٢٤٧٣٥

۱۳۸۰ /۹/ ۳۰

دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکتری

عنوان:

ارائه یک روش اسپکتروسکوپی مناسب برای اندازه گیری ویتامین ث وکاربرد آن در فرآورده های دارویی

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر محمدرضا اویسی

اساتید همکار:

خانم دکتر منان حاجی محمودی

آقای دکتر عبدالعظیم بهفر

013736

۳۷۷۵

نگارنده:

طاهره بابائی

سال تحصیلی: ۱۳۸۰-۱۳۷۹

شماره پایان نامه: ۴۲۱۵

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که هر موفقیتی در زندگی به دست آورده‌ام

در سایه وجود آنهاست

وبرادرانم رضا و مسعود

وتنها خواهرم وهمسر وفرزندانش

تقدیم به :

استاد ارجمند آقای دکتر اویسی که بدون راهنماییهای ایشان انجام

این پایان نامه برای من ممکن نبود.

اساتید گرانقدر خانم دکتر حاجی محمودی و آقای دکتر بهفر که

در تمامی مراحل پایان نامه مشوق من بودند.

و با تشکر از آقای دکتر جنت که زحمت بخشهای آماری پایان نامه راتقبل کردند.

خلاصه

ویتامین ث، جزء ویتامینهای ضروری می‌باشد که بدلیل خاصیت احیا کنندگی در بسیاری از واکنشهای بیوشیمیایی بدن شرکت می‌کند. این ویتامین در تشکیل بافت همبند و فعال سازی ویتامین E نقش دارد. همچنین بدن را در برابر بعضی بیماریها مثل سرطان، بیماریهای قلبی و ... محافظت می‌کند.

اگر چه روشهای زیادی برای اندازه‌گیری ویتامین ث مطرح شده است، اما تحقیقات بیشتری باید در این زمینه صورت گیرد زیرا هنوز یک روش مناسب حساس و اختصاصی که در عین حال سریع و آسان هم باشد بدست نیامده است. بعضی از روشهای مطرح شده از حساسیت کافی برخوردار نیستند و یا اختصاصی نمی‌باشند و در سایر روشها، زمان لازم برای اندازه‌گیری طولانی است بطوریکه باعث تخریب ویتامین ث در طی مراحل آنالیز می‌شوند.

در این مطالعه برای اندازه‌گیری ویتامین ث، یک روش اسپکتروفتومتری کینتیکی ساده استفاده شده است که علاوه بر مزایای روشهای اسپکتروفتومتری دیگر، زمان انجام واکنش نیز در آن کوتاه است. اساس کار بر پایه احیا شدن معرف رنگی تولوئیدین بلو توسط ویتامین ث می‌باشد.

این روش برای اندازه‌گیری ویتامین ث در فراورده‌های دارویی کاربرد دارد و نتایج حاصل از آن با نتایج یک روش دقیق دیگر *(HPLC)* نیز قابل مقایسه است.

در این مطالعه کالیبراسیون در محدوده غلظت $\mu g/ml$ ۳۵-۵ انجام گرفت و *RSD* روش بین ۵/۵-۳ بود.

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول - ویتامین ث

۱-۱- تاریخچه ۲

۱-۲- نامهای مختلف ویتامین ث ۲

۱-۳- ساختمان شیمیایی ویتامین ث ۲

۱-۴- خواص فیزیکوشیمیایی ۴

۱-۵- پایداری ۵

۱-۶- فعالیت بیولوژیکی ۸

۱-۷- غلظت پلاسمایی ویتامین ث ۹

۱-۸- میزان مورد نیاز ویتامین ث در افراد مختلف ۹

۱-۸-۱- میزان مورد نیاز در انسان ۹

۱-۸-۲- میزان مورد نیاز در دوران حاملگی ۱۰

۱-۸-۳- میزان مورد نیاز در دوران شیردهی ۱۰

۱-۸-۴- میزان مورد نیاز در نوزادان ۱۰

۱-۸-۵- میزان مورد نیاز در افراد مسن ۱۰

۱-۸-۶- میزان مورد نیاز در افراد خاص ۱۱

۱-۸-۷- مصرف مقادیر بیشتر ویتامین ث ۱۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۹-کمبود ویتامین ث ۱۳

