

Spectrophotometric Determination of Thiamine hydrochloride Via Oxidative Coupling Reaction Using 4-Aminoantipyrine

Reem A. Al-Luhaiby^{1*}, Mohammed S. Al-Enizzi²

^{1,2}Department of Chemistry, College of Education for Girls, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: ^{1*}remawy92@gmail.com, ²mohammedsalim1977@yahoo.com

(Received April 08, 2020; Accepted May 30, 2020; Available online December 01, 2020)

DOI: [10.33899/edusj.2020.126895.1062](https://doi.org/10.33899/edusj.2020.126895.1062). © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract:

A sensitive spectrophotometric method has been developed for the determination of thiamine hydrochloride by oxidative coupling reaction of thiamine with the reagent 4-aminoantipyrine (4-AAP) in the presence of copper sulphate as oxidizing agent in alkaline medium forming a reddish brown colour. The product show maximum absorption at 335 nm. The molar absorptivity is 26410.59 l/mol.cm for concentrations obeyed Beer's law in the range 0.2-18 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. The recovery was 100.93 % with relative standard deviation < 2.0 % for thiamine hydrochloride. Thiamine and reagent 4-AAP product was formed in the ratio of 1:1. The stability constant of the product was $3.39 \times 10^6 \text{ l.mol}^{-1}$ for thiamine hydrochloride indicating the good stability of this product. The optimum conditions for full colour development are described and the proposed method was applied successfully for determination of thiamine in the pharmaceutical preparation (Neurorubine). The common excipients used as additives in pharmaceutical do not interfere in the proposed method.

Key words: Oxidative coupling; Spectrophotometry; Thiamine hydrochloride; 4-aminoantipyrine

التقدير الطيفي لهيدروكلوريد الثيامين بواسطة تفاعل الاقتران التأكسدي باستخدام 4-امينوانتي بايرين

ريم عبد اللهبي^{1*}، محمد سالم العنزي²

^{1,2}قسم الكيمياء، كلية التربية للبنات، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة:

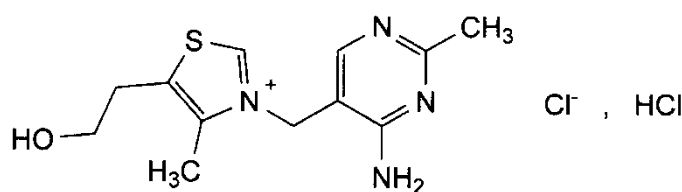
تم تطوير طريقة طيفية حساسة لتقدير هيدروكلوريد الثيامين عن طريق الاقتران التأكسدي للثيامين مع الكاشف 4-امينوانتي بايرين (4-AAP) بوجود كبريتات النحاس المائية كعامل مؤكسد في وسط قاعدي مكوناً لوناً بنياً محمراً. اظهر الناتج اقصى امتصاص عند 335 نانوميتر. وكانت الامتصاصية المولارية 26410.59 لتر/مول. سم لتراكيز اتبعت قانون بير بحدود 0.2 - 18 مايكروغرام. ملتر⁻¹. وكانت دقة الطريقة 100.93% في حين كانت التوافقية اقل من 2.0% للثيامين. لقد وجد ان الثيامين يكون ناتجاً مع الكاشف 4-AAP بنسبة 1:1. وكان معدل ثابت الاستقرار للمعقد المتكون $3.39 \times 10^6 \text{ لتر. مول}^{-1}$ للثيامين مما يدل على الاستقرار الجيد لذلك الناتج. تمت دراسة الظروف المثلى للتفاعل وطبقت الطريقة بنجاح لتقدير الثيامين في المستحضر

الصيدلاني (Neurorubine)، كما بينت النتائج عدم حدوث تداخل في الطريقة المطورة من قبل المواد السواغ بوصفها مضافات في المستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: الأقتران التأكسدي، مطياف فوتومتري، هيدروكلوريد الثيامين، 4-امينوانتي بايرين

المقدمة

هيدروكلوريد الثيامين هو مركب دوائي له القابلية على الذوبان في الماء، يوجد في الأطعمة كالحبوب واللحوم والمكسرات والبقول والبالاء وله أهمية في تحول الكربوهيدرات من الأطعمة إلى مركبات يحتاجها الجسم، يستخدم للوقاية والعلاج من مرض البري بري والألم العصبي. ويؤدي نقصه إلى الشعور بالضيق والإرتباك وفقدان الوزن كما يمكن أن يؤدي للوفاة إذا لم يعالج⁽¹⁾. ويمتلك هيدروكلوريد الثيامين التركيب الكيميائي الآتي:



3- [(4-amino-2-methyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium [1], hydrochloride
M.wt = 337.3 gm .mol⁻¹

وقد تم استخدام عدة طرق تحليلية في تقدير الثيامين منها الطرق الطيفية⁽²⁻¹¹⁾، والكروماتوغرافية⁽¹²⁻¹⁵⁾، والكهربائية⁽¹⁶⁾. في هذا البحث تم تقدير الثيامين طيفياً عن طريق تفاعل الاقتران التأكسدي مع كاشف 4-امينوانتي بايرين بوجود كبريتات النحاس كعامل مؤكسد وفي وسط قاعدي وتم تطبيق الطريقة بنجاح على المستحضر الصيدلاني (Neurorubine).

