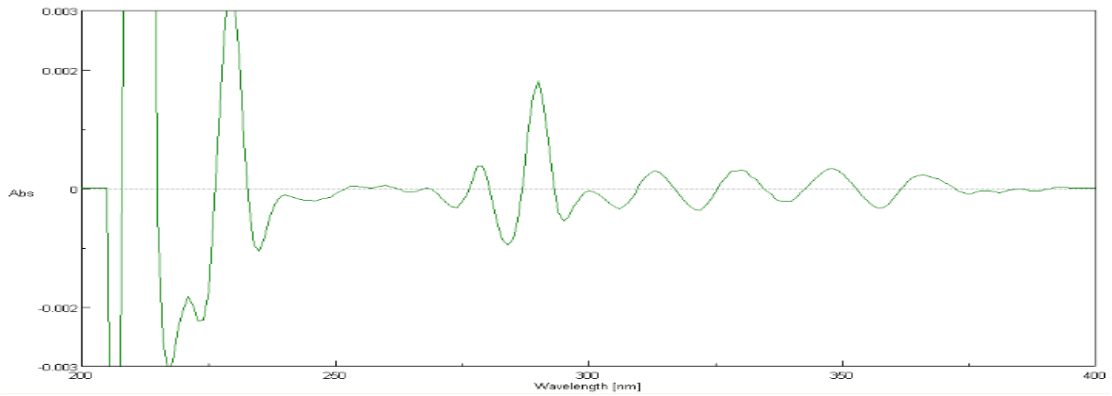
الشكل (33): يوضح مشتق الرتبة الثالثة لمزيج فيتاميني A,E بتركيز 100%



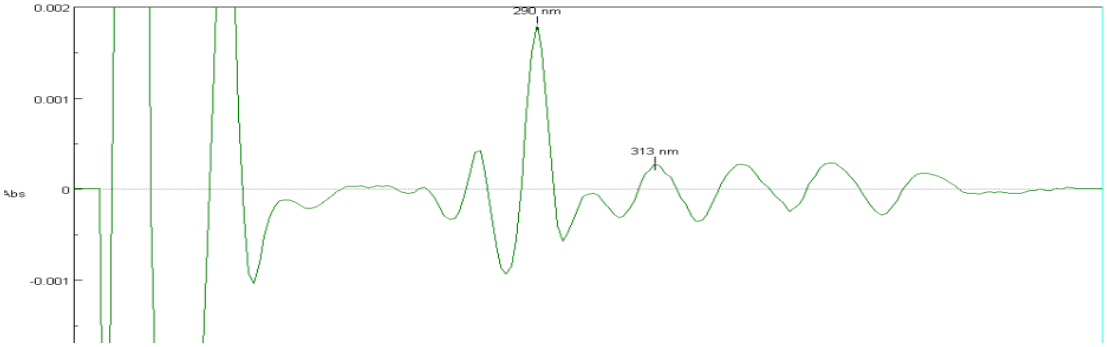
الشكل (34): يوضح مشتق الرتبة الثالثة لمزيج فيتاميني A,E بتركيز110%



الشكل (35): يوضح المخطط الاشتقاقي لمزيج فيتاميني A,E بتركيز 120%

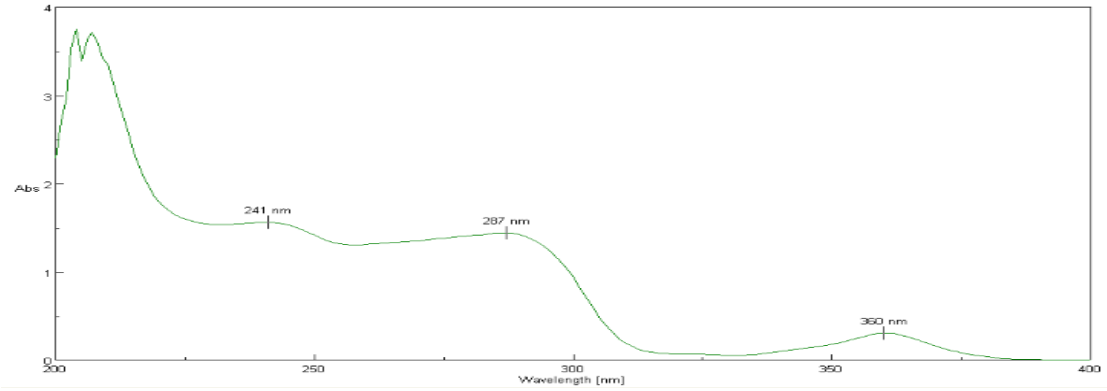


الشكل (36): يوضح المخطط الاشتقاقي لمزيج فيتاميني A,E بتركيز 130%



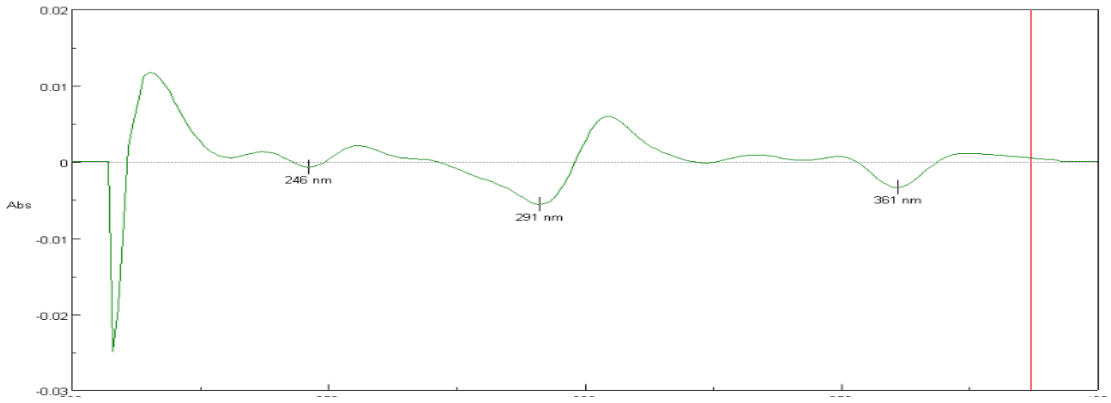
الشكل (37): يوضح انفصال المزيج باشتقاق رتبة ثالثة حيث يظهر فيتامين A عند313nm وE عند 290nm

تظهر المخططات الطيفية السابقة (31,32,33،....37) حدوث فصل واضح للقمم المتداخلة لفيتاميني A وE وذلك باشتقاق مخطط الطيف الأساسي في الرتبة صفر اشتقاقاً من الرتبة الثالثة حيث يظهر الفيتامين A عند طول موجة 313nm بينما يظهر فيتامين E عند 290nm.

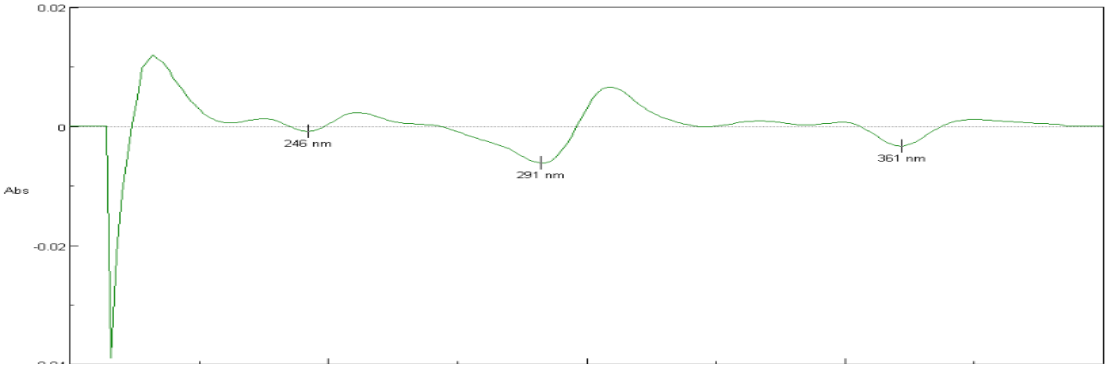


الشكل (38): يوضح المخطط الأساسي (رتبة صفر) لمزيج فيتامينات B1,B6,B12

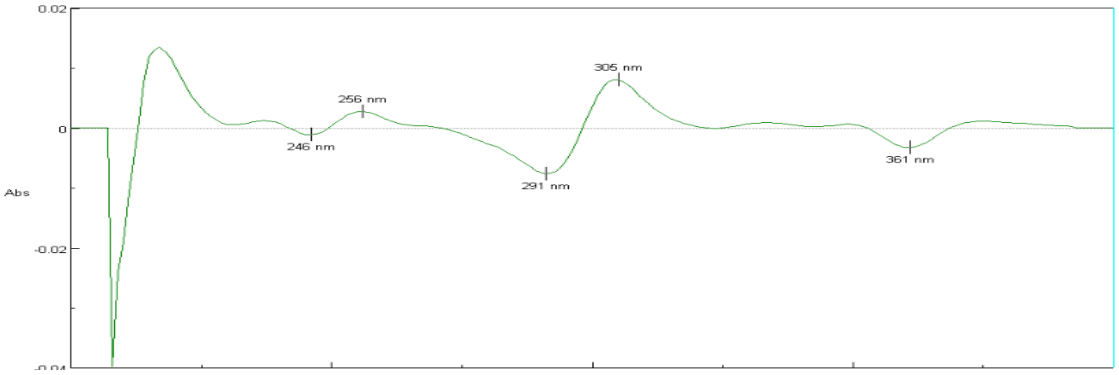
يظهر الشكل 38 وجود تداخل بين فيتاميني B1 وB6 في مخطط طيف الرتبة صفر حيث يلاحظ ظهور فيتامين B1 عند 241nm بينما ظهر فيتامين B6 عند 287nm.



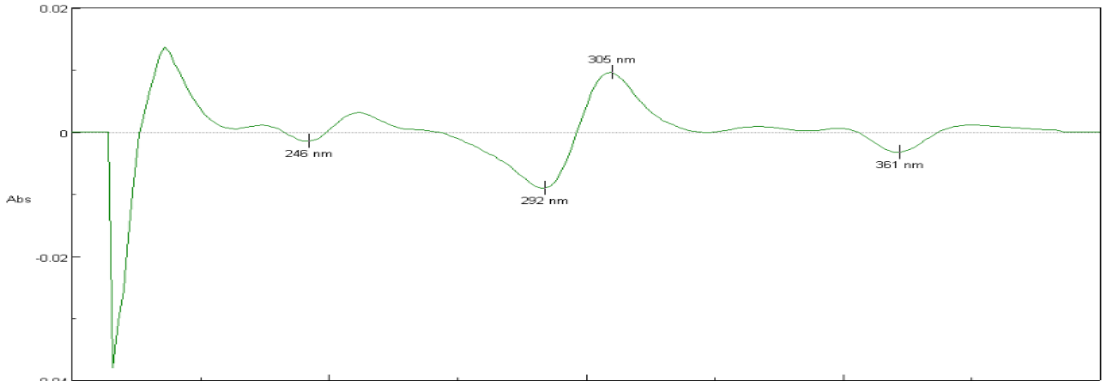
الشكل (39): يوضح مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12بتركيز (80%)



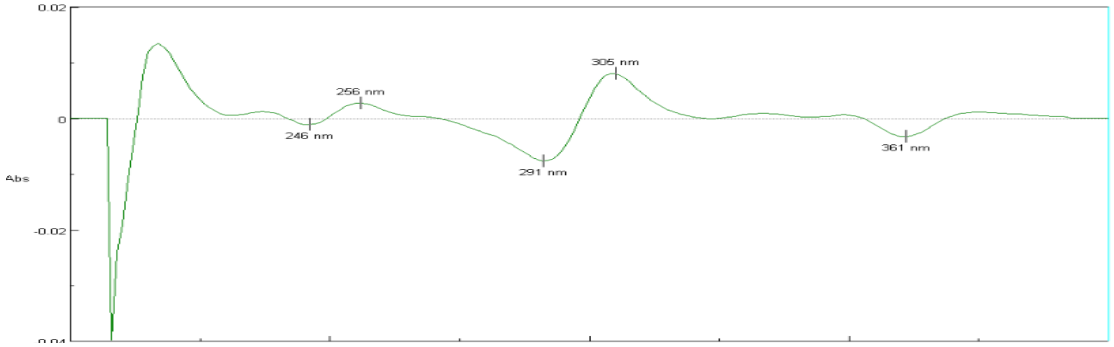
الشكل (40): يوضح مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12بتركيز (90%)



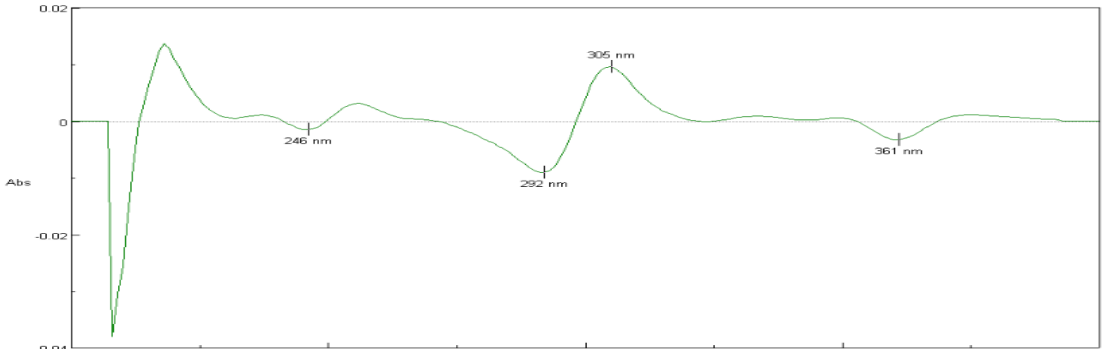
الشكل (41): يوضح مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12 بتركيز (100%)



الشكل (42): يوضح مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12بتركيز (120%)



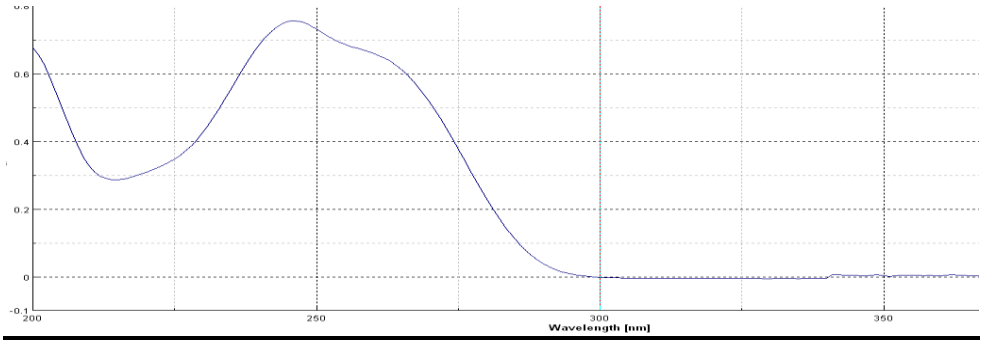
الشكل (43): يوضح مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12 بتركيز (110%)



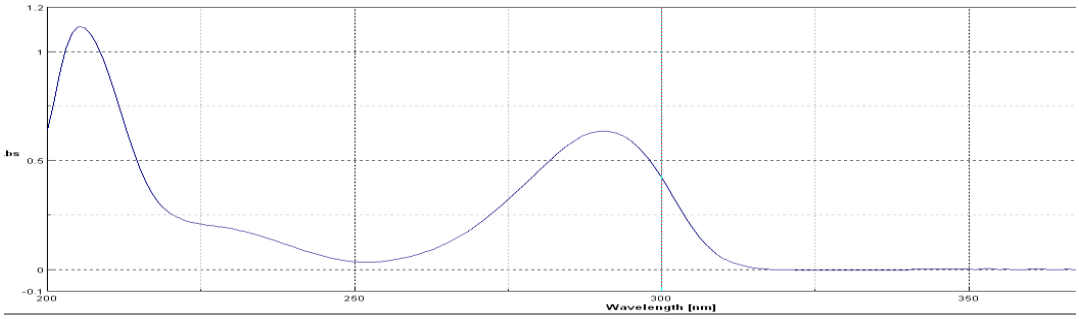
الشكل (44): يوضح مخطط الاشتقاق رتبة ثانية لمزيج فيتامينات B1,B6,B12 بتركيز (130%)

تظهر المخططات الطيفية السابقة (39,40،.....44) حدوث فصل واضح للفيتامينين B1,B6 عند إجراء الأشتقاق من الرتبة الثانية لمخطط طيف الرتبة صفر.