۱-۹-۱-علایم کمبود ۱۴

۱-۹-۱-الف) علایم کمبود در کودکان ۱۵

۱-۹-۱-ب) کمبود در دوران جنینی ۱۵

۱-۹-۲-شیوع ۱۶

۱-۱۰-سمیت ۱۶

۱-۱۱-فارماکوکینتیک ۱۸

۱-۱۱-۱-جذب ۱۸

۱-۱۱-۲-توزیع و انتقال ۱۸

۱-۱۱-۳-متابولیسم و دفع ۲۰

۱-۱۱-۴-هموستاز ۲۰

۱-۱۱-۵-نیمه عمر ۲۱

۱-۱۱-۶-بیوسنتز ۲۱

۱-۱۲-اعمال بیوشیمیایی ۲۳

۱-۱۲-۱-دخالت در تشکیل کلاژن و بافت همبند ۲۴

۱-۱۲-۲-اعمال آنتی اکسیدانی ۲۴

۱-۱۲-۲-۱-حفاظت غیر مستقیم آنتی اکسیدانی ۲۵

۱-۱۲-۳-سنتز نوروترنسمیترها و اثر بر سیستم عصبی ۲۶

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۱-۱۲-۴- فعالیت سیستم *(MFO) Mixed Function Oxygenase* ۲۷

۱-۱۲-۵- اثر بر جذب و متابولیسم آهن ۲۷

۱-۱۲-۶- اثر بر روی بیوسنتز کارنی‌تین ۲۸

۱-۱۲-۷- اثر برفعالیت *cGMP, cAMP* ۲۸

۱-۱۲-۸- اثرات آنتی هیستامینی ویتامین ث ۲۹

۱-۱۲-۹- اعمال دیگر ویتامین ث ۲۹

۱-۱۳- جنبه‌های کلینیکی و درمانی ۲۹

۱-۱۳-۱- تقویت سیستم ایمنی ۳۰

۱-۱۳-۱-۱- ویتامین ث و سرماخوردگی ۳۱

۱-۱۳-۱-۲- اثر بر تب و عفونت ۳۱

۱-۱۳-۱-۳- نقش ویتامین ث در ایدز ۳۲

۱-۱۳-۲- ویتامین ث و سرطان ۳۲

۱-۱۳-۳- اثر بر بیماریهای قلبی - عروقی ۳۳

۱-۱۳-۳-۱- اثر بر چربیهای خون و آترواسکلروزیس ۳۴

۱-۱۳-۴- نقش ویتامین ث در بیماریهای تنفسی ۳۵

۱-۱۳-۵- اثر بر کاتاراکت ۳۵

۱-۱۳-۶- نقش ویتامین ث در استرس ۳۶

۱-۱۳-۷- نقش ویتامین ث در بهبود زخمها ۳۶

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۱۳-۸-اثر بر باروری ۳۶

۱-۱۳-۹- پیشگیری از آنمی مگالوبلاستی ۳۷

۱-۱۳-۱۰-اثر بر دیابت ۳۷

۱-۱۳-۱۱-اثر بر مت هموگلوبینمی ۳۷

۱-۱۴-کاربردهای دیگر ویتامین ث ۳۸

۱-۱۵- تداخلات دارویی ۳۸

۱-۱۶-اثر بر تستهای آزمایشگاهی ۳۹

۱-۱۷-اشکال تجاری موجود در بازار دارویی ایران ۳۹

۱-۱۸-اندازه‌گیری ویتامین ث ۴۰

۱-۱۸-۱- راههای تعیین وضعیت ویتامین ث در بدن ۴۰

۱-۱۸-۲- روشهای استخراج ۴۱

۱-۱۸-۳- روشهای اندازه‌گیری ویتامین ث ۴۲

۱-۱۸-۳-۱- روشهای اسپکتروسکوپی یا طیف سنجی ۴۳

۱-۱۸-۳-۲- روشهای آنزیمی ۴۹

۱-۱۸-۳-۳- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا *(HPLC)* ۴۹

۱-۱۸-۳-۴-الکتروفورز موئینه ۵۲

۱-۸-۳-۵- روشهای الکترومتریک ۵۲

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل دوم - طیف سنجی *UV* - مرئی