الجزء العملي Experimental part

الأجهزة المستخدمة Apparatus used

تمت القياسات الطيفية بواسطة جهاز "المطياف الفوتومتري ثنائي الحزمة من نوع Shimadzu UV-1800 Double-beam spectrophotometry" واستخدمت خلايا زجاجية نوع glass ذات عرض 1 سم، وتم الوزن باستخدام "الميزان الحساس نوع (ae ADAM)" وأجري التسخين باستخدام "الحمام المائي نوع (elektro.mag)"، وقيست حامضية المحاليل "بجهاز الدالة الحامضية من نوع (inolab pH 7110)".

محاليل المواد الكيميائية

كانت جميع المواد الكيميائية المستخدمة على درجة عالية من النقاوة.

- هيدروكلوريد الثيامين (100 جزء لكل مليون) حضر بإذابة 0.010 غم من المادة النقية في الماء المقطر ثم نقل إلى قنينة حجمية سعة 100 ملتر.
- 4-امينوانتي بايرين (1%) حضر بإذابة 1.0 غرام من المادة النقية في الماء المقطر ثم نُقل إلى قنينة حجمية سعة 100 ملتر.

- كبريتات النحاس المائية ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (0.1%) حضر بإذابة 0.10 غم من المادة النقية في الماء المقطر ثم نُقل الى قنينة حجمية سعة 100 مللتر.

- هيدروكسيد الصوديوم ($10 \times 5.0 \times 10^{-2}$ مولاري) حضر بإذابة 0.50 غم من المادة النقية في الماء المقطر ثم نقل الى قنينة حجمية سعة 250 مللتر.

النتائج والمناقشة

1- الأختبارات الأولية :

عند إضافة 1.0 مللتر من 4-امينوانتي بايرين بتركيز 1% الى 1.0 مللتر من الثيامين وبتركيز 100 مايكروغرام/ مللتر، ثم إضافة 1.0 مللتر من العامل المؤكسد كبريتات النحاس المائية و 1.0 مللتر من هيدروكسيد الصوديوم، وأكمل الحجم بالماء المقطر الى 25 مللتر وترك المحلول لمدة 10 دقائق في درجة حرارة المختبر (30°م)، وقيس طيف الامتصاص للمحلول البني المحمر الناتج ووجد ان اعلى امتصاص يصل اليه المركب الدوائي عند الطول الموجي 335 نانوميتر.

2- دراسة ظروف التفاعل المثلى

درس تأثير عدة متغيرات في شدة الامتصاص للمعد المتكون بغية الحصول على الظروف المثالية للتفاعل بين الثيامين والكاشف 4-امينوانتي بايرين، اذ أجريت الدراسات التالية باستخدام 4.0 مايكروغرام/ مللتر من الثيامين.

دراسة كمية الكاشف 4-AAP

درس تأثير كمية الكاشف 4-امينوانتي بايرين على تكوين الناتج وذلك بإضافة حجوم مختلفة من 4-AAP تتراوح بين (0.0-2.0) مللتر تركيزه 1% على الثيامين و 1.0 مللتر من كبريتات النحاس المائية تركيز (0.1%) و 1.0 مللتر من هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 5×10^{-2} مولاري واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة ثم تركت المحاليل لمدة 10 دقائق في درجة حرارة المختبر (30°م)، وقيست الامتصاصات عند 335 نانوميتر، والجدول (1) يبين ان الحجم الامثل من الكاشف هو 1.0 مللتر.

الجدول (1) كمية الكاشف 4-امينوانتي بايرين

MI of 4-AAP (1%)	Without	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0
Absorbance	0.11	0.179	0.203	0.237	0.316	0.302	0.143

دراسة العامل المؤكسد

دُرِس تأثير عدد من العوامل المؤكسدة بتركيز 0.1% لكل منها لمعرفة تأثيرها على الامتصاص حيث اضيف 1.0 مللتر من محاليل هذه المواد الى سلسلة القناني والتي تحتوي على المركب المدروس والكمية المثلى من الكاشف وجعل الوسط قاعدياً بإضافة 1.0 مللتر من هيدروكسيد الصوديوم ثم خففت المحاليل بالماء المقطر الى حد العلامة وقيس الامتصاص عند 335 نانوميتر مقابل محاليلها الصورية، اظهرت الدراسة ان افضل عامل مؤكسد هو كبريتات النحاس المائية ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