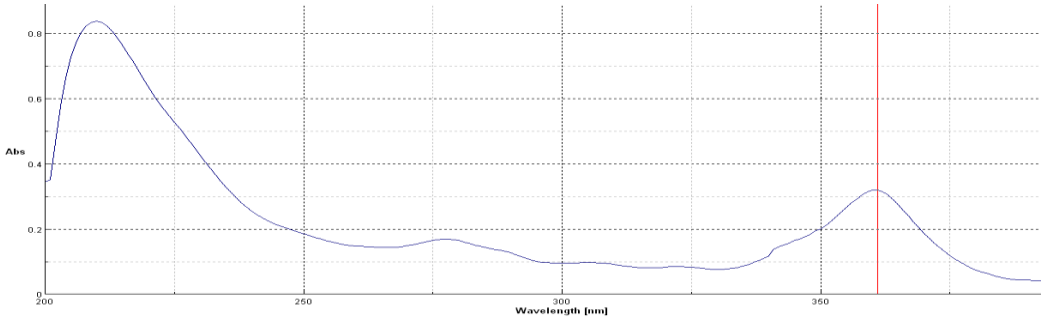
أما المخططات التالية فتوضح مخطط طيف الرتبة صفر لكل فيتامين من الفيتامينات المدروسة حيث الشكل 45 يوضح طيف الرتبة صفر للفيتامين B1 بينما يظهر الشكل 46 مخطط طيف الرتبة صفر للفيتامين B6 ويظهر الشكل 47 مخطط الرتبة صفر للفيتامين B12 أما الشكل 48 فيظهر طيف الرتبة صفر للفيتامين E والشكل 49 طيف الرتبة صفر للفيتامين A.



شكل (45) يوضح فيتامين B1 حيث الامتصاص الأعظمي له في الرتبة صفر(246nm)

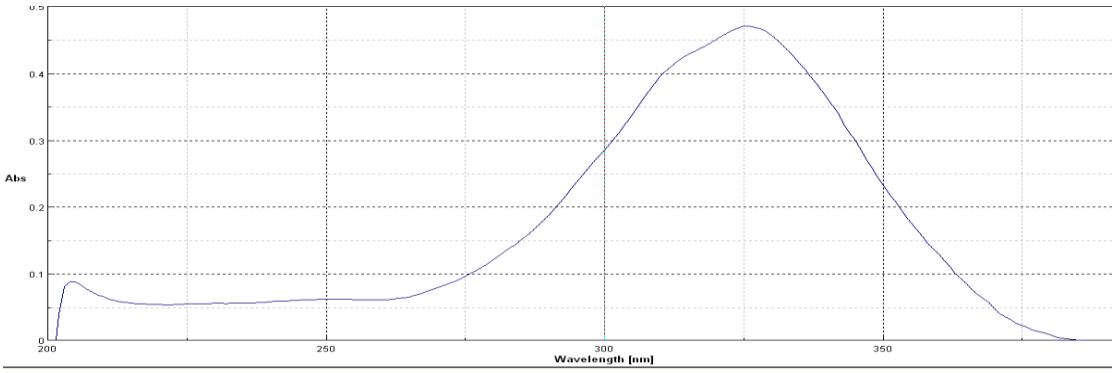


شكل (46): يوضح فيتامين B6 وقمة امتصاصه الأعظمي رتبة صفر (290nm)



شكل (47): يوضح فيتامين B12 وقمة امتصاصه الأعظمي في الرتبة صفر (361nm)

شكل (48): يوضح فيتامين Eفي الرتبة صفر وقمة امتصاصه الأعظمي (284nm)



شكل (49): يوضح فيتامين A رتبة صفر وقمة امتصاصه الأعظمي (325nm)

1-2-2- نتائج المضبوطية بالطريقة الطيفية الاشتقاقية:

- تم تعيين المضبوطية في كل الفيتامينات بكلتا الطريقتين المتبعتين باستخدام طريقة Spike وذلك بسبب تعذر الحصول على كل المكونات العائدة للصيغة المحضر منها الأشكال الصيدلانية حيث تعتمد على مبدأ إضافة معياري من الفيتامينات المدروسة بتركيز معلوم إلى محلول من العينة معلوم التركيز لكل مزيج فيتامينيٍّ مدروس .

1-2-2-1- نتائج المضبوطية لفيتامين E بالطريقة الاشتقاقية:

الجدول (9): مضبوطية فيتامين E بالطريقة الاشتقاقية

Sample NO	Con %	Con µg/ml	Area	Practical-con%	Recovery%
1	80	20	0.003873	79.5	99.4
2	80	20	0.003888	79.9	99.97
3	80	20	0.003906	80.5	100.66
4	100	25	0.004562	101.08	101.08
5	100	25	0.004483	98.6	98.6
6	100	25	0.004507	99.36	99.36
7	120	30	0.005171	120.15	100.12
8	120	30	0.005096	117.8	98.2
9	120	30	0.005154	119.6	99.7
Average					99.676
STDEV					0.915352
RSD					0.92

1-2-2-2- نتائج المضبوطية لفيتامينA:

الجدول (10): نتائج المضبوطية لفيتامين A بالاشتقاق

Sample NO	Con %	Con µg/ml	Area	Practical-con%	Recovery%
1	80	15	0.000883	78.7	98.4
2	80	15	0.000865	77.5	96.9
3	80	15	0.0008906	79.2	99
4	100	18.75	0.00121	100.3	100.3
5	100	18.75	0.001208	100.18	100.18
6	100	18.75	0.001188	98.8	98.8
7	120	22.5	0.001509	120.07	100.04
8	120	22.5	0.001539	122.057	101.7
9	120	22.5	0.001504	119.7	99.8
Average					99.457778
STDEV					1.37
RSD					1.3776

1-2-2-3- نتائج المضبوطية لفيتامين B1:

الجدول(11): مضبوطية الفيتامين B1 بالاشتقاق الطيفي

Sample NO	Con %	Con µg/ml	Area	Practical – con%	Recovery%
1	80	20	0.0321628	77.5	96.9
2	80	20	0.0323402	77.9	97.4
3	80	20	0.0322224	77.6	97
4	100	25	0.04121302	99.6	99.6
5	100	25	0.040987	99.11	99.11
6	100	25	0.0411681	99.5	99.5
7	120	30	0.048201	116.8	97.3
8	120	30	0.048561	117.7	98.08
9	120	30	0.048326	117.12	97.6
Average					98.0544
STDEV					1.075
RSD					1.0961

1-2-2-4- نتائج المضبوطية لفيتامين B6 بالطريقة الطيفية الاشتقاقية:

الجدول(12): نتائج مضبوطية فيتامين B6 بالتحليل الاشتقاقي

Sample NO	Con %	Con µg/ml	Area	Practical- con%	Recovery%
1	80	20	0.092831	78.9	98.7
2	80	20	0.093491	80.1	100.3
3	80	20	0.093116	79.44	99.4
4	100	25	0.104063	100.1	100.14
5	100	25	0.103512	99.05	101.02
6	100	25	0.104831	101.54	101.6
7	120	30	0.114059	118.953	99.2
8	120	30	0.114103	119.04	99.3
9	120	30	0.113895	118.6	99
Average					99.85111
STDEV					0980465
RSD					0.982

1-2-2-5- نتائج المضبوطية لفيتامين B12بالطريقة الاشتقاقية:

الجدول (13): مضبوطية فيتامين B12 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con %	Con µg/ml	Area	RF	Practical Con	Recovery %
1	80	0.2	0.034112	1.009977	79.5	99.4
2	80	0.2	0.034329	1.016403	82	102.5
3	80	0.2	0.034361	1.01535	81.5	102.9
4	100	0.25	0.035619	1.0546	96.5	96.5
5	100	0.25	0.035884	1.062443	99.52	99.52
6	100	0.25	0.035692	1.05676	97.4	97.4
7	120	0.30	0.03766	1.11503	119.6	99.6
8	120	0.30	0.03782	1.11088	118.012	98.3
9	120	0.30	0.037691	1.1153	119.7	99.75
Mean						99.4044
SD						1.922
RSD						1.93

3-2- الدقة (precision):

- النوع الأول من دراسات الدقة هو الدقة التكرارية (Repeatability) أو دقة الجهاز (instrument precision) جرى إجراء الاختبار عبر حقن ست حقنات متتالية من العينة بتركيز (100%) من المعياري (25µg/ml) وحساب الانحراف المعياري النسبي لكل مكون من المكونات المدروسة .

1-1-3-2-1 نتائج الدقة التكرارية لفيتامين A بالتحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (14): نتائج الدقة التكرارية لفيتامينAبالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical-con	Recovery%
1	18.75	0.0012089	18.8	100.3
2	18.75	0.0012101	18.81	100.32
3	18.75	0.0012062	18.76	100.06
4	18.75	0.0012103	18.813	100.33
5	18.75	0.0012074	18.777	100.14
6	18.75	0.0012052	18.75	99.99
Average				100.19
STDEV				0.147
RSD				0.1467

2-1-3-2-1- نتائج الدقة التكرارية لفيتامين E بالتحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (15): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين E بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery%
1	25	0.004483	24.646	98.6
2	25	0.004496	24.733	98.9
3	25	0.004503	24.8	99.15
4	25	0.004509	24.835	99.34
5	25	0.004513	24.867	99.5
6	25	0.004494	24.72	98.9
Average				99.065
STDEV				0.33
RSD				0.3326

1-2-3-1-3- الدقة التكرارية لفيتامين B1 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (16): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B1 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery%
1	25	0.0416182	25.2	100.66
2	25	0.0415981	25.152	100.6
3	25	0.041703	25.216	100.9
4	25	0.040996	24.8	99.1
5	25	0.041026	24.8	99.2
6	25	0.041128	24.9	99.6
Average				100.01
STDEV				0.802
RSD				0.8018

1-2-3-1-4- الدقة التكرارية لفيتامين B12بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (17): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B12 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	RF	Area	Practical Con	Recovery %
1	0.25	1.05762	0.035721	0.2442	97.7
2	0.25	1.057024	0.035701	0.2436	97.453
3	0.25	1.060725	0.035826	0.2472	98.86
4	0.25	1.064130	0.035941	0.25414	100.16
5	0.25	1.0624	0.035882	0.248763	99.5
6	0.25	1.06546	0.035986	0.252	100.7
Average					99.27883
STDEV					1.374621
RSD					1.3846

1-2-3-2-1-5- الدقة التكرارية لفيتامين B6 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (18): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B6 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical – con	Recovery%
1	25	0.104093	25.04	100.15
2	25	0.104215	25.095	100.4
3	25	0.1040036	24.995	99.98
4	25	0.103882	24.94	99.76
5	25	0.103926	24.96	99.84
6	25	0.103634	24.82	99.3
Average				99.905
STDEV				0.375
RSD				0.375043

- النوع الثاني من دراسات الدقة هي الدقة الوسطى (Intermediate precision) أو دقة الطريقة (method precision) حيث جرى الحصول على نتائج الدقة الوسطى من خلال وجود 3 محللين (A,B,C) وإجراء الحسابات المبينة في الجدول .

1-2-3-2-1- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين A بوجود ثلاثة محللين A,B,C:

الجدول (19): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين A بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Analyst
1			0.000898	79.5	99.4	A
2	15	80	0.000895	79.5	99.4	A
3			0.00089	79.2	99	A
4			0.001198	99.5	99.5	B
5	18.75	100	0.001193	99.2	99.2	B
6			0.001188	98.86	98.86	B
7			0.001511	120.2	100.16	C
8	22.5	120	0.001511	120.2	100.16	C
9			0.001513	120.34	100.3	C
Average					99.553	
STDEV					0.531	
RSD					0.5333	

1-2-3-2-2- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين E بوجود ثلاث محللين (A,B,C):

الجدول (20): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين E بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery%	Analyst
1			0.003912	80.727	100.9	A
2	20	80	0.003906	80.44	100.6	A
3			0.003895	80.1	100.125	A
4			0.004496	98.9	98.9	B
5	25	100	0.004481	98.5	98.5	B
6			0.004469	98.1	98.1	B
7			0.005099	117.84	98.2	C
8	30	120	0.005173	120.16	100.1	C
9			0.005191	120.7	100.6	C
Average					99.56	
STDEV					1.12416	
RSD					1.13	

1-2-3-2-3- نتائج الدقة الوسطى بوجود ثلاثة محللين لفيتامين B1:

الجدول (21): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B1 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery%	Analyst
1			0.033616	81.021	101.3	A
2	20	80	0.0332101	80.025	100.03	A
3			0.032862	79.2	99	A
4			0.041361	100.03	100.03	B
5	25	100	0.040863	98.8	98.8	B
6			0.041109	99.41	99.41	B
7			0.048826	118.35	98.6	C
8	30	120	0.048623	117.85	98.21	C
9			0.0489112	118.55	98.8	C
Average					99.3533	
STDEV					0.9566	
RSD					0.963	

1-2-3-2-4- نتائج الدقة الوسطى بوجود ثلاثة محللين لفيتامين B6:

الجدول(22): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B6بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery%	Analyst
1			0.092852	78.94	98.7	A
2	20	80	0.092894	79.02	98.77	A
3			0.093125	79.45	99.32	A
4			0.104268	100.5	100.5	B
5	25	100	0.103681	99.4	99.4	B
6			0.103283	98.6	98.6	B
7			0.114092	119.015	99.2	C
8	30	120	0.114116	119.06	99.22	C
9			0.114038	118.9	99.1	C
Average					99.2011	
STDEV					0.5645	
RSD					0.57	

1-2-3-2-5- نتائج الدقة الوسطى بوجود ثلاثة محللين لفيتامين B12:

الجدول (23): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B12 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	RF	Practical con%	Recovery %	Analyst
1		0.03412	1.0102	79.6	99.5	A
2	0.2	0.03426	1.0144	81.2	101.5	A
3		0.03423	1.0134	80.8	101	A
4		0.03582	1.0606	98.82	98.82	B
5	0.25	0.03561	1.0544	96.45	96.45	B
6		0.03577	1.06	98.6	98.6	B
7		0.03768	1.116	119.966	99.97	C
8	0.3	0.03741	1.1076	116.67	97.2	C
9		0.03762	1.114	119.203	99.3	C
Average					99.1489	
STDEV					1.6304	
RSD					1.64	

- نتائج الدقة الوسطى للفيتامينات المدروسة بطريقة ثانية اعتمدت على تحليل العينات المحضرة بالتراكيز µg/ml(20,25,30) ضمن يوم واحد فكانت النتائج:

-

- **الجدول (24): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين A ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي**

Sample NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery%	Mean
1			0.0009	79.83	99.8	
2	15	80	0.0009	79.83	99.8	99.91
3			0.000904	80.1	100.125	
4			0.001213	100.5	100.5	
5	18.75	100	0.001214	100.6	100.6	100.25
6			0.0012	99.65	99.65	
7			0.001505	119.8	99.8	
8	22.5	120	0.001504	119.7	99.75	99.89
9			0.00151	120.14	100.12	
SD 1	0.1876		RSD 1	0.188		
SD 2	0.522		RSD 2	0.5207	Mean RSD	0.303233
SD3	0.2007		RSD 3	0.201		

الجدول (25): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين A ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1			0.000912	80.62	100.8			
2	15	80	0.000915	80.82	101.025	100.98	0.1664	0.165
3			0.000916	80.9	101.125			
4			0.001189	98.9	98.9			
5	18.75	100	0.001194	99.26	99.26	99.206	0.284	0.286
6			0.001197	99.46	99.46			
7			0.001517	120.6	100.5			
8	22.5	120	0.001507	119.9	99.9	100.14	0.3194	0.3189
9			0.001508	120.01	100.01			
Mean								0.2566

الجدول (26): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين E ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1			0.003816	77.62	97.025			
2	20	80	0.003827	77.96	98.45	97.575	0.7661	0.7851
3			0.003822	77.8	97.25			
4			0.004561	100.97	100.97			
5	25	100	0.004527	99.9	99.9	100.04	0.8685	0.8682
6			0.004506	99.25	99.25			
7			0.005134	118.9	99.1			
8	30	120	0.005116	118.4	98.7	98.93	0.2082	0.2104
9			0.005129	118.8	99			
Mean								0.6212

الجدول (27): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين E ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1			0.003936	81.4	101.75			
2	20	80	0.003914	80.7	100.2	100.56	1.05	1.0433
3			0.003886	79.8	99.75			
4			0.004465	97.96	97.96			
5	25	100	0.004484	98.6	98.6	98.753	0.8801	0.891
6			0.004521	99.7	99.7			
7			0.005169	120.03	100.07			
8	30	120	0.005197	120.91	100.8	100.62	0.49	0.486
9			0.005206	121.2	101			
Mean								0.807

الجدول (28): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B1 ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1			0.032663	78.7	98.4			
2	20	80	0.032491	78.3	97.9	98.5	0.656	0.666
3			0.032931	79.34	99.2			
4			0.040313	97.45	97.45			
5	25	100	0.040532	97.99	97.99	97.86	0.363	0.371
6			0.040593	98.14	98.14			
7			0.049121	119.07	99.2			
8	30	120	0.049512	120.03	100.025	99.6416	0.4156	0.417
9			0.049341	119.61	99.7			
Mean								0.485

الجدول (29): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B1 ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1			0.033483	80.7	100.785			
2	20	80	0.033062	79.7	99.625	100.25	0.625	0.6234
3			0.033282	80.2	100.25			
4			0.041315	99.9	99.9			
5	25	100	0.041056	99.3	99.3	99.6	0.3	0.3012
6			0.041192	99.6	99.6			
7			0.048692	118.02	98.35			
8	30	120	0.048826	118.35	98.6	98.35	0.25	0.2542
9			0.048553	117.7	98.1			
Mean								0.393