۲-۱- اصول طیف سنجی ۵۵

۲-۲- دستگاه اسپکترومتر ۵۷

۲-۳- کاربردهای اسپکترومتری *UV*-مرئی ۶۱

فصل سوم - کینتیک

۳-۱- کلیات ۶۸

۳-۲- روشهای بررسی کینتیک واکنشها ۷۱

۳-۳- بررسی کینتیک واکنش آسکوربیک اسید بامتیلن بلو ۷۵

فصل چهارم - بخش عملی

۴-۱- روش کینتیکی اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری ویتامین ث ۸۰

۴-۱-۱- عوامل مؤثر در اندازه‌گیری ۸۲

۴-۱-۲- شرایط نگهداری نمونه‌ها ۸۴

۴-۱-۳- دستگاههای مورد استفاده ۸۵

۴-۱-۴- مواد مورد استفاده ۸۵

۴-۱-۵- محلولهای مورد نیاز ۸۵

۴-۱-۶- روش کار ۸۶

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۴-۱-۷- تهیه محلولهای استاندارد ۸۷

۴-۱-۸- کالیبراسیون ۸۹

۴-۱-۹- بررسی تداخلات ۹۲

۴-۱-۱۰- بررسی تکرار پذیری روش ۹۶

۴-۱-۱۱- نمونه‌های مورد بررسی ۹۷

۴-۱-۱۲- آماده‌سازی نمونه‌ها ۹۷

۴-۱-۱۳- اندازه‌گیری ویتامین ث در نمونه‌ها ۹۸

۴-۲- روش کروماتوگرافی مایع *(HPLC)* ۹۹

۴-۳- مقایسه نتایج حاصل از روش اسپکتروفتومتری و *HPLC* ۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری ۱۰۱

منابع ۱۰۳

فصل اول
مقدمه

۱-۱- تاریخچه

ویتامین ث، ویتامین ضد اسکوروی می‌باشد. با وجود اینکه اسکوروی در طول جنگهای صلیبی کشف شد، ارتباط بین‌اسکوروی‌و ویتامین ث تا قرن بیستم به اثبات نرسید.

بیماری اسکوروی در بین کاشفین دریایی در قرون ۱۶ تا ۱۸ میلادی متداول بوده است.

در سال ۱۷۴۷، *James Lind* نقش مرکبات را در درمان اسکوروی ثابت کرد.

در سال ۱۹۰۷، این بیماری به طور آزمایشگاهی در خوکچه‌های هندی القا شد.

در سالهای ۳۰-۱۹۲۸ این ماده، به طور جداگانه توسط *Szent-Gyorgy* و *Glen King* جدا سازی شد و هگزورونیک اسید *(Hexuronic acid)* نامیده شد. این ماده بعداً به خاطرداشتن خاصیت ضد اسکوربوتی، آسکوربیک اسید نامیده شد و ساختار مولکولی آن تعیین گردید. ویتامین ث در سال ۱۹۳۳ به طور آزمایشگاهی سنتز گردید (۲،۳، ۱)

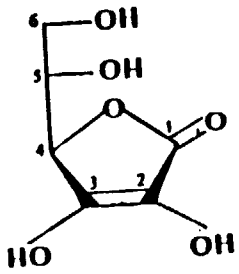
۱-۲- نامهای مختلف ویتامین ث

نام شیمیایی ویتامین ث، ۲ و ۳-دی دهیدرو -ال ترئو -هگزانو-۱ و ۴-لاکتون یا ۲-اکسو -ال -ترئو -هگزونو -۱ و ۴-لاکتون -۲ و ۳-اندیول می‌باشد.

سایر اسامی آن شامل هگزورونیک اسید، سویتامیک اسید، *L* - گزیلو آسکوربیک اسید، آنتی اکسوربوتین، آسکوربیک اسید و اسکوربوتامین می‌باشد. (۲،۳)

۱-۳- ساختمان شیمیایی ویتامین ث

فرمول بسته ویتامین ث $C_6H_8O_6$ می‌باشد. این ترکیب فرم انولی α - کتولاکتون است. ساختار مولکولی آن در شکل (۱-۱) آمده است که شامل دو اتم هیدروژن انولی قابل یونیزه شدن است که به ترکیب، خاصیت اسیدی می‌دهد.