الجدول (2) تأثير نوع العامل المؤكسد في شدة امتصاص الناتج

Oxidizing agent 0.1%	Absorbance
Copper Sulphate.5H ₂ O	0.316
N- Bromosuccinimide	0.005
Potassium Dichromate	0.118
Potassium Iodate	0.108
Sodium nitroprusside	0.121
Potassium Periodate	0.095
Potassium hexacyano ferrate(III)	0.125

دراسة حجم العامل المؤكسد

درس افضل حجم للعامل المؤكسد كبريتات النحاس المائية وذلك باستعمال حجوم متزايدة من العامل المؤكسد (3.0-0.0) مللتر، الجدول (3) يبين الحجم الامثل من العامل المؤكسد.

الجدول (3) دراسة حجم العامل المؤكسد

MI of 0.1% CuSO ₄ .5H ₂ O	Without	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Absorbance	0.044	0.259	0.316	0.329	0.343	0.300	0.291

دراسة نوع القاعدة

من اجل اختيار القاعدة المناسبة للحصول على اعلى حساسية حضرت محاليل تحتوي على تراكيز متساوية من هيدروكلوريد الثيامين (4.0 مايكروغرام/ مللتر) واذيف 1.0 مللتر من الكاشف و2.0 مللتر من كبريتات النحاس المائية و1.0 مللتر من محاليل القواعد المختلفة ذات تركيز 5×10^{-2} مولاري وتم تخفيف المحاليل بالماء المقطر الى حد العلامة وقياس الامتصاص عند 335 نانوميتر مقابل المحلول الصوري، الجدول (4) يوضح النتائج التي تم التوصل اليها.

الجدول (4) تأثير نوع القواعد

Base (5×10^{-2} M)	NaOH	KOH	NH ₄ OH	Na ₂ CO ₃
Absorbance	0.343	0.272	0.110	0.115

تأثير حجم القاعدة والذالة الحامضية

تمت دراسة افضل حجم من هيدروكسيد الصوديوم بتركيز (0.05 مولاري) وقياس pH المحاليل، ويبين الجدول (5) الذالة الهيدروجينية المثلى والحجم الامثل في التقدير وتم استخدامه في التجارب اللاحقة.

الجدول (5) تأثير كمية القاعدة

Volume of NaOH 5×10^{-2} M (ml)	Without	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0
Absorbance	0.012	0.122	0.234	0.343	0.243	0.217
Final pH	6.4	9.6	10.4	10.7	10.10	11.3

ومن الجدول السابق يتبين ان 1.0 ملتر من القاعدة اعطى اعلى امتصاص عند دالة حامضية 10.7 لذا اعتبر الحجم الامثل في تقدير الثيامين.

كما درس تأثير (1.0 ملتر) من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 10×5^{-2} مولاري على امتصاص المعقد الناتج ووجد بأن اضافته يسبب نقصاناً في شدة الامتصاص لذا تم استبعاد اضافة الحامض.

تأثير المحاليل المنظمة

درس تأثير عدة انواع من المحاليل المنظمة بدالة هيدروجينية 10.7 في امتصاص معقد الثيامين - 4-امينوانتي بايرين، ويوضح الجدول الاتي النتائج التي تم التوصل اليها.

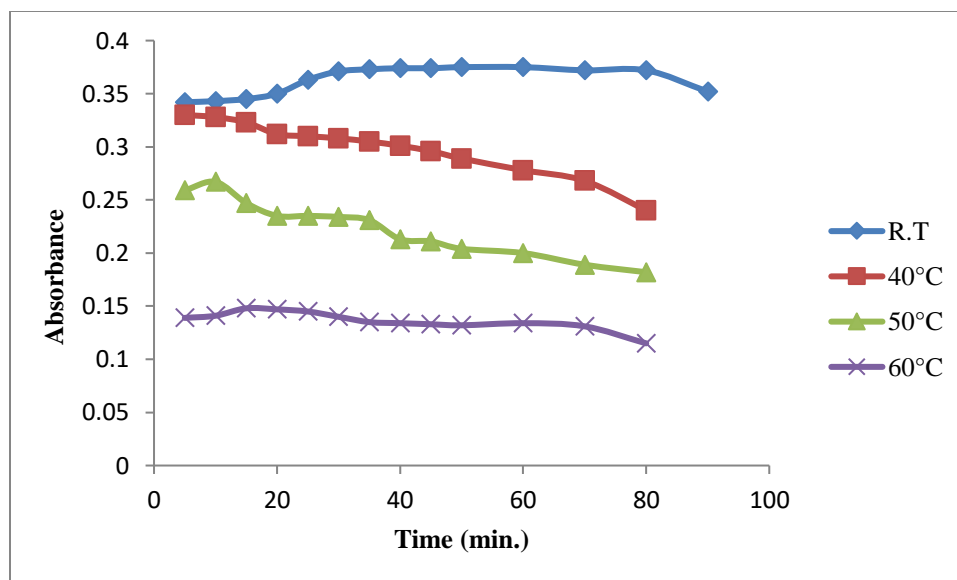
الجدول (6) تأثير انواع المحاليل المنظمة في امتصاص المعقد