الجدول (30): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B6 ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1			0.0928712	79	98.75			
2	20	80	0.093261	79.7	99.625	99.375	0.545	0.55
3			0.093302	79.8	99.75			
4			0.103762	99.5	99.5			
5	25	100	0.1038311	99.7	99.7	99.8	0.3605	0.3613
6			0.104114	100.2	100.2			
7			0.114631	120.032	100.03			
8	30	120	0.114329	119.5	99.6	99.776	0.225	0.2255
9			0.114412	119.62	99.7			
Mean								0.379

الجدول (31): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B6 ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1		0.093511	80.2	100.25			
2	20	0.093262	79.7	99.625	99.892	0.32243	0.323
3		0.093337	79.85	99.8			
4		0.103536	99.1	99.1			
5	25	0.103779	99.56	99.56	99.52	0.37245	0.3742
6		0.103913	99.81	99.81			
7		0.114582	119.94	99.95			
8	30	0.114761	120.3	100.25	100.23	0.2754	0.275
9		0.114912	120.56	100.5			
Mean							0.3241

الجدول (32): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B12 ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	RF	Area	Practical con%	Recovery %	Mean	SD	RSD
1		1.0094	0.034092	79.3	99.1			
2	0.2	1.0101	0.034116	79.54	99.4	99.77	0.913	0.9152
3		1.013	0.034211	80.65	100.81			
4		1.0576	0.035721	97.7	97.7			
5	0.25	1.0603	0.035812	98.71	98.71	98.67	0.95	0.9634
6		1.0627	0.035892	99.6	99.6			
7		1.1082	0.037431	117.008	97.5			
8	0.3	1.116	0.037691	119.966	99.97	97.99	1.786	1.823
9		1.105	0.037314	115.77	96.5			
Mean								1.2338

الجدول (33): نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B12 ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sa. NO	Con µg/ml	Area	RF	Practical con	Recovery %	Mean	SD	RSD
1		0.034216	1.013061	80.7	100.87			
2	0.2	0.034186	1.01217	80.3	100.4	100.776	0.34	0.3371
3		0.034232	1.013531	80.85	101.06			
4		0.035822	1.060311	98.7	98.7			
5	0.25	0.035901	1.066	100.88	100.88	99.633	1.123	1.1274
6		0.035866	1.06191	99.32	99.32			
7		0.037581	1.1127	118.7	98.9			
8	0.3	0.037569	1.1123	118.55	98.8	98.6	0.436	0.4421
9		0.037493	1.1101	117.7	98.1			
Mean								0.635

1-2-4- الإنتقائية:

- جرى العمل بطريقة Spike لإظهار انتقائية الطريقة في المنتج الدوائي حيث جرى تحليل المحلولين المحضرين أحدهما تركيزه 100% من المعياري (25µg/ml) والثاني 100% (25µg/ml) بطريقة spike كما هو الحال في محلول المضبوطية 100% .

1-2-4-1- نتائج الإنتقائية لفيتامين A بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (34): نتائج الإنتقائية لفيتامين A بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery%
1		0.001204	18.735	99.9
2	18.75	0.001211	18.82	100.4
3		0.001213	18.8463	100.5
4		0.001207	18.772	100.12
5	18.75(spike)	0.001211	18.82	100.4
6		0.001215	18.87	100.64
Mean				100.3267
SD				0.26972
RSD				0.2688

1-2-4-2- نتائج الإنتقائية لفيتامين E بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (35): نتائج الإنتقائية لفيتامين E بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Practical con	Area	Recovery%
1		24.8	0.004504	99.2
2	25	25.008	0.004531	100.032
3		24.8433	0.00451	99.4
4		25.52	0.004596	102.08
5	25(spike)	25.086	0.004541	100.34
6		25.26	0.004563	101.04
Mean				100.35
SD				1.0766
RSD				1.073

1-2-4-3- نتائج الإنتقائية لفيتامين B1 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (36): نتائج الإنتقائية لفيتامين B1 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery%
1		0.040639	24.564	98.26
2	25	0.041135	24.87	99.5
3		0.041201	24.91	99.6
4		0.041332	24.99	99.96
5	25(spike)	0.0415112	25.1	100.4
6		0.041224	24.923	99.7
Mean				99.57
SD				0.72
RSD				0.7214

1-2-4-4- نتائج الإنتقائية لفيتامين B6بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (37): نتائج الإنتقائية لفيتامين B6 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery%
1		0.104112	25.05	100.2
2	25	0.104035	25.01	100.04
3		0.103986	24.987	99.95
4		0.103115	24.576	98.304
5	25(spike)	0.103495	24.755	99.02
6		0.103851	24.9231	99.7
Mean				99.5357
SD				0.732
RSD				0.7352

5-4-2-1- نتائج الإنتقائية لفيتامين B12 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (38): نتائج الإنتقائية لفيتامين B12 بالتحليل الطيفي الاشتقاقي

Sample NO	Con µg/ml	Area	RF	Practical con	Recovery%
1		0.03581	1.0603	0.24676	98.7
2	0.25	0.03600	1.066	0.2522	100.88
3		0.03583	1.061	0.24743	98.97
4		0.03603	1.0668	0.253	101.2
5	0.25(spike)	0.03587	1.06212	0.2485	99.4
6		0.035892	1.0627	0.24905	99.62
Mean					99.795
SD					0.93252
RSD					0.9344

2- الفصل والمقايسة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز.

2-1- الدراسة الكيفية وتعيين الشروط الملائمة لفصل مزائج الفيتامينات المدروسة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز .

- **2-1- الشروط الكروماتوغرافية (Chromatographic conditions):**
- **2-1-1- اختيار طول الموجة (selection of wavelength):**
- جرى اختيار طول الموجة من أجل تحليل الفيتامينات المدروسة ضمن مزائجها استناداً للمعطيات الطيفية التي جرى الحصول عليها من الدراسة الطيفية لطيف الأشعة فوق البنفسجية والمقارنة مع المعطيات الطيفية المرجعية لطيف الأشعة فوق البنفسجية لكل فيتامين ومقاطعة النتائج فلوحظ أن أفضل طول موجة للعمل كان عند 280nm .

2-1-2- اختيار pH الطور المتحرك (pH of mobile phase):

- جرى تحديد pH الطور المتحرك المستخدم في فصل الفيتامينات الذوابة بالماء بحيث يكون ملائماً لقيمة pH التي تناسب العمود ولا تسبب تخربه (8 – 2) وبما أن الفيتامينات الذوابة في الماء تكون ثابتة في قيم pH الحامضة جرى التجريب ضمن قيم تراوحت بين (4 – 2) فكانت القيمة الأفضل بين (3.1 – 2.8) أما في القيم الأخرى فقد حدث تخرب في شكل القمم أو عدم حدوث فصل واضح .

2-1-3- اختيار معدل التدفق (Flow rate):

- لوحظ بالتجريب أن أفضل معدل للتدفق أعطى قمماً جيدةً من ناحية الفصل ومن ناحية زمن الاحتباس للفيتامينات A,E هو 1.5ml في الدقيقة .
- أما الفيتامينات الذوابة بالماء فكان الأفضل هو 1ml في الدقيقة حيث أن تناقص مقدار معدل التدفق أدى إلى زيادة زمن الاحتباس بين B1 و B6 أما زيادته فأدت إلى اقتراب أكبر بين B12 و B6 حتى أنه في الزمن 1.5ml/min حدث تداخل بينهما .
- **2-1-4- تطوير طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز لفصل أمزجة المركبات المدروسة:**
- عند العمل على مزيج فيتامين (A,E) لم تكن هناك صعوبة في تحديد الطور المتحرك المستخدم حيث استخدم مزيج الميتانول (95%) مع الأسيتونتريل (5%) فأعطى هذا المزيج فصلاً واضحاً للقمتين بشكل متباعد
- أما العمل على مزيج فيتامينات (B) فقد ظهرت صعوبات في البداية من أجل اختيار الطور المتحرك الملائم للفصل حيث ظهرت في البداية مخططات طيفية لها قممٌ غير واضحةٍ عند استخدام محلول له درجة pH فوق 3 حتى (3.1) أظهر تخرب للقمم

المفصولة وجرى تجريب عدة أطوارٍ متحركةٍ حتى الوصول إلى مزيج (ماء73%+ ميتانول26%+ حمض الخل الثلجي1% بوجود كبريتات الهكسان 1.4g/L)كما أن كبريتات الهكسان الحامضية لعبت دوراً هاماً في عملية ضبط pH المزيج حيث لوحظ بالتجريب أنّ إنقاص كميتها أو زيادتها حتى لو كان بمقدار ضئيل فإنه سوف يؤدي إلى حدوث تغير في قيمة pH الطور المتحرك وحدوث تخرب في شكل القمم .

- تم اختيار العمود المناسب لفصل مزيج فيتامينات (B1,B6,B12) حيث تبين بالتجربة أنّ العمود الذي أعطى فصل واضح هو عمود نوع (Neucludor , 150*4 , 5µm) أو عمود (ODS , 250*4 , 5µm) ولكن عمود ODS أعطى زمن أطول للفصل بحوالي 10 دقائق . أما لفصل مزيج A وE فاستخدم عمود C18-Knauer .

- **<u>2-2- نتائج مصدوقية طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز:</u>**

- جرى بداية التحقق من ملائمة النظام لكل الفيتامينات المدروسة في التحليل الطيفي و ذلك من خلال حقن المحلول المعياري المحضر بتركيز 100% خمس حقنات متتالية ومن ثم حسبت متثابتتات ملائمة النظام الموضحة في الجدول التالي:

الجدول (39): يوضح بعض متثابتات ملائمة النظام للطريقة الكروماتوغرافية

الفيتامين	المساحة الوسطية	زمن الاحتباس	عامل التذييل	الصفائح النظرية	SD	RSD
A	517740.4	2.020	1.14	3146.86	1217.67	0.2352
E	559978	5.412	1.47	3646.62	2305.5	0.223
B1	1256453	12.116	1.53	4114.33	10358.18	0.8286
B6	4037108	4.293	1.275	6746.623	12455.36	0.3085
B12	(RF)1.019576	6.189	1.73	2492	0.0003757	0.03685

- كما جرى اتخاذ هذا الإجراء عند دراسة كل معلم من معالم مصدوقية الطريقة التحليلية لكل فيتامين مدروس من خلال حقن المعياري 100% خمس حقنات متتالية و حساب SD و RSD كما هو مبين لاحقاً .

2-2-1-1- نتائج الخطية لفيتامين A:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD= 0.21027

الجدول (40): خطية فيتامين A بطريقة HPLC

Level	Theo. con	Area(vita A)	Mean
1		409292	
1	15	409831	409565
1		409572	
2		468033	
2	16.875	467373	467756
2		467862	
3		522256	
3	18.75	522813	522729
3		523119	
4		581434	
4	20.625	581904	581633
4		581562	
5		641101	
5	22.5	640841	641090
5		641329	
6		698130	
6	24.375	698334	698330
6		698538	

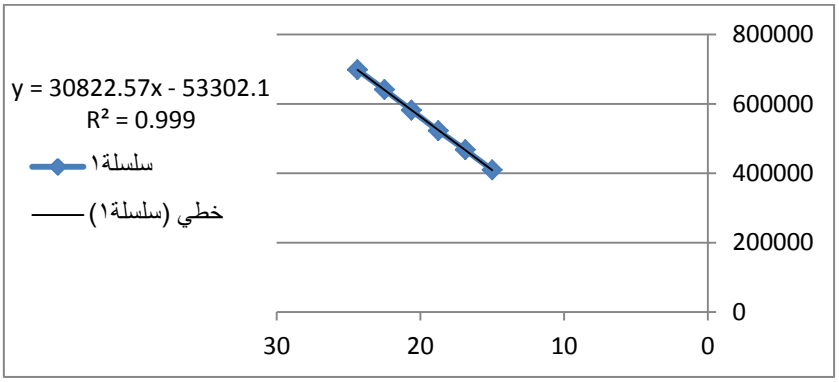
- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين A:

$$Y = 30822.57X - 53302.1$$

- قيمة معامل الارتباط الخطي:

$$R^2 = 0.999$$

- مخطط الخطية لفيتامين A:



الشكل (50): منحني التعيير لفيتامين A

2-2-1-2- نتائج خطية فيتامين E:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD= 0.26306

الجدول (41): خطية فيتامين E بطريقة HPLC

Level	Theo. con	Area(vita E)	Mean
1		440260	
1	20	441128	440263
1		441539	
2		501610	
2	22.5	501983	502115
2		502758	
3		564251	
3	25	564735	564235
3		563720	
4		621130	
4	27.5	624563	625222
4		624972	
5		688283	
5	30	684279	684981
5		682382	
6		750815	
6	32.5	744316	747799
6		748266	

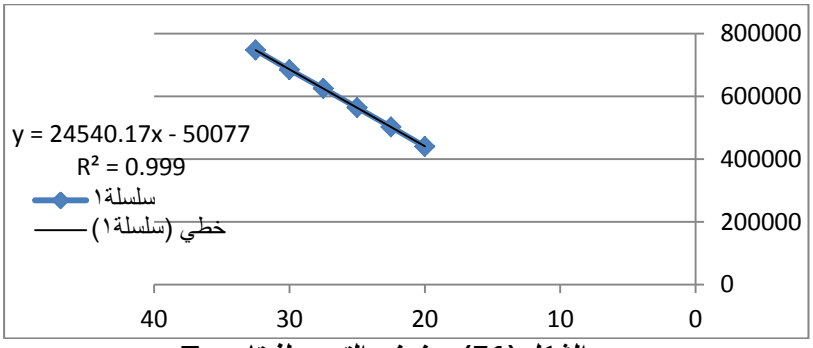
- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين E:

$$Y = 24540.17X - 50077$$

- قيمة معامل الارتباط الخطي

$$R^2 = 0.999$$

- مخطط منحني التعيير لفيتامين E:



الشكل (51): منحني التعيير لفيتامين E

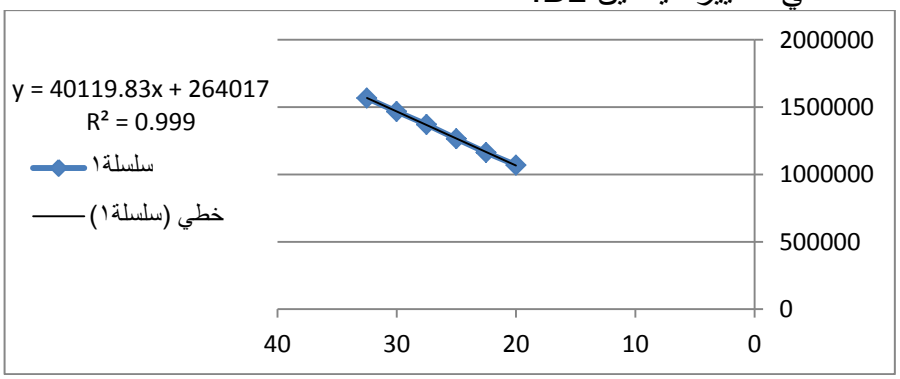
3-1-2-2 نتائج الخطية لفيتامين B1:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.5651

الجدول (42): خطية فيتامين B1 بطريقة HPLC

Level	Theo .Con	Area	Mean
1		1056555	
1	20µg/ml	1085870	1068796
1		1063963	
2		1168462	
2	22.5 µg/ml	1156387	1162890
2		1163821	
3		1267900	
3	25 µg/ml	1263796	1265668
3		1265308	
4		1377237	
4	27.5 µg/ml	1369019	1371026
4		1366823	
5		1467237	
5	30 µg/ml	1470368	1467599
5		1465191	
6		1552986	
6	32.5 µg/ml	1578407	1566996
6		1569594	

- مخطط منحني التعيير لفيتامين B1:



الشكل (52): منحني التعيير لفيتامين B1

- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين B1:

$$Y = 40119.83X + 264017$$

- قيمة معامل الارتباط الخطي:

$$R^2 = 0.999$$

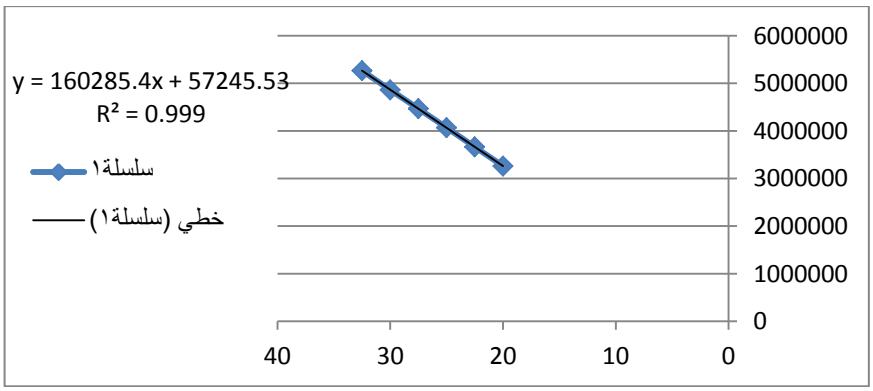
4-1-2-2- نتائج الخطية لفيتامين B6:

بعد حقن المعياري(100%) 5 مرات كان RSD=0.2572

الجدول (43): خطية فيتامين B6 بطريقة HPLC

Level	Theo .Con	Area	Mean
1		3239511	
1	20 µg/ml	3275752	3259994
1		3264719	
2		3645131	
2	22.5 µg/ml	3692386	3665329.667
2		3658472	
3		4044780	
3	25 µg/ml	4072382	4067060.333
3		4084019	
4		4463681	
4	27.5 µg/ml	4470811	4466672.667
4		4465526	
5		4861049	
5	30 µg/ml	4897648	4862755.333
5		4829569	
6		5248381	
6	32.5 µg/ml	5270311	5266610
6		5281138	

- مخطط منحني التعيير لفيتامين B6:



الشكل (53): منحني التعيير لفيتامين B6

- معادلة الارتداد الخطي لفيتامين B6:

$$Y = 160285.4X + 57245.53$$

- معامل الارتباط الخطي:

$$R^2 = 0.999$$

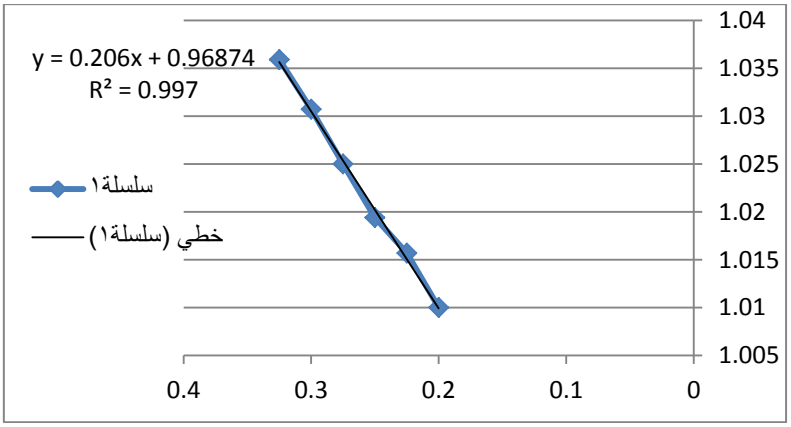
5-1-2-2- نتائج الخطية لفيتامين B12:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كانت قيمة RSD=0.6265

الجدول (44): خطية فيتامين B12 بطريقة HPLC

Level	Theo Con	Mean Area	RF
1	0.2	841276	1.01
2	0.225	845765	1.0157
3	0.25	849338	1.0194
4	0.257	854871	1.025
5	0.3	859892	1.03072
6	0.325	864264	1.0359

- مخطط منحني التعيير للفيتامين B12:



الشكل (54): منحني التعيير لفيتامين B12

- معادلة الارتداد الخطي للفيتامين B12:

$$Y = 0.206X + 0.96874$$

- معادلة الارتداد الخطي للفيتامين B12 حيث Y هي قيمة $RF = \frac{AUC}{AUC20\mu g}$
- قيمة معامل الارتباط الخطيB12 :

$$R^2 = 0.997$$

2-2-2- نتائج المضبوطية:

2-2-2-1- نتائج المضبوطية لفيتامين A بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.2099

الجدول (45): مضبوطية فيتامين A بطريقة HPLC

Sample No	Con %	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery %
1	80	15	395646	77.7	97.125
2	80	15	399831	78.4	98
3	80	15	397642	78.03	97.54
1	100	18.75	520625	99.31	99.31
2	100	18.75	518916	99	99
3	100	18.75	515409	98.4	98.4
1	120	22.5	641212	120.17	100.14
2	120	22.5	639223	119.83	99.86
3	120	22.5	640057	119.97	99.98
Average					98.81722
SD					1.10692
RSD					1.1202

2-2-2-2- نتائج المضبوطية لفيتامين E بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.3772

الجدول (46): مضبوطية فيتامين E بطريقة HPLC

Sample No	Con %	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery %
1	80	20	441612	80.145	100.2
2	80	20	440384	79.9	99.93
3	80	20	440721	80.00012	100
1	100	25	564216	100.13	100.13
2	100	25	560918	99.6	99.6
3	100	25	562882	99.9	99.9
1	120	30	688329	120.36	100.3
2	120	30	682536	119.4	99.5
3	120	30	680121	119.04	99.2
Average					99.862
SD					0.360721
RSD					0.3612

2-2-2-3- نتائج المضبوطية لفيتامينB1 بطريقة HPLC:

جرى في البداية حقن المعياري من الفيتامين بتركيز(100%) وحساب قيمة RSD=1.0216 أي أقل من (2%) .

الجدول (47): مضبوطية فيتامين B1 بطريقة HPLC

Sample. No	Con %	Con µg/ml	Area	Practical Con%	Recovery %
1			1053611	78.7	98.4
2	80	20	1062862	79.65	99.6
3			1049538	78.32	97.9
1			1245663	97.9	97.9
2	100	25	1263146	99.6	99.6
3			1260715	99.4	99.4
1			1448995	118.1	98.45
2	120	30	1427631	116.014	96.7
3			1458526	119.092	99.2
Average					98.5722
SD					0.9776
RSD					0.9918

2-2-2-4- نتائج المضبوطية لفيتامين B6 بطريقة HPLC:

جرى في البداية حقن المعياري من الفيتامين بتركيز(100%) وحساب قيمة =RSD0.6237 أي أقل من (2%) .

الجدول (48): مضبوطية فيتامين B6 بطريقة HPLC

Sample No	Con %	Con µg/ml	Area	Practical Con%	Recovery %
1			3264286	80.03	100.04
2	80	20	3257511	79.86	99.8
3			3249336	79.66	99.6
1			4048164	99.6	99.6
2	100	25	4016671	98.81	98.81
3			4028349	99.	99.1
1			4828836	119.08	99.2
2	120	30	4853127	119.7	99.74
3			4836225	119.26	99.4
Average					99.47667
SD					0.385746
RSD					0.3878

2-2-2-5- نتائج المضبوطية لفيتامين B12 بطريقة HPLC:

بعد إجراء حقن لعياري 100% (25µg/ml) خمس مرات متتالية كانت قيمة RSD=0.5078.

الجدول (49): مضبوطية فيتامين B12بطريقة HPLC

Sample No	RF	Con µg/ml	Area	Area 20 µg	Prac-Con	Recovery %
1	1.01004		840615	832257	80.2	100.24
2	1.0108	0.20	842311	833326	81.67	102.1
3	1.01025		841626	833083	80.6	100.9
1	1.0194		849936	834117	98.4	98.4
2	1.02053	0.25	848582	831512	100.6	100.6
3	1.19		849115	832963	97.6	97.6
1	1.03066		859346	833782	120.2	100.2
2	1.298	0.30	858514	833636	118.56	98.8
3	1.02891		859007	832784	116.8	97.4
Average	1.01993					99.567
SD	0.00844					1.59158
RSD	0.8272					1.5985

2-2-3- نتائج الدقة بطريقة HPLC:

2-2-3-1- نتائج الدقة التكرارية:

2-2-3-1-1- نتائج الدقة التكرارية لفيتامين E:

الجدول (50): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين E بطريقة HPLC

Sample No	Con %	Con µg/ml	Area	Practical con	Recovery %
1	100	25	560312	24.8731	99.5
2	100	25	552618	24.56	98.2
3	100	25	556724	24.727	98.9
4	100	25	559227	24.83	99.3
5	100	25	563116	24.9873	99.95
6	100	25	557102	24.74225	98.97
Average					99.13667
SD					0.597
RSD					0.6021

2-2-3-1-2- نتائج الدقة التكرارية لفيتامين A:

الجدول (51): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين A بطريقة HPLC

Sample No	Con µ/ml	Con %	Area	Practical con	Recovery %
1	18.75	100	529325	18.9026	100.8
2	18.75	100	521883	18.6612	99.53
3	18.75	100	518629	18.556	98.96
4	18.75	100	527831	18.854	100.5
5	18.75	100	522901	18.7	99.7
6	18.75		520673	18.622	99.3
Average					99.79833
SD					0.711124
RSD					0.7126

2-2-3-1-3- نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B1:

الجدول (52): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B1 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Con %	Area	Practical Con	Recovery %
1	25	100	1266828	24.9954	100
2	25	100	1224188	23.933	96
3	25	100	1247283	24.50823	98
4	25	100	1260461	24.837	99.35
5	25	100	1258913	24.79811	99.2
6	25	100	1264751	24.943625	99.8
Average					98.725
SD					1.506569
RSD					1.526

2-2-1-3-2-4- نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B6:

الجدول (53): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B6 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Con %	Area	Practical Con	Recovery %
1	25	100	4036992	24.83	99.3
2	25	100	4014653	24.69	98.76
3	25	100	4042188	24.861543	99.45
4	25	100	4029371	24.7816	99.13
5	25	100	4050096	24.91088	99.6
6	25	100	4045221	24.880466	99.5
Average					99.29
SD					0.307375991
RSD					0.309574

2-2-1-3-2-5- نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B12:

الجدول (54): نتائج الدقة التكرارية لفيتامين B12 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Area	Practical Con	Area (20)	RF	Recovery %
1	0.25	849331	0.248	832871	1.01974	99.03
2	025	848613	0.2474	832213	1.01971	99
3	0.25	847934	0.249	831293	1.02	99.534
4	0.25	849314	0.244	833452	1.019	97.6
5	0.25	848703	0.248	832251	1.01977	99.09
6	0.25	849118	0.245	832942	1.01924	98.06
Average						98.834
SD						0.655
RSD						0.663

2-2-3-2-2- نتائج الدقة الوسطى:

2-2-3-2-2-1- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين A:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.2228

الجدول (55): الدقة الوسطى بوجود 3 محللين لفيتامين A بطريقة HPLC

Sample No	Con µ/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Analyst
1			402856	78.9	98.6	A
2	15	80	405321	79.36	99.2	A
3			403695	79.08	98.85	A
1			532312	101.3	101.3	B
2	18.75	100	529618	100.86	100.86	B
3			530189	100.96	100.96	B
1			635338	119.16	99.3	C
2	22.5	120	631872	118.56	98.8	C
3			633651	118.86	99.08	C
Average					99.66111	
SD					1.06163	
RSD					1.06524	

2-2-3-2-2- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين E:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.1725

الجدول (56): الدقة الوسطى بوجود 3 محللين لفيتامين E بطريقة HPLC

Sample No	Con µ/ml	Con %	Area	Practical con%	Recovery %	Analyst
1			429637	78.2	97.75	A
2	20	80	426302	77.65	97.1	A
3			436725	79.35	99.2	A
1			546112	97.2	97.2	B
2	25	100	551683	98.08	98.08	B
3			559417	99.36	99.36	B
1			674925	118.2	98.5	C
2	30	120	682513	119.412	99.51	C
3			678343	118.73	98.9	C
Average					98.4	
SD					0.9157	
RSD					0.9306	

2-2-3-2-3- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B1:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.4863

الجدول (57): الدقة الوسطى بوجود 3 محللين لفيتامين B1 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Con %	Area	Practical Con%	Recovery %	Analyst
1			1056555	79.02	98.8	A
2	20	80	1085870	82	102.5	A
3			1073611	80.72	100.9	A
1			1267900	100.09	100.09	B
2	25	100	1263796	99.7	99.7	B
3			1261183	99.4	99.4	B
1			1477237	120.96	100.8	C
2	30	120	1479049	121.14	100.9	C
3			1456122	118.854	99.04	C
Average						100.2367
SD						1.1633
RSD						1.1605

2-2-3-2-4- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B6:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.2087

الجدول (58): الدقة الوسطى بوجود 3 محللين لفيتامين B6 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Con %	Area	Practical Con%	Recovery %	Analyst
1			3239511	79.415	99.3	A
2	20	80	3275752	80.32	100.4	A
3			3263498	80.014	100.02	A
1			4044780	99.5	99.5	B
2	25	100	4072382	100.2	100.2	B
3			4048139	99.6	99.6	B
1			4790152	118.112	98.4	C
2	30	120	4811049	118.64	98.86	C
3			4817093	118.8	99	C
Average					99.47556	
SD					0.659983	
RSD					0.6635	

2-2-3-2-5- نتائج الدقة الوسطى لفيتامين B12:

جرى حقن للمعياري (25µg/ml) كانت قيمة RSD=1.21

الجدول (59): الدقة الوسطى بوجود 3 محللين لفيتامين B12 بطريقة HPLC

Sa. No	Con µg/ml	Area (20)	Area	RF	Practical-Con	Recovery %	Analyst
1		833779	842465	1.0104	80.9	101.125	A
2	0.2	834119	842115	1.0096	79.34	99.2	A
3		833617	841833	1.0098	79.73	99.7	A
1		832852	849211	1.0196	98.76	98.76	B
2	0.25	834113	849754	1.0188	97.2	97.2	B
3		833471	848719	1.0183	96.24	96.24	B
1		833922	859574	1.03076	120.43	100.36	C
2	0.30	832116	857767	1.03083	120.6	100.5	C
3		832913	858859	1.03115	121.2	101	C
Mean						99.343	
SD						1.6957	
RSD						1.707	

2-2-4- نتائج الانتقائية بطريقة HPLC:

2-2-4-1- نتائج الإنتقائية لفيتامين A:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.1158

الجدول (60): الإنتقائية لفيتامين A بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Area	Practical Con	Recovery %
1		524309	18.74	99.95
2	18.75	528801	18.8856	100.7
3		525672	18.7841	100.2
1		515171	18.44353	98.4
2	18.75(spike)	510704	18.3	97.6
3		513691	18.4	98.11
Average				99.16
SD				1.279922
RSD				1.2908

2-2-4-2- نتائج الإنتقائية لفيتامين E:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.1548

الجدول (61): الإنتقائية لفيتامين E بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Area	Practical Con	Recovery %
1	25	559358	24.8342	99.3
2		557917	24.7755	99.1
3		556181	24.705	98.82
1		552827	24.56812	98.3
2	25(spike)	550908	24.48993	97.96
3		551763	24.52476	98.1
Average				98.59667
SD				0.554605
RSD				0.5625

2-2-4-3- نتائج الإنتقائية لفيتامين B1:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=1.2402

الجدول (62): الإنتقائية لفيتامين B1 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Area	Practical Con	Recovery %
1		1260298	24.83275	99.3
2	25	1258146	24.78	99.1
3		1239727	24.32	97.3
1		1220482	23.8402	95.4
2	25(spik)	1228487	24.04	96.2
3		1233197	24.157	96.63
Average				97.32167
SD				1.581524
RSD				1.625

2-2-4-4- نتائج الإنتقائية لفيتامين B6:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.3049

الجدول (63): الإنتقائية لفيتامين B6 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Area	Practical Con	Recovery %
1		4038959	24.8414	99.4
2	25	4019116	24.7176	98.9
3		4008662	24.6524	98.61
1		3931573	24.17143	96.7
2	25(spike)	3967129	24.4	97.6
3		3973577	24.4335	97.7
Average				98.152
SD				0.9944
RSD				1.0131

2-2-4-5- نتائج الإنتقائية لفيتامين B12:

جرى بداية حقن المعياري(25µg/ml) خمس حقنات متتالية ومن ثم حساب

RSD=0.8373

الجدول (64): الإنتقائية لفيتامين B12 بطريقة HPLC

Sample No	Con µg/ml	Area	Area (20)	RF	Practical Con	Recovery %
1		847851	831658	1.019564	0.2453	98.7
2	0.25	849063	834118	1.0196	0.247	98.8
3		849116	832224	1.01986	0.24915	99.26
1		848315	831852	1.018	0.2387	95.69
2	0.25(spike)	847961	832761	1.018923	0.2436	97.44
3		848118	832314	1.018988	0.244	97.6
Average				1.019156		97.915
SD				0.000675		1.30261
RSD				0.0662		1.3303

2-2-5- المتانة: وهي تعبير عن مدى قابلية تطبيق الطريقة التحليلية في حال تغير بعض الظروف مثل تغير معدل التدفق أو تغير درجة حرارة الحضن للعمود أو تغيير طول الموجة حيث جرى تغيير معدل التدفق وحساب نتائج SD و RSD وتبين الجداول التالية نتائج الدراسة

2-2-5-2-1- نتائج المتانة لفيتامين A بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.253

الجدول (65): نتائج المتانة لفيتامين A بطريقة HPLC

Flow rate	Sa.No	Area	Mean	SD	RSD	RT
	1	537648				2.523
1.3	2	533812	534085	3434.647	0.643	2.527
	3	530795				2.527
	1	521863				2.020
1.5	2	519795	520169	1541.414	0.3	2.020
	3	518849				2.020
	1	509937				1.677
1.7	2	507885	509683	1685.87	0.3308	1.670
	3	511228				1.673
Mean					0.425	

2-2-5-2-2- نتائج المتانة لفيتامين E بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.3759

الجدول (66): نتائج المتانة لفيتامين E بطريقة HPLC

Flow rate	Sa. No	Area	Mean	SD	RSD	RT
	1	560381				6.727
1.3	2	563193	563863	3860.85	0.6847	6.750
	3	568015				6.790
	1	553116				5.397
1.5	2	558425	555489	2698.802	0.4858	5.403
	3	554927				5.393
	1	541871				4.427
1.7	2	545619	543786	1875.367	0.3449	4.417
	3	543869				4.437
Mean					0.50513	