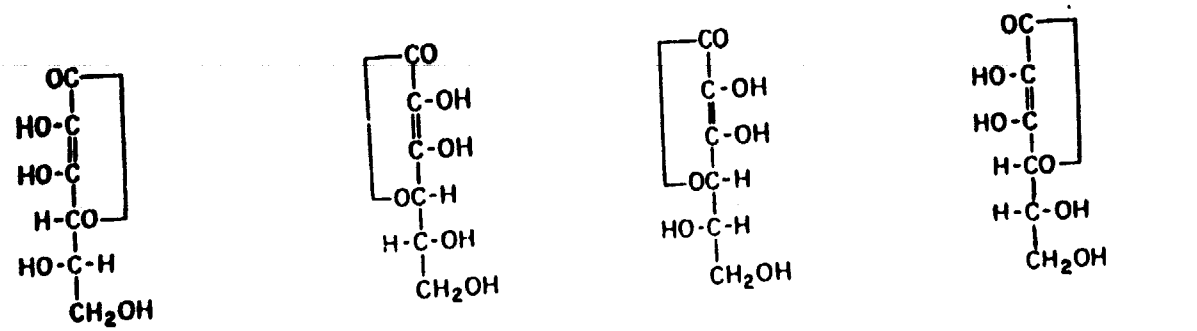


شکل (۱-۱) ساختمان L - اسید اسکوربیک

کربنهای ناقرینه شماره ۴ و ۵، چهار فرم ایزومر فضایی ایجاد می‌کنند که دی و ال آسکوربیک اسید و دی و ال آرابوآسکوربیک اسید نامیده می‌شوند.

ساختمان فرمهای مختلف ویتامین ث در شکل (۲-۱) آمده است.

دی آرابوآسکوربیک اسید را به نام دی - ایزوآسکوربیک اسید یا اریتوربیک اسید *(Erythorbic acid)* هم می‌شناسند (۳، ۲)



شکل (۲-۱) ایزومرهای فضایی آسکوربیک اسید

۱-۴- خواص فیزیکوشیمیایی

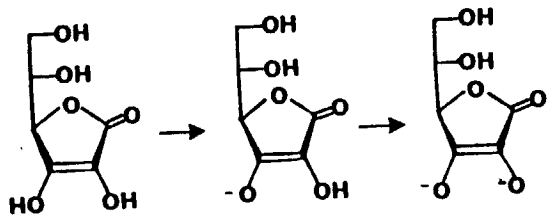
ویتامین ث، به صورت کریستال سفید مایل به زرد می‌باشد. وزن مولکولی آن ۱۷۶/۱۳ گرم است.

نقطه ذوب آن ۱۹۲-۱۹۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

حلالیت آن در آب بالاست (۳۰گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر). در الکل به میزان کم حل می‌شود و در حلال‌های آلی نامحلول است. نمکهای آن، حلالیت بیشتری در آب دارند. استرهای اسید چرب آن، مثل آسکوربیل پالمیتات، در چربی محلول می‌باشند.

ویتامین ث دارای فعالیت نوری است. چرخش نوری آن در آب به میزان $[\alpha] = +۲۳^{\circ}$ و در متانول به میزان $[\alpha] = +۴۸^{\circ}$ است.

ویتامین ث دارای Pka_1 برابر با ۴/۱۸ و PKa_2 برابر با ۱۱/۵۷ می‌باشد. این ویتامین در محیط قلیایی در دو مرحله یونیزه می‌شود. اولین یونیزاسیون مولکول در هیدروکسیل ناحیه ۳ دیده می‌شود که تولید منوآنیون آسکوربیک اسید می‌کند. و تحت شرایط بازی بیشتر، هیدروکسیل ناحیه ۲ نیز یونیزه می‌شود و دی آنیون آسکوربیک اسید ایجاد می‌شود. (شکل ۳-۱)



شکل (۳-۱) یونیزاسیون آسکوربیک اسید در محیط قلیایی