Buffer solution pH 10.7	Absorbance
Without buffer (in presence of NaOH)	0.343
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$	0.253
$\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$	0.262
$\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$	0.287

تبين النتائج في الجدول اعلاه ان استخدام المحاليل المنظمة يؤدي الى نقصان في امتصاص المعقد لذا تم استبعادها في التجارب اللاحقة.

تأثير درجة الحرارة والزمن

درس تأثير درجة الحرارة وزمن استقرار النواتج عند درجات حرارة (30-60°م) بوجود كمية ثابتة من الثيامين 4.0 مايكروغرام/ملتر والكميات المثلى من الكاشف والعامل المؤكسد والقاعدة ثم اكمال الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر وقياس الامتصاص عند 335 نانوميتر، يشير الشكل (1) ان المعقد يتكون بأعلى حساسية بعد 25 دقيقة من الاضافات عند 30°م (درجة حرارة المختبر) ويبقى مستقراً اكثر من 50 دقيقة.



الشكل (1) دراسة درجة الحرارة وزمن الاستقرار

دراسة تأثير مواد الشد السطحي

لغرض زيادة الحساسية درس تأثير عدد من مواد الشد السطحي ووجد بان تأثيرها سلبي على قيم الامتصاص لذلك أستبعدت من الدراسات اللاحقة.

تأثير تسلسل الاضافة

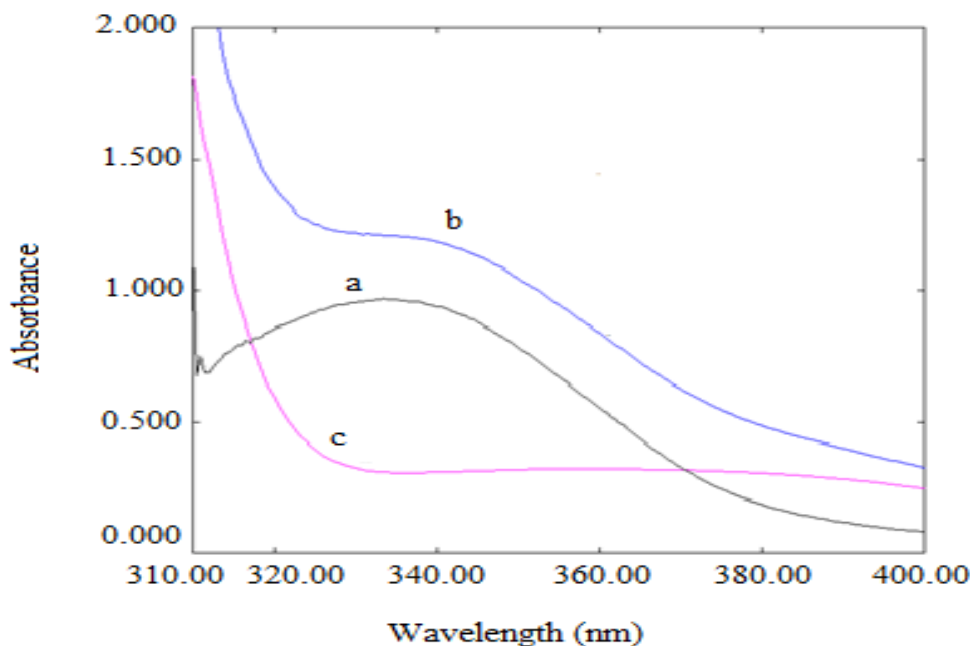
درس تأثير تسلسل الاضافة على قيم امتصاص معقد الثيامين - 4-امينوانتي بايرين بإضافات متغيرة الترتيب للمركب الدوائي (S) والكاشف (R) والعامل المؤكسد (O) والقاعدة (B) مع مراعاة الظروف المثلى اللازمة لها، الجدول (7) يبين ان اضافة المحاليل بالتسلسل I والذي كان متبعاً في التجارب السابقة يعطي اعلى امتصاص للنواتج.