2-2-5-2-3- نتائج المتانة لفيتامين B1 بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=1.588

الجدول (67): نتائج المتانة لفيتامين B1 بطريقة HPLC

Flow rate	Sa. No	Area	Mean	SD	RSD	RT
	1	1332111				13.733
0.9	2	1341936	1335220	5821.554	0.436	13.582
	3	1331613				13.604
	1	1262162				12.120
1	2	1271308	1265630	4957.582	0.3917	12.223
	3	1263419				12.159
	1	1237986				11.187
1.1	2	1231566	1235008	3235.054	0.262	11.202
	3	1235472				11.236
	Mean				0.363	

2-2-5-2-4- نتائج المتانة لفيتامين B6 بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=0.3103

الجدول (68): نتائج المتانة لفيتامين B6 بطريقة HPLC

Flow rate	Sa. No	Area	Mean	SD	RSD	RT
	1	4244117				5.093
0.9	2	4249135	4249956	6290.345	0.148	5.112
	3	4256617				5.116
	1	4035821				4.437
1	2	4019849	4024435	9922.51	0.2466	4.254
	3	4017635				4.338
	1	3934109				4.096
1.1	2	3945860	3940415	5922.553	0.1503	4.197
	3	3941275				4.121
	Mean				0.182	

2-2-5-5- نتائج المتانة لفيتامين B12 بطريقة HPLC:

بعد حقن المعياري (100%) خمس حقنات متتالية كان RSD=1.2539

الجدول (69): نتائج المتانة لفيتامين B12 بطريقة HPLC

Flow rate	Area (20)	Area	RF	Mean	SD	RSD	RT
	836674	855317	1.0223				7.330
0.9	836698	856026	1.0231	1.02327	0.00106	0.1036	7.284
	835913	856279	1.0244				7.327
	832764	849322	1.0198				6.270
1	832264	848542	1.0196	1.019567	0.000252	0.0274	6.301
	831816	847862	1.0193				6.296
	829357	843487	1.017				5.957
1.1	829187	843637	1.0174	1.017433	0.000451	0.0443	5.774
	828482	843392	1.0179				6.014
	Mean					0.06	

2-2-6- حد الكشف (LOD) وحد القياس الكمي (LOQ):

يمكن تحديد حد الكشف بثلاث طرق:

- بصرياً (Visually): تحليل سلسلة عينات ذات تراكيز صغيرة معروفة ثم معرفة الحد الأدنى الذي يمكن عنده كشف المادة المراد تحليلها بشكل موثوق .
- الانحراف المعياري للاستجابة بناءً على ميل منحني التعيير:

$$LOD = 3.3\frac{\sigma}{s}$$

σ: الانحراف المعياري للاستجابة .

s: ميل منحني المعايرة .

- معدل الإشارة إلى الضجيج (Signal to Noise Ratio):

تقارن الإشارات المقيسة من العينات بالتراكيز الدنيا المعروفة للمادة المحللة مع الإشارات الآتية من العينات الشاهدة وتعيين التركيز الأدنى الذي يمكن عنده كشف المادة بشكل موثوق.

تعتبر النسب المقبولة عادة من معدل الإشارة للضجيج هي (2:1) أو (3:1)

- **حد القياس الكمي:** أصغر كمية من المادة المحللة في العينة التي يمكن تعيينها بدقة و مضبوطية مقبولتين ضمن شروط التجربة المعتبرة .
- يحدد بنفس الطريقة ولكن مع فرق هو:

$$LOQ = 10\frac{\sigma}{s}$$

- النسب المقبولة من معدل الإشارة للضجيج هي (10:1).

2-2-6-1- حد الكشف وحد القياس الكمي بطريقة HPLC:

الجدول (70): نتائج حد الكم وحد الكشف بطريقة HPLC

vitamin	B1	B6	B12	A	E
LOD µg/ml	0.28	0.019	0.972	0.34	0.47
LOQ µg/ml	0.85	0.0576	2.945	1.03	1.424

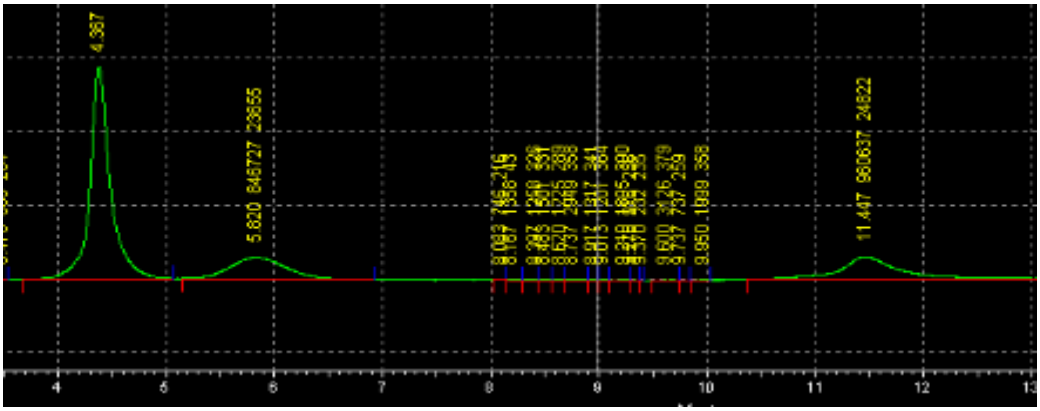
2-2-6-2- حد الكشف وحد القياس الكمي بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

الجدول (71): نتائج حد الكم وحد الكشف بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي

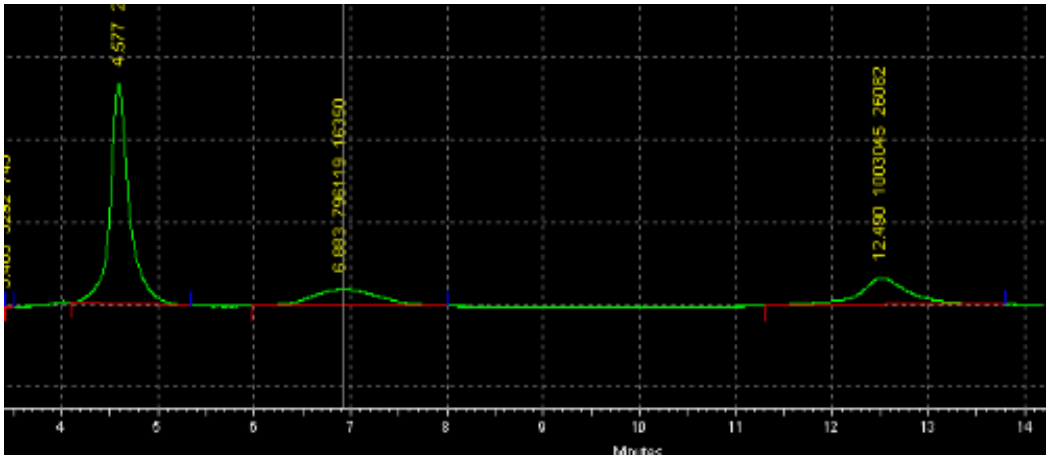
vitamin	B1	B6	B12	A	E
LOD µg/ml	0.24042	0.019672	0.8542	0.2312	0.426
LOQ µg/ml	0.73	0.06	2.6	0.7	1.3

مخططات الفصل بطريقة HPLC لمزيج فيتامينات B1,B6,B12:

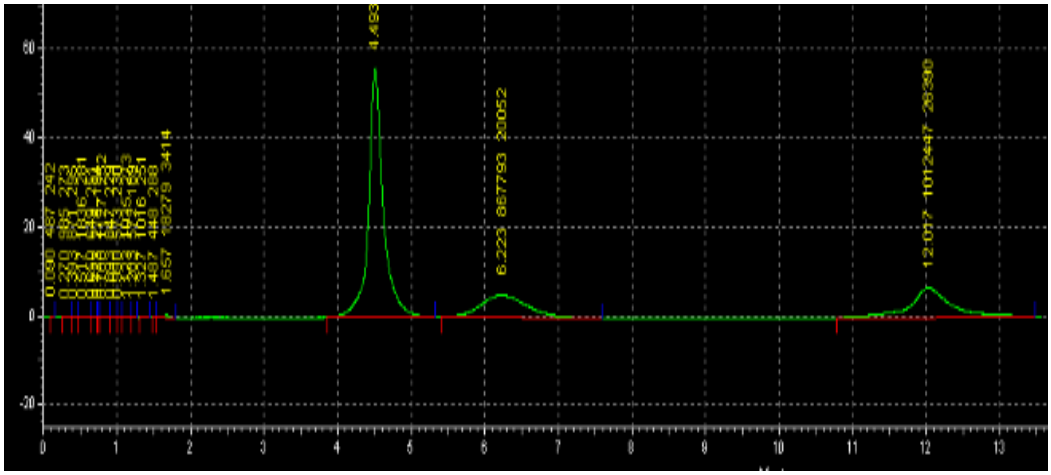
تظهر المخططات التالية(55,56,57,58,59) نتائج فصل مزيج فيتامينات B1,B6,B12 عن بعضها البعض بطريقة HPLC حيث يظهر في الشكل فيتامين B6 أولاً ثم فيتامين B12 وأخيراً يظهر الفيتامين B1 وبتراكيز مختلفة (80,90,100,110,120)%.



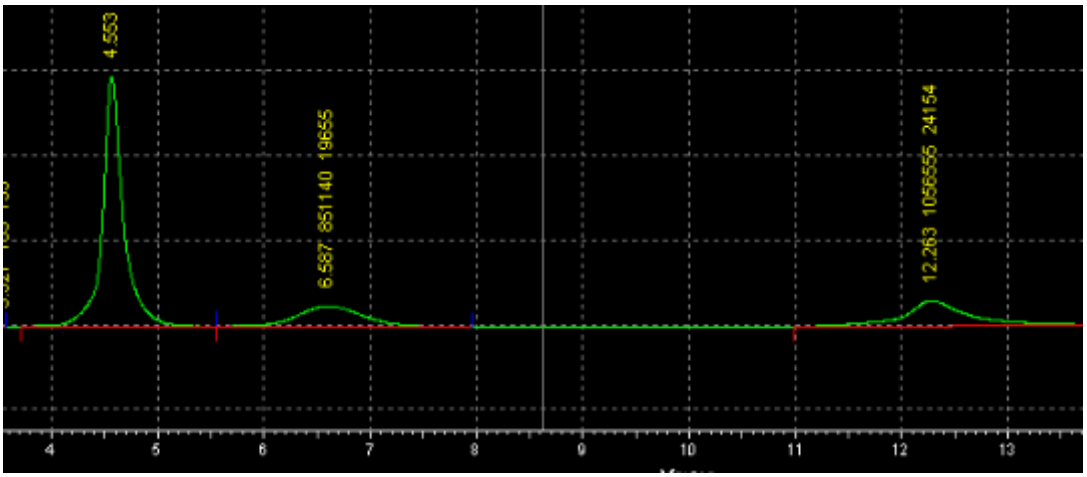
الشكل (55): يوضح مخطط فصل مزيج فيتامينات B1,B6,B12(80%) بطريقة HPLC



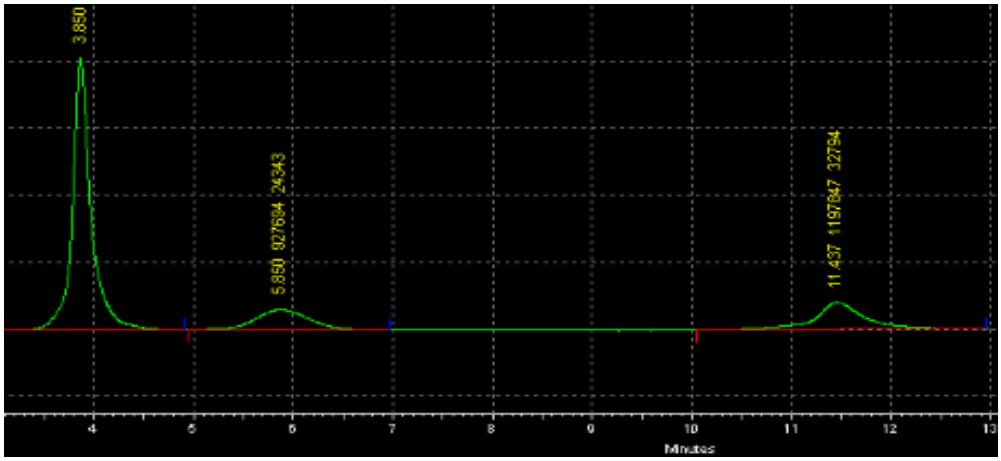
الشكل (56): يوضح مخطط فصل مزيج فيتامينات B1,B6,B12(90%) بطريقة HPLC



الشكل (57): يوضح مخطط فصل مزيج فيتامينات B1,B6,B12(100%) بطريقة HPLC

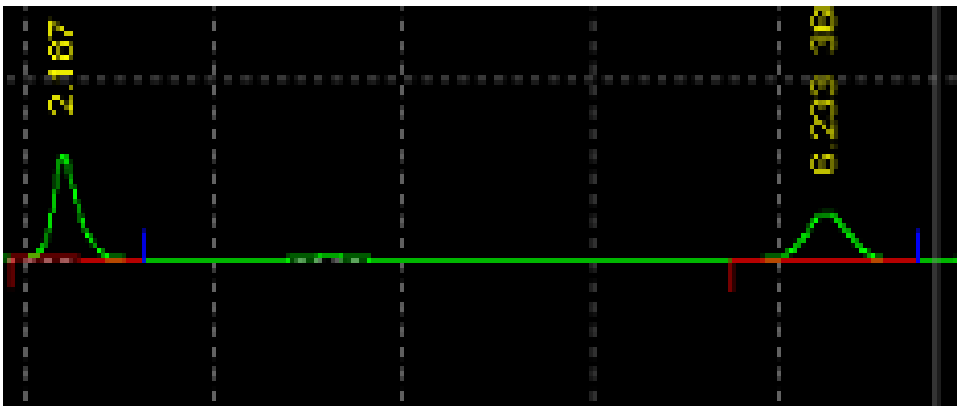


الشكل (58): يوضح مخطط فصل مزيج فيتامينات B1,B6,B12(110%) بطريقة HPLC

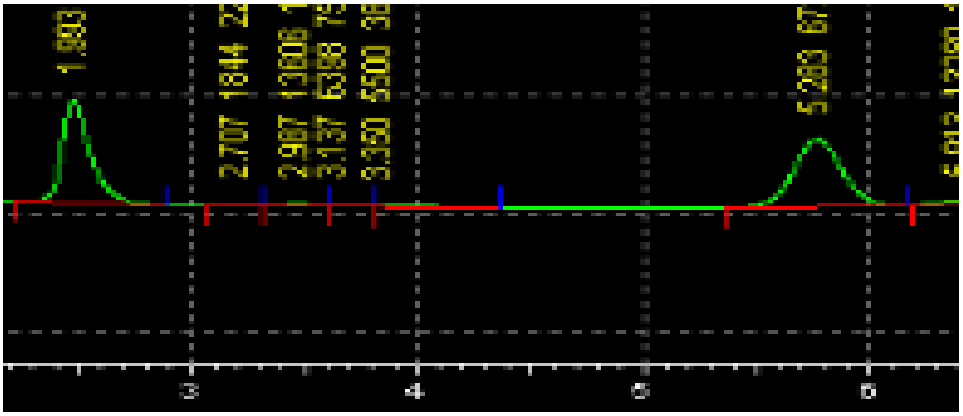


الشكل (59): يوضح مخطط فصل مزيج فيتامينات B1,B6,B12(120%) بطريقة HPLC

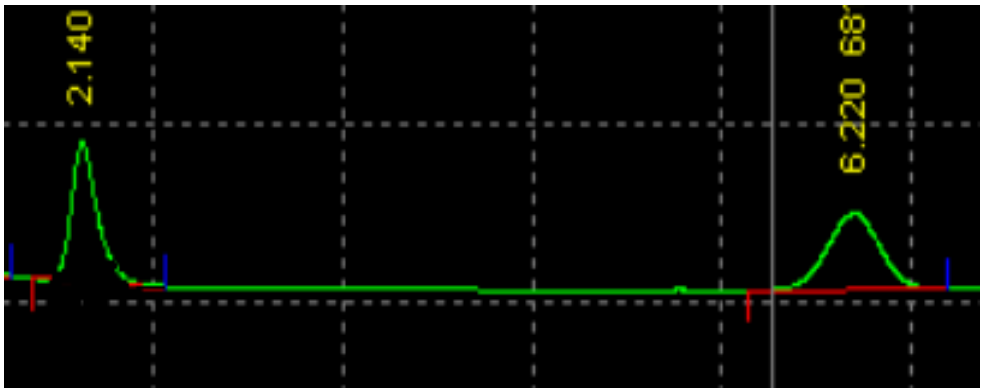
في حين تظهر المخططات (60,61,62,63) مخططات الفصل لمزيج فيتاميني A وE بطريقة HPLC حيث يظهر الفيتامين A أولاً ثم يظهر الفيتامين E حيث لا يستغرق زمن عملية الفصل أكثر من 5.3min.