الجدول (7) تأثير تسلسل الاضافة في تقدير هيدروكلوريد الثيامين

Order Number	Reaction component	Absorbance
I	S +R +O +B	0.364
II	S+O+B+R	0.330
III	S+B+R+O	0.361
IV	S+O+R+B	0.290
V	R+O+B+S	0.297
VI	R+B+O+S	0.211
VII	R+O+S+B	0.332

الطيف النهائي

تم رسم الطيف النهائي لنواتج الثيامين مع (4-AAP) عند اطوال موجية 310-400 نانوميتر. لقد وجد ان اقصى امتصاص للنواتج عند 335 نانوميتر، الشكل (2) يبين الرسم النهائي للثيامين.

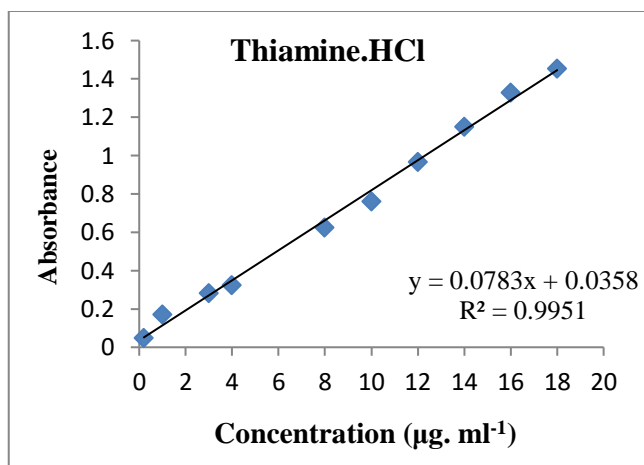


الشكل (2) طيف الامتصاص النهائي

a: النواتج الملون للثيامين (12 مايكروغرام. ملتر⁻¹) مقابل المحلول الصوري b: النواتج الملون للثيامين مقابل الماء المقطر c: المحلول الصوري مقابل الماء المقطر

دراسة المنحنى القياسي

الى مجموعة قناني حجمية سعة 25 ملتر تمت اضافة كميات تتراوح بين 0.05-4.5 ملتر من محلول 100 مايكروغرام. ملتر⁻¹ من هيدروكلوريد الثيامين تتبعه اضافة 1.0 ملتر من محلول 4-امينوانتي بايرين (1%) و 2.0 ملتر من محلول كبريتات النحاس المائية (0.1%) و 1.0 ملتر من محلول القاعدة (5⁻² 10⁻² مولاري). اكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر وتركت المحاليل عند درجة حرارة المختبر (30^oم) لمدة 25 دقيقة، وتم قياس الامتصاص مقابل المحلول الصوري عند الطول الموجي 335 نانوميتر. والشكل (3) يوضح المنحنى القياسي الذي يطبع قانون بير ضمن المدى (0.2 - 18) مايكروغرام/ ملتر، بلغت قيمة معامل الامتصاص المولاري 26410.59 لتر/ مول . سم في حين بلغ حد الكشف 0.229 مايكروغرام/ ملتر والحد الكمي 0.766 مايكروغرام/ ملتر .



الشكل (3) المنحنى القياسي لتقدير هيدروكلوريد الثيامين

الجدول (8) المواصفات الخطية والمدى التقديري والامتصاصية المولارية وحدود الكشف والتقدير الكمي في تقدير هيدروكلوريد الثيامين

Compound	Linearity range (µg. ml ⁻¹)	Molar Absorptivity (l. mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	LOD* (µg. ml ⁻¹)	LOQ* (µg. ml ⁻¹)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R ²)
Thiamine hydrochloride	0.2 – 18	26410.59	0.229	0.766	0.0783	0.0358	0.9951

*Average of ten determinations

دقة الطريقة وتوافقها

تم حساب الدقة والتوافقية من خلال احتساب Recovery و RSD بأستخدام خمس قراءات لثلاثة تراكيز مختلفة، بلغ Recovery 100.93% و RSD أقل من 2.0% لمركب الثيامين.

الجدول (9) دقة الطريقة وتوافقها

Compound	Amount added (µg. ml ⁻¹)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
Thiamine hydrochloride	1	102.00	100.93	1.91
	4	99.60		0.98
	8	101.20		1.23

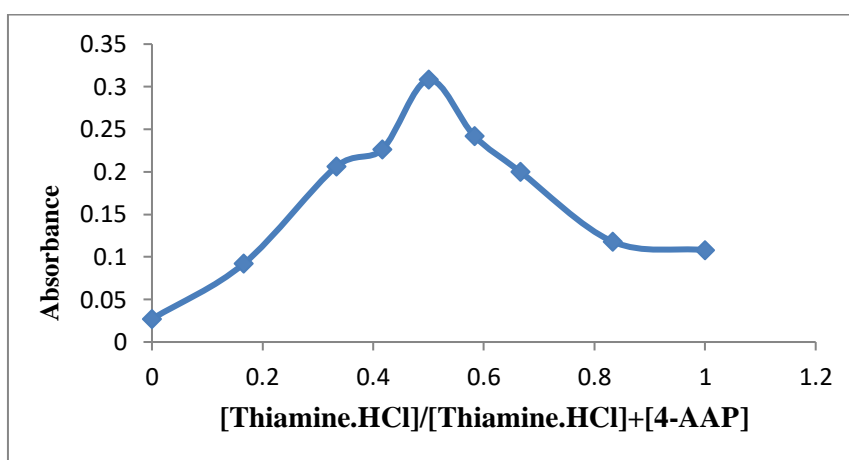
*Average of Five Determinations.

تأثير طبيعة المعقد وثابت استقراره

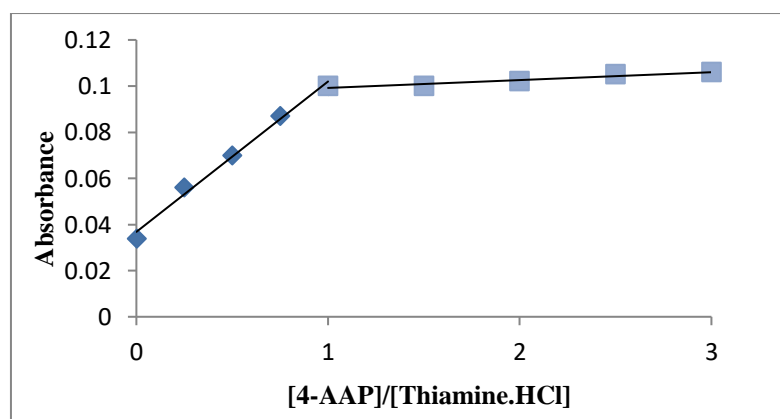
اتبعت "طريقة التغير المستمر" Job's Method⁽¹⁷⁾ و "النسب المولية Mole Ratio"⁽¹⁸⁾ لمعرفة النسب التركيبي لنتاج 4-AAP مع الثيامين باستخدام محاليل مخففة من الكاشف والمركب المدروس وبتركيز 10×10^{-3} مولاري. النتائج الموضحة في الشكل (4) والشكل (5) تؤكد ان الناتج يتكون بنسبة 1:1 (الثيامين : 4-AAP) لكلا الطريقتين. وتم احتساب ثابت استقرار الناتج المتكونة بنسبة 1:1 وبشكل منفصل بتطبيق القانون الاتي:

$$K_{st} = \frac{1-\alpha}{\alpha^2 C}$$

حيث C هي تركيز المعقد بوحدة (مول/ لتر)، و α هي درجة التفكك و K_{st} ثابت الاستقرار، بلغ معدل ثابت الاستقرار للمعقد المتكون 10×3.39 لتر/ مول مما يدل على الاستقرار العالي للناتج، كما هو موضح في الجدول (10).



الشكل (4) رسم التغيرات المستمرة لمعقد الثيامين مع 4-امينوانتي بايرين



الشكل (5) رسم النسب المولية لمعقد الثيامين مع 4-امينوانتي بايرين

الجدول (10) ثابت استقرار المعقد مع الكاشف 4-امينوانتي بايرين

Compound	Conc. (mol. l ⁻¹)	Absorbance		α	Average K _{st} (l. mol ⁻¹)
		As	Am		
Thiamine hydrochloride	2×10 ⁻⁶	0.053	0.086	0.384	3.39×10 ⁶
	4×10 ⁻⁶	0.160	0.198	0.192	
	6×10 ⁻⁶	0.192	0.247	0.223	

دراسة المتداخلات

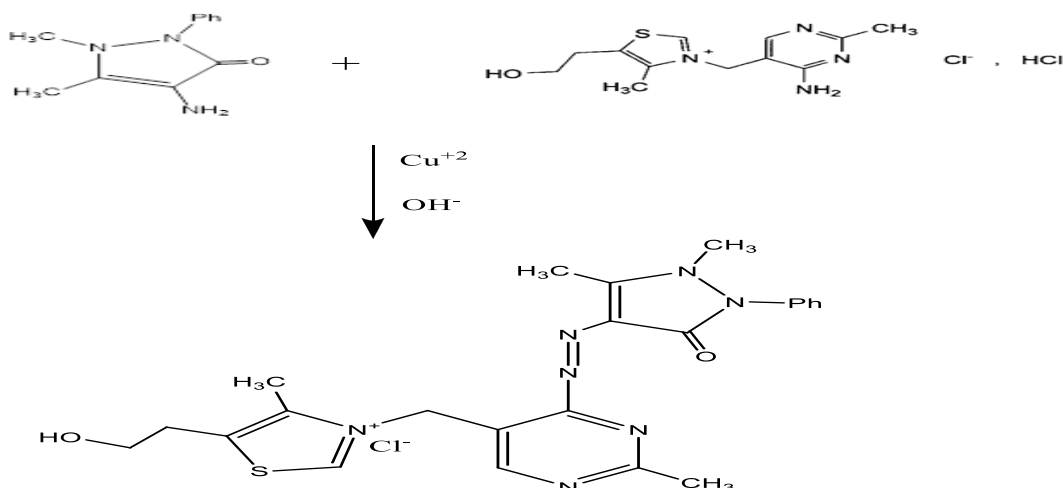
درس عدد من المتداخلات والمتوقع تواجدها في المستحضرات الصيدلانية والمتمثلة بـ (Glucose, Lactose, Sucrose,) في امتصاص (4 مايكروغرام/ مللتر) من الثيامين، فقد اضيفت كميات مختلفة من المتداخلات الى المحاليل وقيس الامتصاص تحت الظروف المثلى عند 335 نانوميتر. تشير النتائج ادناه الى انتقائية الطريقة لعدم وجود تداخل من قبل المواد السواغ المضافة.