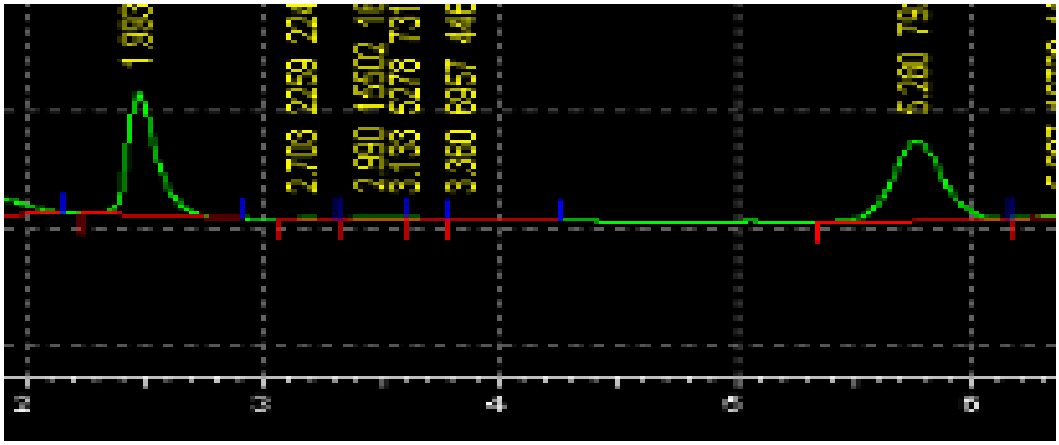
الشكل (60): يوضح مخطط فصل مزيج فيتاميني AوE (80%)بطريقة HPLC



الشكل (61): يوضح مخطط فصل مزيج فيتاميني AوE(90%) بطريقة HPLC



الشكل (62): يوضح مخطط فصل مزيج فيتاميني AوE(100%) بطريقة HPLC



الشكل (63): يوضح مخطط فصل مزيج فيتاميني AوE(130%) بطريقة HPLC

الفصل الثالث

المناقشة

1- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتاميني **A** و **E** بالطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية .

2- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتامينات **B1** و **B6** و **B12** بالطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية .

3- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتامينات **B1** و **B6** و **B12** ومزيج فيتامينيA وE بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز .

4- مقارنة نتائج الطريقتين التحليليتين المطورتين .

1- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتاميني A وE بالطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية.

لوحظ عند إجراء التحري الطيفي لمزيج فيتاميني AوE عدم ظهور فصل واضح للقمتين كما هو موضح في الشكل29 على الرغم أن فيتامين A يظهر عند 324nm و فيتامين E عند 287nm في مخطط طيف الرتبة صفر (بالرغم من أنه عند إجراء المسح الطيفي لمعياري كل فيتامين بشكل منفرد ظهر فيتامين A عند 325nm كما هو موضح في الشكل 49 وفيتامين E ظهر عند 284nm كما يوضحه الشكل48) ولكن بإجراء اشتقاق للطيف الأساسي من الرتبة الثالثة لوحظ حدوث فصلٍ واضح لكلا القمتين عن بعضهما البعض، حيث ظهر فيتامين E عند موجة 290nm و فيتامين A عند 313nm كما يوضحه الشكل37 وبالتالي فإنه بتطبيق الاشتقاق أصبح بالإمكان تحديد ومقايسة كل فيتامين في المزيج على حده، ولدى مقارنة نتائج الدراسة التي أجريناها مع نتائج الدراسة المجراة سابقاً لوحظ وجود دراسة واحدة (دراسة El Walily A.F,1991)[114] اعتمدت تقنية الاشتقاق من الرتبة الثالثة لمزيج فيتاميني AوE إلا أن هذه الطريقة استخدمت فيتامين A بشكل ريتينيل بالميتات (بينما اعتمدنا في دراستنا ريتينيل أسيتات) ولذلك استخدم بروبانول-2 كمذيب أثناء تحضير العينة، في حين استخدمنا في دراستنا الميثانول كمذيب أثناء التحضير حيث جرى تحديد حد الكم في دراستنا (كما هو موضح في الجدول 71) 0.7µg/ml لفيتامين A و 1.3µg/ml لفيتامين E.

2- مناقشة نتائج فصل ومقايسة مزيج فيتامينات B1 و B6 و B12 بالطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية .

لوحظ عند إجراء المسح الطيفي لمزيج فيتامينات B12،B6،B1 عدم ظهور فصل واضح للقمم على الرغم أن فيتامين B1 يظهر عند 241nm و فيتامين B6 عند 286nm و فيتامين B12 عند 360nm في مخطط طيف الرتبة صفر للمزيج الموضَّح في الشكل38 (بالرغم من أنه عند إجراء مسح لكل معياري فيتامين على حده ظهر فيتامين B1 عند طول موجة 246nm شكل45، بينما ظهر فيتامين B6 عند 290nm شكل46، وظهرفيتامين B12 عند 361nm الشكل47). ولكن بإجراء اشتقاق للطيف الأساسي من الرتبة الثانية لوحظ حدوث فصل واضح لكلا القمتين المتداخلتين B6،B1 عن بعضهما البعض، حيث ظهر فيتامين B1 عند موجة 246nm وفيتامين B6 عند 291nm وفيتامين B12 عند طول موجة 361nm (كما هو موضح في الشكل43) وبالتالي فإنه بتطبيق الاشتقاق أصبح بالإمكان تحديد

ومقايسة كل فيتامين على حده، ولدى مقارنة نتائج الدراسة المجراة مع نتائج الدراسة السابقة (دراسة Koyuncu I, Ozgur M,2002)[115] . في الدراسة التي أجريناها فقد كانت نتائج حد الكم كما يُوضَحه الجدول71 لفيتامين B1 0.73 µg/ml ولفيتامين B6 0.06µg/ml ولفيتامين B12 2.6µg/ml

3- مناقشة نتائج الدراسة الكروماتوغرافية لمزيج فيتامينات B1،B6،B12 و مزيج فيتاميني A وE.

لقد جرى تطوير طريقة فصلٍ ومقايسةٍ لمزيج فيتامينات B1،B6،B12 وذلك باستخدام طريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز،حيث جرت زيادة تركيز B12 بطريقة spike إلى 20µg مضافاً للتركيز الموجود في العينة المحضرة، أي وصلنا إلى حدودٍ معينةٍ في كشف فيتامين B12 والذي تصعب معايرته ضمن المزائج لصغر كميته حيث اعتمدت بعض الدراسات السابقة على مقايسة فيتامين B12 بشكلٍ مستقلٍ عن مزيج الفيتامينات B1،B6،B12 حيث جرى العمل على تعيين B12 ضمن المجال المرئي عند طول موجة 550nm في حين جرى تعيين B1,B6 معاً ضمن نفس المزيج في مجال UV عند طول موجة 290nm (دراسة Amidzic. R 2005.[118])، كما جرى العمل في دراسة أخرى أيضاً ضمن مجال UV عند طول موجة 320nm لتحديد فيتامين B12 بشكلٍ مستقلٍّ عن فيتاميني B1 وB6 (دراسة Poongothai.S وزملائه [120] 2010) تميزت الطريقة المطورة في دراستنا أنها أكثر حساسيةً من الطريقة المتبعة في الدراسات السابقة (نفس الدراسة في المرجع [118]) حيث أظهرت الدراسة السابقة أن قيمة حد الكشف للفيتامين B1 0.625µg/ml وللفيتامين B6 0.0195µg/ml بينما في دراستنا فكانت لفيتامين B1 0.28µg/ml ولفيتامين B6 0.019µg/ml كما هو موضح في الجدول70، أما فيتامين B12 فكانت حساسية الطريقة في الدراسة السابقة (نفسها في المرجع[118]) أفضل منها في دراستنا، حيث كانت قيمة حد الكشف فيها 0.0625µg/ml، أما في دراستنا فكانت 0.972µg/ml، كما تميزت الدراسة التي أجريناها عن دراسات أخرى تم إجراؤها سابقاً بأنها اتبعت نظام الشطف المتساير بينما اعتمدت الدراسات السابقة في غالبيتها على نظام الشطف المدروج (دراسة Moreno P, Salvado V,2000)[117] في التحليل، إضافةً لذلك فقد تميزت الطريقة التي أجريناها بأن الزمن الكلي لعملية الفصل كان أقل مما هو عليه في بعض الدراسات السابقة التي اعتمدت النظام المتساير(دراسة Holler U, et la, 2003 [119])،(دراسة Poongothai.S وزملائه [120] 2010)، ويوضح الشكل55

المخطط الاستشرابي لفصل مزيج فيتامينات B12،B6،B1 حيث تمكنا بهذه الطريقة ذات المصدوقية من فصل B6 و B12 و B1 عن بعضها ومقايستها ، كما جرت دراسة مزيج فيتاميني AوE بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز بالاعتماد على الدراسات السابقة (دراسة Paulo M.G, et la 1999) [116] بتغيير نوع العمود وتوصلنا لفصل المزيج الفيتاميني AوE خلال فترة زمنية لم تتجاوز 5.3min كما يوضحه الشكل 60 وكانت النتائج مماثلةً لنتائج الدراسة مع فارق زمني بسيط في فصل ريتينيل أسيتات أقل بحوالي 0.5min في دراستنا.

4- مقارنة نتائج الطريقتين التحليليتين المطورتين .

- بعد الدراسة للمزائج المفصولة بالطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية ومقارنة هذه الطريقة بطريقة الكروماتوغرفيا فقد تبين أن هذه الطريقة التحليلية تميزت عن طريقة الكروماتوغرافيا بأن التحليل فيها يتم بشكلٍ سريعٍ لا يحتاج لفترات زمنيةٍ طويلةٍ ولا لإجراءات معقدة في التحليل فقط نحتاج فيه لتحضير العينة مباشرةً ومن ثم التحليل على الجهاز الطيفي وقد أظهرت نتائج مماثلةً إلى حدٍّ كبيرٍ لنتائج الدراسة الكروماتوغرافية من ناحية الخطية والمضبوطية والدقة كما هو موضح في الجدولين (73و72) وأيضاً نجد عند مقارنة نتائج حدي الكشف والكم بالطريقة الكروماتوغرافية إلى حد ما أن الطريقة الطيفية الاشتقاقية تملك حد كشف وحد قياس كمي قريب من نتائج الطريقة الكروماتوغرافية كما هو مبين في الجداول(70-71) .
- حد الكشف وحد الكم بطريقة (HPLC):

Vitamin	B1	B6	B12	A	E
LOD µg/ml	0.28	0.019	0.972	0.34	0.47
LOQ µg/ml	0.85	0.0576	2.945	1.03	1.424

- حد الكشف وحد الكم بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي:

Vitamin	B1	B6	B12	A	E
LOD µg/ml	0.24042	0.019672	0.8542	0.2312	0.426
LOQ µg/ml	0.73	0.06	2.6	0.7	1.3

جدول رقم(72) نتائج المصدوقية للفيتامينات (B1,B6,B12,A,E) بطريقة HPLC

Vita	المضبوطية %	RT	الخطية R^2	الدقة الوسطى%	الدقة التكرارية%	النوعية% Rsd%	المتانة Rsd%		
A	99.8172	2.020	0.999	99.661 1.06524	99.8 0.7126	99.16 1.2908	1.3	1.5	1.7
							0.643	0.3	0.3308
								0.425	
E	99.862	5.397	0.999	98.4 0.9306	99.1367 0.6021	98.59667 0.5625	1.3	1.5	1.7
							0.684	0.4858	0.3449
								0.505	
B1	98.5722	12.167	0.999	100.2367 1.1605	98.725 1.526	97.32167 1.625	0.9	1	1.1
							0.436	0.3917	0.262
								0.363	
B6	99.4767	4.343	0.999	99.47556 0.6635	99.29 0.31	98.152 1.0131	0.9	1	1.1
							0.148	0.2466	0.1503
								0.182	
B12	99.567	6.289	0.997	99.343 1.707	98.834 0.663	97.915 1.3303	0.9	1	1.1
							0.1036	0.0274	0.0443
								0.06	

جدول رقم(73) نتائج المصدوقية للفيتامينات (A,E,B1,B6,B12) بالطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية

الفيتامين	طول الموجة nm	الخطية R^2	المضبوطية %	الدقة التكرارية% Rsd%	الدقة الوسطى% Rsd%	الانتقائية% Rsd%
A	314nm	0.998	99.676	100.19 0.1467	99.553 0.533	100.3267 0.2688
E	290nm	0.998	99.46	99.065 0.3326	99.56 1.13	100.35 1.073
B1	(246)nm	0.998	98.0544	100.01 0.8018	99.353 0.963	99.57 0.7214
B6	(291)nm	0.999	99.8511	99.905 0.375043	99.2011 0.57	99.536 0.7352
B12	361nm	0.997	99.4044	99.28 1.3846	99.15 1.64	99.795 0.9344

الباب الرابع

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

- تطوير طريقة تحليلية طيفية اشتقاقية لفصل ومقايسة مزيج فيتاميني (A,E) باستخدام جهاز التحليل الطيفي نوع Jascow - V- 630 ثنائي الحزمة الضوئية مزود ببرنامج اشتقاقي عن طريق اشتقاق المخطط الطيفي الأساسي للمزيج من الرتبة الثالثة كممثل عن الرتب الفردية في الاشتقاق .
- تطوير طريقة تحليلية طيفية اشتقاقية من أجل فصل ومقايسة مزيج فيتامينات (B1,B6,B12) باستخدام جهاز التحليل الطيفي نوع Jascow - V- 630 ثنائي الحزمة الضوئية مزود ببرنامج اشتقاقي عن طريق اشتقاق المخطط الطيفي الأساسي للمزيج من الرتبة الثانية كممثل عن الرتب الزوجية في الاشتقاق .
- تطوير طريقة تحليلية كروماتوغرافية لفصل ومقايسة مزيج فيتاميني AوE وأخرى لفصل ومقايسة مزيج B1,B6,B12 باستخدام جهازالكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز نوع HITACHI.
- التحقق من مصدوقية الطرق التحليلية المطورة عند دراسة كل مزيج بدراسة المتثابتات الدستورية الملائمة لكل طريقة تحليلية .
- النتائج التي جرى الحصول عليها بالتحليل الطيفي الاشتقاقي كانت قريبةً جداً من النتائج التي جرى الحصول عليها بطريقة الكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز التي درست لكل مزيج فيتاميني فيما يتعلق بدراسة متثابتات المصدوقية كما هو موضح في الجداول (70,71,72,73)
- أظهرت طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي ميزات جديدةً بوصفها طريقةً سهلةً وسريعةً، وغير مستهلكة للوقت إذ أن إجراءات تحضير العينة فيها غير معقدة ولا تتطلب مراحل كثيرة فهي لا تحتاج إلى استخلاص المادة المحللة من المطرس هذا فضلاً عن كون التحليل بها يتم بصورةٍ مباشرةٍ على العكس من الطرق الكروماتوغرافية، كما أنها طريقةٌ اقتصاديةٌ وصديقةٌ للبيئة باعتبارها لا تستهلك حجوماً كبيرةً من المذيبات، وثمن جهاز التحليل الطيفي الاشتقاقي أقل بكثير من ثمن جهاز الكروماتوغرافيا السائلة الرفيعة الإنجاز، وهي تستخدم في التحليل منذ القديم، ولكن التطور الحاصل على تقنياتها وعلى الأجهزة المستخدمة يتطلب معرفةً كافيةً من أجل تفسير النتائج التي يتم الحصول عليها بالدراسة .

- يمكن استخدام تقنيات أخرى في العملية التحليلة المجراة للحصول على النتائج كاستخدام الرامان و FTIR لما لها من أهمية في التحليل متعدد المكونات ولكننا لجأنا لاستخدام تقنية الاشتقاق لأن التقنيات السابقة تناسب العمل في مجال طيف IR حيث تستخدم قمم لورنتز(Lorenzian) بينما تستخدم قمم غوص (Gaussian) في مجال (UV - VISIBLE).
- وجود صعوبةٍ في فصل ومقايسة فيتامين B12 حيث جرى الوصول إلى حدودٍ معينةٍ في تحليله كمياً وكيفياً حيث تمكنا بعد وضع الفيتامين B12 في هذه الحدود من تطوير طريقةٍ لفصل مزيج فيتامينات (B1,B6,B12)المدروس باستخدام الكروماتوغرافيا السائل الرفيع الإنجاز بالنظام المتساير (Isocratic) ومن تحليله أيضاً بالطريقة الطيفية الاشتقاقية .