الجدول (11) تأثير المتداخلات

Foreign compound	Recovery (%) of 4 µg/ ml of Thiamine . HCl per µg/ ml Foreign added			
	100	500	750	1000
Glucose	101.9	99.0	101.0	98.6
Lactose	96.0	96.9	101.4	101.5
Sucrose	101.0	102.0	104.1	101.2
Starch	95.6	97.8	101.3	103.0
Talc	96.5	102.2	104.0	99.9
Mg-stearate	99.4	103.1	98.7	102.0

التفاعل الكيميائي المقترح

لوحظ من خلال التركيب الكيميائي لهيدروكلوريد الثيامين احتوائه على مجموعة الامين الاروماتية ومن خلال دراسة طبيعة الناتج المتكون بطريقتي جوب والنسبة المولية اثبتت النتيجة بان الارتباط يكون بنسبة 1:1 بوجود العامل المؤكسد في الوسط القاعدي كما هو موضح في الميكانيكية المقترحة ادناه.



تحليل اقراص المستحضر الصيدلاني

تم وزن خمسة اقراص من المستحضر الدوائي (Neurorubine) ثم طحنت ومزجت بشكل جيد ومن ثم وزن من المسحوق مايكافىء قرص واحد (200 ملغم)، ثم اذيبت في كمية قليلة من الماء المقطر، بعدها رشح المحلول وأكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر. وحضر منه محلول بتركيز 100 جزء لكل مليون ثم اخذ حجوم مختلفة منه للحصول على تراكيز (1.0 و 4.0 و 8.0) مايكروغرام/ مللتر، تم ايجاد التركيز باستخدام المنحنى القياسي للثيامين بصورته النقية وادرجت النتائج في الجدول ادناه، اذ تبين ان الطريقة المتبعة ذات دقة عالية ومتفقة على نحو جيد مع المحتوى الاصيل للثيامين في المستحضر الصيدلاني.

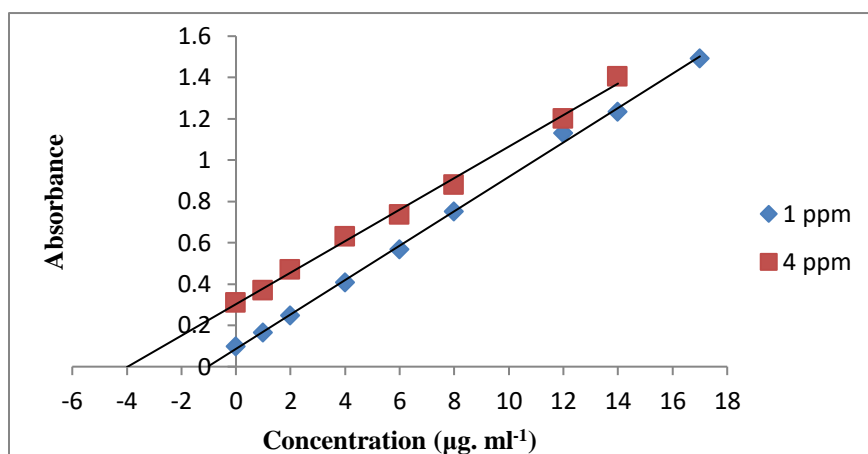
الجدول (12) تقدير الثيامين في المستحضر الصيدلاني

Pharmaceutical preparation	Certified value	Amount present (ppm)	Drug content found*	Recovery* (%)	Average recovery (%)
Neurorubine Tablets Switzerland	200 mg	1	199.02	99.51	100.56
		4	203.28	101.64	
		8	201.08	100.54	

*Average of five determinations

تقييم نتائج الطريقة المقترحة مع طريقة الاضافة القياسية

لاثبات كفاءة الطريقة المقترحة ونجاحها في التقدير وخلوها من تأثير تداخلات الاضافات، طبقت طريقة الاضافة القياسية على النموذج الدوائي للثيامين لعدم توفر مستلزمات الطريقة القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني⁽¹⁹⁾ لتقدير الثيامين هيدروكلوريد، اذ يمكن الاستدلال من النتائج المبينة في الشكل (6) و الجدول (13) ان الطريقة المستحصلة متفقة مع الطريقة المقترحة مما يدل على أن الطريقة ذات انتقائية جيدة.



الشكل (6) منحني الاضافة القياسية لتقدير مستحضر الثيامين في الاقراص السويسرية من شركة (Acino Pharma)

الجدول (13) مقارنة دقة الطريقة المقترحة لتقدير المركب الدوائي في المستحضر الصيدلاني مع طريقة الاضافة القياسية

Pharmaceutical preparation	Certified value (mg)	Amount present (ppm)	Drug content found (mg)		Recovery (%) of standard addition procedure
			Present method*	Standard addition procedure	
Neurorubine Tablets Switzerland – Acino Pharma	200	1	199.02	199.79	100.38
		4	203.28	202.50	99.61

*Average of five determinations

الاستنتاج

طورت طريقة طيفية لتقدير الثيامين في المحلول المائي مع 4-امينوانتي بايرين وكبريتات النحاس المائية كعامل مؤكسد في الوسط القاعدي اعتماداً على تفاعل الاقتران التأكسدي وقياس الناتج عند طول موجي 335 نانوميتر، امكن تقدير كميات متناهية في الصغر (0.2- 18) مايكروغرام/ ملتر وبامتصاصية مولارية 26410.59 لتر/ مول. سم وبدقة جيدة، بلغت كمية الاسترجاعية 100.93% والتوافقية افضل من 2.0%، علماً أن التفاعل يحتاج الى 25 دقيقة للحصول على اعلى حساسية وفي درجة حرارة 30°م وقد امكن تطبيق الطريقة بنجاح على المستحضر الصيدلاني (Neurorubine). كما وجد من خلال دراسة طبيعة المعقد ان المعقد يتكون بنسبة 1:1، وتميزت الطريقة المطورة بالحساسية والسهولة وعدم الحاجة الى استخلاص مسبق.

1. References

2. M. E. Webb, A. Marquet, R. R. Mendel, F Rebeille and A. G. Smith, “Elucidating biosynthetic pathways for vitamins and cofactors”. *Nat. Prod. Rep.*24(5): 988-1008, (2007).
3. S. S Barbara, *Journal of Analytical Chemistry*, 68,218-222, (2013).
4. H. M. A. Al-Guhashi, M.Sc. Thesis, Mosul University, (2019).
5. H. S. Al-Ward and S. Z. Hussein, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(10), 3995-03, (2016).
6. S.T. Abdel Rahman, A. A. Elbashir, M. El-Mukhtar and M. M. Ibrahim, *Bio analytical Techniques*, 2, 1-6, (2015).
7. N. H. Shekho, B. A. Abed Al-Hadi and L. A. Sarsam, *Rafidain Journal of Sciences*, 24, 60-73, (2013).
8. A. B. M. Al-Khalily, M.Sc. Thesis, University of Karbala, (2010).
9. N. R. Ahmad and F. K. Omar, *Baghdad Science Journal*, 16(4), 898-902, (2019).
10. S.T. Abdel Rahman, A. A. Elbashir, M. El-Mukhtar and M. M. Ibrahim, *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research*, 2, 1-6, (2016).
11. B. A. Abed Al-Hadi, *Tikrit Journal of Pure Science* 24, (1), 74-81, (2019).
12. N. R. Ahmad and W. A. Al-Qazzaz, *Rafidain Journal of Sciences*, 28(2), 146-151, (2019).
13. H. Soni, A. K Singhai, K. Mishra and S. Sharma, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3, 2163-2167, (2012).
14. M. L. Marszałł, A. Lebidzińska, W. Czarnowski and P. Szeferb, *J Chromatogr A*, 1094(1–2), 91-98, (2005).
15. S. Antakli, N. Sarkees and T. Sarraf, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(6), 219-224, (2015).
16. J. Tan, R. Li and Z. T. Jiang, *Analytical Methods*, 3,1568-1573, (2011).

17. I. G. David, M. A. Florea, O. G. Cracea, D. E. Popa, M. Buleandra and E. E. Iorgulescu et al, Chemical Papers. 69(7), 901-910, (2015).
18. H. H. Willard, L. M. Merrit and J. A. Dean, "Instrumental methods of analysis", 5th ed., D. van Nostr and company NewYork, 121 (1974).
19. L. G. Hargis, "Anaytical Chemistry" Prentice-Hall.Inc., New Jersey, 424-427 (1988).
20. British Pharmacopoeia 2013. London, Stationery Office, 7th Edition.