التوصيات والمقترحات

- يوصى باستخدام طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي كطريقةٍ تحليليةٍ في فصل ومقايسة المزائج الدوائية نظراً لما تتمتع به هذه الطريقة من سهولةٍ وسرعةٍ واقتصاديةٍ وملائمةٍ للبيئة ودقةٍ ومضبوطيةٍ في التحليل.
- يوصى بمتابعة العمل في مجال فصل ومقايسة مزائج المواد الدوائية باستخدام طريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي لما لها من ميزاتٍ ذكرت سابقاً وتوسيع مجال العمل ليشمل رتباً اشتقاقيةً أعلى من أجل التحقق أن الفصل يتم بشكل أفضل عند زيادة رتبة الاشتقاق.
- يوصى بمتابعة العمل في مجال التحليل الطيفي الاشتقاقي لفصل ومقايسة مزائج الفيتامينات التي درست وغيرها ضمن أشكالٍ صيدلانيةٍ مختلفةٍ تشمل الشرابات والأمبولات و النقط الفموية وبرتبٍ اشتقاقيةٍ أعلى .
- يوصى باستخدام أجهزة التحليل الطيفي المزودة ببرنامج اشتقاقي بدلاً عن أجهزة التحليل الطيفي العادية ويفضل أن تكون الأجهزة أيضاً ثنائية الحزمة الضوئية حيث يسمح ذلك بتوسيع مجال العمل في فصل ومقايسة مزائج المواد الدوائية .

الباب الخامس

الملخصات

الملخص:

تحدثنا في هذه الدراسة عن أهمية الفيتامينات كمتممات غذائية أو مواد دوائية ووظيفتها الحيوية في الجسم كتمامات إنزيمية لبعض التفاعلات الحيوية في الجسم والأمراض الناجمة عن عوز فيتامين ما. وبسبب الاستخدام الشائع للأشكال الصيدلانية الحاوية على الفيتامينات و إنتاجها الضخم من قبل شركات تصنيع الدواء فقد هدفت الدراسة إلى إيجاد طريقةٍ تحليليةٍ لفصل ومقايسة أي فيتامين ضمن أمزجته ، دون استخدامات ضخمة للمحلات. تعتمد هذه الطريقة على تقانة التحليل الطيفي الاشتقاقي، حيث تم استخدمنا جهاز التحليل الطيفي ثنائي الحزمة (double beam) نوع Jascow -V - 630 واخترنا رتبة الاشتقاق الثالثة لفصل مزيج (AوE) ورتبة الاشتقاق الثانية لفصل ومقايسة مزيج (B1,B6,B12) ، وعملنا على مقارنة نتيجة الدراسة الطيفية الاشتقاقية مع نتيجة دراسة الاستشراب السائل الرفيع الإنجاز (HPLC) التي أجريناها و تحققنا من مصدوقيتها. استخدمنا في هذه الدراسة جهاز من نوع HITACHI و استخدمنا في دراستنا عمود C18 نوع (Neucleodor 150mm×4mm , 5µm) واستخدام طور متحرك (ماء 73% + ميتانول 26% + حمض الخل الثلجي 1% بوجود كبريتات الهكسان 1.4g/l)، عند طول موجة 280nm بمعدل تدفق 1ml/min لفصل مزيج B1,B6,B6 و عمود C18 نوع (Knauer 150mm×4mm ,5µm) و طور متحرك (ميتانول 95% + أسيتونتريل 5%) لفصل مزيج فيتاميني AوE . لاحظنا أن هناك فرقاً زمنياً كبيراً لإجراء الطريقتين فزمن الاحتباس لطريقة فصل مزيج فيتاميني AوE كان 6min و 12min لفصل B1,B6,B12 بالإضافة إلى الشروط المعقدة التي نحتاج إلى ضبطها في التحاليل الاستشرابية واستخدام مذيبات كثيرة نتخلص منها عندما نستخدم الطريقة التحليلية الطيفية الاشتقاقية .

كلمات مفتاحية: الفيتامينات – متمم غذائي– أشكال صيدلانية – عوز الفيتامين – تمامة إنزيمية – تفاعلات حيوية - تحليل طيفي اشتقاقي – الاستشراب السائل الرفيع الإنجاز – متثابتات المصدوقية – الرتب الاشتقاقية – الرتبة الثالثة – الرتية الثانية - المخطط الطيفي – المخطط الطيفي من الرتبة صفر – برامج حاسوبية – التفريق - جهاز التحليل الطيفي الاشتقاقي – ثنائي الحزمة الضوئية .

Abstract

In this study we talked about the importance of vitamins as nutrition supplements and their bio function in the body as Co Enzymes of some bio reactions in the body and diseases caused by deficiency any vitamin . And because of broad uses of pharmaceutical forms containing vitamins and huge product of it from drug companies and find it as mixtures, so the aim of study was to find an analytical technique to separate and assay any vitamin in its mixtures, without huge uses of solvents .This method depended on derivative spectrophotometer technique, we used Jascow-V-630 spectrophotometer device (double beam), and chose third order derivative to analyses A,E and second order derivative to analyses B1,B6,B12. We worked to compare result of studying in derivative spectrophotometer with result studying in high performance liquid chromatography (HPLC) , that we made it and validated .We used in this study HITACHI device, and we used in our study column C18 (Nucleodur 150mm×4mm ,5µm) and mobile phase (methanol 23% + water HPLC 73% + glacial acetic acid 1% + hexane slfunateNa 1.4g/L) ,wavelength 280nm , flow rate 1ml/min in separation and assay mixture B1,B6,B12. And we used column C18 (Knauer 150mm×4mm ,5µm) and mobile phase (methanol 95% + Acetonitril 5%) HPLC,toseparate and assay A,E mixture.

We showed that there is distinction in time of procedure of both technique, retention time of analytical technique of A,E separation was 6min , B1,B6,B12 was 12min , adding to complex condition that we need to control it in chromatographic analysis and use a lot

of solvents, that we eliminated it when we use derivative spectrophotometric analytical method .

Key words: Vitamins ,nutrition supplement , pharmaceutical forms , privation of vitamin ,Co Enzyme, bio reaction ,derivative spectrophotometric analysis , high performance liquid chromatography ,validation parameters,derivative orders,third order , second order , spectrum , zero order spectrum ,computer programs ,differentiation ,double beam ,derivative spectrophotometer .

الباب السادس

المراجع

References:

1-Rouessac F, Rouessac A. Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques.(2007). 6^{th} edition:63-64,167-171, 200-202.

2-Gahche J, Bailey R, Burt V, Hughes J, Yetley E, Dwyer J, et al. Dietary supplement uses among U.S. adults. *NCHS Data Brief*, (2011); 61: 1988-1994.

3-Marra MV, Boyar AP. Position of the American Dietetic Association: nutrient supplementation. *J Am Diet Assoc.* (2009**)**; 109 (12): 2073-2085.

4- Kalpesh N, jayvadan K, Patel, Ganesh C. Rajput, Naresh B. Rajput Derivative spectrometry method for chemical analysis. A review). *Der Pharmacia Letter*; (2010);2(2):139-150.

5- Donald V, Judith G.V,Charlotte W. P. Fundamentals of Biochemistry. (2008), New York: John Wiley and Sons.

6- Jeremy B, Stryer L, John L. Biochemistry. W. H. (2006) , Freeman Company.

7- Escott-Stump S. Nutrition and Diagnosis-Related Care. 2008, 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins.

8- Mahan, L. K, Escott -Stump S. Krause's food, nutrition, and diet therapy.(2000), (10th ed). Philadelphia: W.B. Saunders Company

9- Tanphaichitr V. Thiamin. In Shils ME, Olsen JA, Shike M et al. Modern Nutrition in Health and Disease. 1999, 9th ed:288-293

10- Tee ES, Mohd Ismail N, Mohd Nasir A, and Khatijah I. Nutrient Composition of Malaysian Foods. Malaysian Food Composition Database Programme, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur ; (1997), 4th Edition:310.

11- Combs GR, Gerald F. The vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Ithaca, NY: Elsevier Academic Press. (2008) ,(3rd ed.):250-258

12- Press R. New Choices in Natural Healing. 1995 .

13- Richard N. Thiamine's Mood-Mending Qualities. Podel Nutrition Science News, January (1999):134-142
14- Bettendorff L., Mastrogiacomo F., Kish S. J., and Grisar T. Thiamine, thiamine phosphates and their metabolizing enzymes in human brain. *J. Neurochem,* (1996);66 (1): 250–258 .
15- Butterworth RF. Thiamin.In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. Modern Nutrition in Health and Disease. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins.(2006),10th.
16- Rodríguez-Martín JL, Qizilbash N, López-Arrieta JM. Thiamine for Alzheimer's disease. I*n Rodríguez, José - Luis. Cochrane Database Syst Rev*,(2001):1498
17- Spinazzi M, Angelini C, Patrini C. Subacute sensory ataxia and optic neuropathy with thiamine deficiency. (2010);6:288-293 .
18- Martin PR, Singleton CK, Sturmhofel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. Alcohol Research and Health (2003); 27 (2): 134–142.
19- Merrill AH, Henderson JM. Vitamin B6 metabolism by human liver (1990), Ann. N. Y. Acad. Sci ; 585 (1 Vitamin B6):110–117 .
20- Samuel G, and Reeves P. Biosynthesis of O-antigens, genes and pathways involved in nucleotide sugar precusor synthesis and O-antigen assembly. (2003) . Carbohydrate research .
21- Eliot A.C, Kirsch, J. F. PYRIDOXAL PHOSPHAT ENZYMES. Mechanistic, Structural and Evolutionary Considerations. Annual Review of Biochemistry.(2004) ;73: 383 –415 .
22- Gyorgy P. Vitamin B_2 and the pellagra-like dermatitis in rats. *Nature*, vol. (1934) ;133: 498–499.

23- György P, Eckardt RE. Further investigations on vitamin B6 and related factors of the vitamin B complex in rats. Parts I and II . *Biochem J*.(1934); (8–9):1143–1154 .
24- Combs G.F. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. (2008) .
25- Lichtstein HC, Gunsalus IC, Umbreit WW. Function of the vitamin B6 group; pyridoxal phosphate (codecarboxylase) in transamination. *J Biol Chem*. (1945);161 (1): 311–320.
26- Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes Vitamins. National Academies, (2001):109 -124

27- McCormick D. B, Bowman, B. A. and Russell, R. M, eds, Vitamin B_6 In Present Knowledge in Nutrition.(2006). 9th edition: 270.
28- Sauberlich H. Vitamins - how much is for keeps? (1987); 22: 20 - 28 .
29- Andrews D. Diseases of the Skin.(2007),10th Edition, Elsevier.
30- Bhagavan H.N. Interraction between vitamin B_6 and drugs. (1985), In Reynolds R.D, Leklem J.E, Vitamin B_6 Its role in Health and Disease. New York: Liss: 401– 415.
31- Leklem J. Vitamin B6: A status report. (1990);120: 1503 – 1507.
32- Sheehan P. Hyperemesis gravidarum - assessment and management. Aust Fam Physician. (2007) Sep;36(9): 698–701.
33- TLC Cooking Benefits of Vitamin B6 .
34- McCormick D.B, and Greene H.L. Vitamins In Tietz Textbook of Clin Chem.(1994), 2nd edition. Burtis V.A, Ashwood E.R, eds. Philadelphia: W.B. Saunders:1275-1316.
35- Mc.Cormick, D.B. Co-enzymes, Biochemistry. In: Encyclopedia of Human Biology. (1997), 2nd edition: 847-864.
36- McCormick, D.B. Co-enzymes, Biochemistry of Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Vol. 1. Meyers, R.A., ed. Weinheim VCH;1996: 396 - 406.
37- Vitamins and minerals – B vitamins and folic acid. *NHS. National Health Service (NHS)*. 2013-11-26:07-10.
38- Institute Of Medicine (Us) Standing Committee On The Scientific. Evaluation Of Dietary Reference Intakes And Its Panel On Folate, Other B Vitamins. (1998).
39- Washington DC,Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.*The National Academies Press*. (2008); 340 – 342 .
40- Dr. Mary Shaw Shorb – Annual Lecture. Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland. May 10, 2012.
41- Dietary Supplement Fact Sheet: Vitamin B12. Retrieved 28 September 2011. Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health.

42- Doscherholmen A, McMahon J, Ripley D. Vitamin B12 absorption from eggs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine.(1975);149 (4):987–990.
43- Albert MJ, Mathan VI, Baker SJ. Vitamin B_{12} synthesis by human small intestinal bacteria. *IN ature* .(1980);283 (5749):781–782.
44- Marks, Allan D. Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Lippincott Williams and Wilkins. (2009), 3rd ed:757 .
45- Vitamin B12, usda.gov
46- Combs - Gerald, F. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Amsterdam: Elsevier Academic Press. (2008),3rd edition .
47- Conrad , Marcel E. Pernicious Anemia.*(*August 26, 2009), emedicine.medscape.com
48- Banerjee RV, Matthews RG, Cobalamin-dependent methionine synthase.*The FASEB Journal*.(1990);4 (5):1450–1459.
49- Jaouen G. Bio organometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine. *Weinheim: Wiley-VCH*. (2006).
50- Sethi NK, Robilotti E, Sadan Y. Neurological Manifestations Of Vitamin B12 Deficiency. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*. (2005); 2 (1). doi:10.5580/5a9.

51- Masalha R, Chudakov B, Muhamad M, Rudoy I, Volkov I, Wirguin I. Cobalamin-responsive psychosis as the sole manifestation of vitamin B_{12} deficiency.(2001); *Israeli Medical Association Journal*.3: 701–703.
52- Richard S. On the Discovery' of Vitamin A".(2012)," Annals of Nutrition and Metabolism. 61 (3):192–198.
53- Chapter 4, Vitamin A of Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine.(2001) .
54- Dietary Reference Intakes Vitamins .
55- Tang G, Qin J, Dolnikowski GG, Russell RM, Grusak MA Spinach or carrots can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterated vegetables. *Am. J. Clin. Nutr*. (2005); 82 (4):821–828 .

56- Wolf G, The discovery of the visual function of vitamin A. *Journal of Nutrition*. (2001);131 (6):1647–1650 .
57- Combs – Gerald, F. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. *Burlington: Elsevier Academic Press*. (2008), 3rd edition
58- Fuchs E, Green H, Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A.(1981); 25 (3):617–625.
59- Moore T, Holmes P. D, The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice.(1971), Laboratory Animals; 5 (2):239–250.

60- Van Pelt H.M.M , De Rooij D.G. Spermatogenesis in retinol-deficient rats maintained on retinoic acid. Endocrinology, (1991) ; 128 (2):697–704 .
61- Roncone DP, Xerophthalmia secondary to alcohol-induced malnutrition. (2006):124–133.
62- Blaner WS, Olson JA. retinol and retinoic Acid metabolism In Sporn MB,Roberts AB , Goodman Ds,edsthe retinoid biology , chemistry and medicine. New York Raven press. (1994) , 2nd ed; 229-255 .
63- Cowan SW, Newcomer ME, Jones TA. Crystallographic refinement of human serum retinol binding protin at 2A resolution protins structure Funct Genet . (1990):844 – 861 .
64- Mehta RG , Moon RC , Olson JA . Intractions between retinoid and beta glocoronide and cellular retinol and retinoic acid binding protins. *Intern J Vitam Nutr Res*. (1992);26:143 – 147.
65- Evans HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* (1922); 56 (1458): 650–651.
66- Oakes ,Elizabeth H, Emerson, Gladys Anderson Encyclopedia of World Scientists. (2007):211
67- Traber MG, Chapter 15: vitamin E. In Bowman BA and Russell RM. Current Knowledge in Nutrition I (2012), (9 ed.). Washington DC, USA: ILSI.
68- Vitamin E beneficial in dementia.
69- National Institute of Health Vitamin E fact sheet.(4 May 2009).
70- Bell EF, History of vitamin E in infant nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*; .(1987); 46 (1 Suppl):183–186.

71- Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*.(2011);51(5):1000–1013.
72- Schneider C, Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*. (2005); 49 (1):7 – 30.
73- Atkinson J, Epand RF, Epand RM, Tocopherols and tocotrienols in membranes . (2008), Free radical biology and medicine ;44 (5):739 –764.
74- Whitney E, Rady Rolfes S, Williams P. Understanding Nutrition (2011), (Twelfth ed.). California.
75- Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, Bubes V, Manson JE, Glynn RJ, Gaziano JM (2008).
76- Wolfram Alpha. www.wolframalpha.com.
77- Brigelius-Flohé R, Traber MG, Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* (1 July 1999); 13 (10):1145 – 1155.
78- Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free radical biology and medicine*. (2007) ;43 (1):4 –15.
79- Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms.(2007) ; 27:347– 362.
80- Traber MG. The ABCs of vitamin E and beta-carotene absorption. *Am Nutr J Clin*, (2004);80:3 – 4.
81- Traber MG, Burton GW, Hamilton RL. Vitamin E trafficking. *Ann NY Acad Sci*. (2004) ;1031:1–12.
82- United States Pharmacopoeia (USP35 - 2013).
83- British Pharmacopoeia (2012) .
84- Anthony C Moffat M, Osselton D, Brian Widdop -Clarke's Analysis of Drugs and Poisons . (2004) .

85- Antonov L, Stoyanov S. Principles of derivative spectroscopy. *APP1. spectro*. (1993); 47:1030.

86- Barker B.E. Supra molecular chemistry scope and perspectives molecules. *Fox M.F, Chem. Soc. Rev*. (1980); 9:143.

87- Tony Owen. Fundamentals of modern UV-VISIBLE spectroscopy .(Copyright Agilent Technologies),(2000);2-9 :15-24.

88- Singleton R, Collier G. L, Brit. Patent, A6. Applications of derivative methods. (December 1953-1956);729-760.

89- Collier G, Singleton R. Derivative spectrophotometer divices. *J. Appl. Chem. (London)* ,(1956); 6:495-510.

90- Morrison J. D. First and second order derivative spectroscopy. *J. Chem. Phys*. (1953); 21:1767-1772.

91- Sasaki H, Tanaka M, Inada Y, Kaiho-Kagaku PC Kenkyukai High and low derivative orders. (1985); 7: 92-98 .

92- Morrey, J. R. Development of spectrophotometric techniques. *Anal. Chem*. (1968); 40:905-914.

93- Talsky G, Gotts C. Derivative techniques in spectroscopy. *J, Chem.-Ing.-Tech*. (1981); 53:369-373.

94- Snatzke G. Measurements, computation and application. (1983); I 171-1172.

95 - Ebel S, Abdula S, Steffens U, Walter V, Fresenius Z. Methods studying spectrum in spectrophotometric analysis. *J. Anal. Chem*. (1982);313: 24-27.

96- Horlick G, Multiple analytical frequencies and standards. *J.Anal. Chem*. (1972); 44: 943-947.

97- Kauppinen J. K, Douglas J. M, Mantsch H. Non linear Multicomponent analysis by infrared spectrophotometry. *J .Anal. Chem*.(1982);314:226-229.

98- Talsky G. Derivative Spectrophotometry (low and higher order).(1994).

99- Siano D. B, Metzler D. E. Correlation of measurements of absorbance in the ultraviolet and visible regions atdifferent slit widths.*Chem. Physical.J*. (1969); 51:1856-1861.

100- Jorgensen C. K. Principles and Practice of Spectroscopic Calibration, Chemical Analysis. *Acta Chem. Scand*. (1954); 8:1495-1501.

101- Baker C, Johnson P. S, Maddams W. R. Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet, Visible,

and Near-Infrared Spectrophotometers. *Spectro chem.J* . (1994); A 34:275-283.
102- Gans P, Modern techniques in spectroscopy. *Anal. Proc*. (1980); 17:133-135.

103- Talsky G, Mayring L , Kreutzer H. Uses of derivative spectroscopy. *Chem. Int. Ed. Engl.* (1978);17: 785-799.

104- Fell A. F, UV Spectrometry*. Group Bulletin* (1980);8: 5-31.

105- French, C S, Church A. B, Overlapping signals in zero order spectrum. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook* (1955); 54:162-165.

106- O'Haver T. C. Derivative methods in analysis. *J. Anal. Proc*. (1982);19: 22-28.

107- O'Haver T. C, Begley T. Noise in derivative studies. *J. Anal Chem*. (1981);53:1876-1878.

108- O'Haver T. C, Green G. L. Common methods to explain derivative spectrum. *J. Anal Chem*. (1976); 48: 312-318.

109- Talsky G. Methods That explanation derivative studies. *Techn. Mess*. (1981); 48:211-218.

110- Talsky G. Peak-Peak Ratio method in derivative spectrophotometer. *GIT Lab. Med*. (1983);6:182-186.

111- Morrey J. R. Particular methods in derivative techniques. *Anal. Chem,J* (1968);40: 905-914.

112- Talsky G, Fresenius Z. Characteristics of computational methods in derivative spectroscopy. *Anal. Chem .J* (1987), 327: 83-84 .

113- ICH Q2 (R1).Validation of analytical procedure: Text and methodology , (1995) .

114-El Walily A.F.Third derivative spectrophotometric simultaneous determination of vitamin A and E in some pharmaceutical preparations. *Analytica Chimica Act*.(1991); 248: 583-587.

115- Ozgur M, Koyuncu I. determination of ternary mixtures of vitamins B1,B6,B12 by zero-crossing derivative spectrophotometry. *Turk Journal Chem*. (2002); 26:385-391.
116- Paoul M.G, Marques H.M.C, Morais J.A.G, and Almeida A.J. RP chromatographic method to separation and assay of vitamin A acetate and vitamin E acetate in liquid preparations. *Journal. Pharm. Biomed. Anal*.(1999);21:399.
117- Moreno P, Salvado V. Separation and determination of vitamins B1,B6,B2,B3,B12 in multi Vitamin preparations by HPLC method. *Journal. Chromatography A*. (2000); 870: 207.
118- Amidzic R, Broboric J, Cudina O, and Vladimirov S. (RP-HPLC determination of vitamins B1,B6,B3,folic acid, and B12 in multi vitamin tablets. *Journal. Serb. Chem. Soc*. (2005); 70(10): 1229-1235.
119- Holler U, Knobel A, Hoffman P, and Spitzer V, RP-HPLC method to separation and assay of vitamins B1,B6,B2,B3 in multivitamin preparations. *Journal. Pharm. Biomed. Anal*. (2003); 131:151.
120- Poongothai. S, Ilavarasan. R, Karrunakaran. C . Simultaneous and accurate determinations of vitamins B1,B6,B12 and alpha lipoic acid in multivitamin capsule by reverse–phase high performance liquid chromatographic method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.vol 2;2010.

قائمة الجداول (List of tables)

رقم الجدول	اسم الجدول	رقم الصفحة
1	متثابتات مصدوقية الطريقة التحليلية حسب USP	72
2	الدراسات الاشتقاقية السابقة	74
3	الدراسات الكروماتوغرافية السابقة	76 - 75
4	نتائج الخطية بالطريقة الطيفية الاشتقاقية للفيتامين A	99
5	نتائج الخطية بالطريقة الطيفية الاشتقاقية للفيتامين E	100
6	نتائج الخطية للفيتامين B1 بالطريقة الاشتقاقية	101
7	نتائج الخطية للفيتامين B6 بالطريقة الاشتقاقية	102
8	نتائج الخطية للفيتامين B12 بالطريقة الاشتقاقية	103
9	نتائج المضبوطية للفيتامين E بالطريقة الاشتقاقية	110
10	نتائج المضبوطية للفيتامين A بالطريقة الاشتقاقية	111
11	نتائج المضبوطية للفيتامين B1 بالطريقة الاشتقاقية	111
12	نتائج المضبوطية للفيتامين B6 بالطريقة الاشتقاقية	112
13	نتائج المضبوطية للفيتامين B12 بالطريقة الاشتقاقية	112
14	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين A بالطريقة الاشتقاقية	113
15	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين E بالطريقة الاشتقاقية	113
16	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين B1 بالطريقة الاشتقاقية	114
17	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين B12 بالطريقة الاشتقاقية	114
18	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين B6 بالطريقة الاشتقاقية	115
19	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين A بوجود ثلاثة محللين A,B,C	115
20	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين E بوجود ثلاثة محللين A,B,C	116
21	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين B1 بوجود ثلاثة محللين A,B,C	116
22	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين B6 بوجود ثلاثة محللين A,B,C	117
23	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين B12 بوجود ثلاثة محللين A,B,C	117
24	نتائج الدقة الوسطى A ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	118
25	نتائج الدقة الوسطى A ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	118
26	نتائج الدقة الوسطى E ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	119
27	الدقة الوسطى E ضمن 3 أيام واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	119
28	الدقة الوسطى B1 ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	119
29	نتائج الدقة الوسطى B1 ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	120
30	الدقة الوسطى B6 ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	120
31	نتائج الدقة الوسطى B6 ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	120
32	الدقة الوسطى B12 ضمن يوم واحد بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	121
33	نتائج الدقة الوسطى B12 ضمن 3 أيام بالتحليل الطيفي الاشتقاقي	121
34	نتائج الإنتقائية للفيتامين A بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	122
35	نتائج الإنتقائية للفيتامين E بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	122
36	نتائج الإنتقائية للفيتامين B1 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	123
37	نتائج الإنتقائية للفيتامين B6 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	123
38	نتائج الإنتقائية للفيتامين B12 بطريقة التحليل الطيفي الاشتقاقي	124
39	متثابتتات ملائمة النظام لطريقة HPLC	126
40	نتائج الخطية للفيتامين A بطريقة HPLC	127

41	نتائج الخطية للفيتامين E بطريقة HPLC	128
42	نتائج الخطية للفيتامين B1 بطريقة HPLC	129
43	نتائج الخطية للفيتامين B6 بطريقة HPLC	130
44	نتائج الخطية للفيتامين B12 بطريقة HPLC	131
45	نتائج المضبوطية للفيتامين A بطريقة HPLC	132
46	نتائج المضبوطية للفيتامين E بطريقة HPLC	132
47	نتائج المضبوطية للفيتامين B1 بطريقة HPLC	133
48	نتائج المضبوطية للفيتامين B6 بطريقة HPLC	133
49	نتائج المضبوطية للفيتامين B12 بطريقة HPLC	134
50	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين E بطريقة HPLC	134
51	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين A بطريقة HPLC	135
52	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين B1 بطريقة HPLC	135
53	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين B6 بطريقة HPLC	136
54	نتائج الدقة التكرارية للفيتامين B12 بطريقة HPLC	136
55	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين A بطريقة HPLC (3محللين)	137
56	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين E بطريقة HPLC (3محللين)	137
57	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين B1 بطريقة HPLC (3محللين)	138
58	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين B6 بطريقة HPLC (3محللين)	138
59	نتائج الدقة الوسطى للفيتامين B12 بطريقة HPLC (3محللين)	139
60	نتائج الإنتقائية للفيتامين A بطريقة HPLC	139
61	نتائج الإنتقائية للفيتامين E بطريقة HPLC	140
62	نتائج الإنتقائية للفيتامين B1 بطريقة HPLC	140
63	نتائج الإنتقائية للفيتامين B6 بطريقة HPLC	141
64	نتائج الإنتقائية للفيتامين B12 بطريقة HPLC	141
65	نتائج المتانة للفيتامين A بطريقة HPLC	142
66	نتائج المتانة للفيتامين E بطريقة HPLC	142
67	نتائج المتانة للفيتامين B1 بطريقة HPLC	143
68	نتائج المتانة للفيتامين B6 بطريقة HPLC	143
69	نتائج المتانة للفيتامين B12 بطريقة HPLC	144
70	نتائج حد الكم وحد الكشف بطريقة HPLC	145- 152
71	نتائج حد الكم وحد الكشف بطريقة التحليل الاشتقاقي الطيفي	145- 152
72	نتائج المصدوقية للفيتامينات المدروسة بطريقة (HPLC)	153
73	نتائج المصدوقية للفيتامينات المدروسة بالطريقة الاشتقاقية	153

قائمة الأشكال (list of figures)

رقم الشكل	اسم الشكل	رقم الصفحة
1	صيغة الإيزوبرين	13
2	صيغة الثيامين هيدروكلوريد	14
3	صيغة ثيامين بيرو فوسفات	15
4	صيغة البيريدوكسين	23
5	صيغة البيريدوكسال	23
6	صيغة البيريدوكسامين	23
7	التحول للشكل الفعال بيريدوكسال فسفات	24
8	الآلية الحيوية لعمل فيتامين B6	27
9	صيغة سيانوكوبالامين	29
10	يوضح آلية امتصاص B12 وارتباطه مع IF	31
11	الآلية الحيوية لعمل B12	32
12	صيغ طلائع فيتامين A	35-34
13	صيغ تواجد فيتامين A	36
14	صيغة فيتامين E	40
15	معالم أساسية في الطيف الضوئي الأساسي للمواد المدروسة	52
16	منحني غوس Gaussian	56
17	منحني لورنتز Lorentzian	56
18	الرتب الاشتقاقية من الأولى حتى الرابعة	58
19	طريقة PEAK METHOD في تقييم الطيف الاشتقاقي	63
20	طريقة Peak – TANGENT في تقييم الطيف المشتق	63
21	طريقة PEAK – ZERO في التقييم للطيف المشتق	64
a22	HALF WAVE في تقييم الطيف الاشتقاقي	65
b22	يمثل الجزء الموجب من القمة الاشتقاقية المدروسة	65
23a	يمثل الإشارتين لإشارات مشتقة في طريقة P-E	65
23b	يمثل تراكب الإشارتين في الشكل a	65
24a	طريقة PPR حيث تحسب كل مادة على حده	66
24b	يوضح طريقة SPSR	66
25	منحني التعيير للفيتامين A بالاشتقاق	99
26	منحني التعيير للفيتامين E بالاشتقاق	100
27	منحني التعيير للفيتامين B1 بالاشتقاق	101
28	منحني التعيير للفيتامين B6 بالاشتقاق	102
29	منحني التعيير للفيتامين B12 بالاشتقاق	103
30	التداخل بين فيتاميني A و E في طيف الرتبة صفر لمزيجهما	104
31	مشتق الرتبة الثالثة لفيتاميني A,E بتركيز 80%	104
32	المشتق الثالث لفيتاميني A,E بتركيز 90%	104
33	مشتق الرتبة الثالثة لفيتاميني A,E بتركيز 100%	105
34	مشتق الرتبة الثالثة لفيتاميني A,E بتركيز 110%	105
35	المخطط الاشتقاقي لفيتاميني A,E بتركيز 120%	105
36	المخطط الاشتقاقي لفيتاميني A,E بتركيز130%	106

37	مخطط الطيف الاشتقاقي من الربية الثالثة للفيتامينين A وE	106
38	المخطط الأساسي (رتبة صفر) لمزيج فيتامينات B1,B6,B12	106
39	مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B رتبة ثانية بتركيز (80%)	107
40	مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B رتبة ثانية بتركيز (90%)	107
41	مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B بتركيز (100%)	107
42	مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B رتبة ثانية بتركيز (120%)	108
43	مشتق الرتبة الثانية لمزيج فيتامينات B رتبة ثانية بتركيز (110%)	108
44	مخطط الاشتقاق رتبة ثانية لمزيج فيتامينات B بتركيز (130%)	108
45	فيتامين B1 حيث الامتصاص الأعظمي له في الرتبة صفر(246nm)	109
46	فيتامين B6 وقمة امتصاصه الأعظمي رتبة صفر (290nm)	109
47	فيتامين B12 وقمة امتصاصه الأعظمي في الرتبة صفر (361nm)	109
48	يوضح فيتامين Eفي الرتبة صفر وقمة امتصاصه الأعظمي (284nm)	109
49	يوضح فيتامين A رتبة صفر وقمة امتصاصه الأعظمي (325nm)	110
50	منحني التعيير للفيتامين A بطريقة HPLC	127
51	منحني التعيير للفيتامين E بطريقة HPLC	128
52	منحني التعيير للفيتامين B1 بطريقة HPLC	129
53	منحني التعيير للفيتامين B6 بطريقة HPLC	130
54	منحني التعيير للفيتامين B12 بطريقة HPLC	131
55	مخطط الفصل لفيتامينات B1,B6,B12(80%) بطريقة HPLC	145
56	مخطط الفصل لفيتامينات B1,B6,B12(90%) بطريقة HPLC	146
57	مخطط الفصل لفيتامينات B1,B6,B12(100%) بطريقة HPLC	146
58	مخطط الفصل لفيتامينات B1,B6,B12(110%) بطريقة HPLC	146
59	مخطط الفصل لفيتامينات B1,B6,B12(120%) بطريقة HPLC	147
60	مخطط الفصل لفيتاميني A,E (80%)بطريقةHPLC	147
61	مخطط الفصل لفيتاميني A,E(90%) بطريقةHPLC	147
62	مخطط الفصل لفيتاميني A,E(100%) بطريقةHPLC	148
63	مخطط الفصل لفيتاميني A,E(130%) بطريقةHPLC	148

قائمة الاختصارات (List of abbreviation)

B1	Thiamin or vitamin B1
B6	Pyridoxine or vitamin B6
B12	Cyanocobalamin or vitamin B12
A	Retinol or vitamin A
E	Tochopherol or vitamin E
4-PA	4-pyredoxoic acid
PM	Pyridoxamine
PL	Pyridoxal
PN	Pyridoxine
PLP	Pyridoxal phosphate
Amax	Maximum absorbance
T	Transmittance
A	Absorbance
ε	معامل الامتصاص المولي
IR	Infra Red
λ_{max}	Maximum wavelength
$\mathrm{E_{total}}$	Total energy
$\mathrm{E_{elc}}$	Electronic energy
$\mathrm{E_{vib}}$	Vibration energy
$\mathrm{E_{rot}}$	Rotation energy
d	First derivative
d^2	Second derivative
d^3	Third derivative
c	Concentration
$fwhm$	Width at half peak
σ	Inflection point
U^0	Polynomial in zero order
SNR	Signal to noise ratio
P – T	Peak – TANGENT method
P – Z	PEAK – ZERO method
P – P	PEAK – PEAK RATIO method
E – P-	EXTENDED PEAK – PEAK RATIO P method
SP – SR	SIDE PEAK – SIDE RATIO method
BP	Binding protein
DRI	Dietary Reference Intakes
RBP	Retinol binding protein
RE	Retinol Equivalence
RAE	Retinol Activity Equivalence
S.NO	Sample Number

Prac - Con	Practical concentration
RF	معامل الاستجابة
vita	Vitamin
FAD	Flavin adenine di nucleotide
NAD	Niacin adenine di nucleotide