หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การวิเคราะห์หาปริมาณของไวตามินบี 2 หรือที่เรียกว่า "ไรโบฟลาวิน" สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Microbiological, Fluorometric และ Spectrophotometric Methods [1] ในระยะแรก ๆ วิธีวิเคราะห์เหล่านี้ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อนเพราะใช้สำหรับหาปริมาณไวตามินบี 2 ในอาหาร แต่เมื่อ Compressed Tablets ของไวตามินบี 2 เข้าอยู่ในเภสัชตำรับ จึงต้องหาวิธีที่ง่ายและรวดเร็วกว่าเดิมมาใช้ ใน U.S.P. XII จึงมี Colorimetric Method เพิ่มขึ้นแต่ก็ยังให้ผลไม่ดีนัก [1] ต่อมา Microbiological, fluorometric, animal assay methods (rat and chicken) ได้มีการปรับปรุงให้ดีขึ้น [2-6] ในที่สุด rat assay method ใช้เป็นมาตรฐานเริ่มต้น (original standard) สำหรับวิธีอื่น แต่อย่างไรก็ดี วิธีเหล่านี้จะใช้เวลานานหลาย ๆ สัปดาห์ จึงมีการศึกษาเปรียบเทียบเกี่ยวกับ fluorometric, microbiological and rat growth methods โดยใช้หาปริมาณของไวตามินบี 2 ในยาเตรียมต่าง ๆ [7] ปรากฏว่า fluorometric method ซึ่งเป็นวิธีที่กำหนดไว้ใน U.S.P. สามารถหาปริมาณไวตามินบี 2 ได้กว้างขวาง และมีความไว (sensitive) มาก สำหรับ lumiflavine method ซึ่งเป็นวิธีเฉพาะสำหรับหาปริมาณไวตามินบี 2 ทางเคมีฟิสิกส์ จะมีข้อดีตรงที่ว่าแม้จะมีสารเรืองแสงตัวอื่นหรือมีสารสีเหลืองก็ไม่รบกวนการวิเคราะห์

Spectrophotometric Method ใช้วัดสีเหลืองของไวตามินบี 2 ซึ่งเหมาะสำหรับยาเตรียมง่าย ๆ ที่ปราศจากสารรบกวน เพราะในยาเตรียมที่มีตัวยาหลายอย่าง ตัวยาอื่นอาจทำให้มีแสงเรืองสีเหลืองเขียวเพิ่มขึ้น หรืออาจจะดูดซึมสีเหลืองเมื่อใช้วัดด้วย spectrophotometer ดังนั้นจึงจำเป็นต้องขจัดสารรบกวนออกก่อน เช่นการวิเคราะห์ต่อไปนี้ Periodate Oxidation ของไวตามินบี 2 แล้วหาปริมาณของ formaldehyde โดยใช้ chromotropic acid วิธีนี้ถ้าใช้กับ multivitamin

preparations จะไม่ได้ผล เพราะสารประกอบที่มีกลุ่ม $CH-(OH)-CH_2-OH$ จะรบกวนการวิเคราะห์ [8]

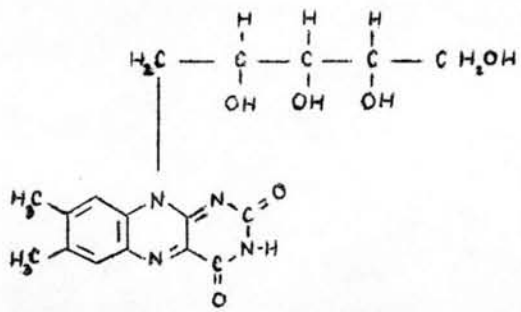
Spectrophotometric [9-11] หรือ Colorimetric Method ที่ใช้หลักว่าสีของไวตามินบี 2 ที่ทำปฏิกิริยากับ cupric chloride - triphenylphosphine complex จะมีลักษณะเฉพาะตัวและใช้วัดได้เมื่อมีสารรบกวนอยู่ด้วย

Microbiological Method [13,14] มีข้อเสียตรงใช้เวลานาน

Polarographic Method [1,15-17] ง่ายมากและเชื่อถือได้ วิธีนี้จะมีประโยชน์ในการวิเคราะห์หาปริมาณไวตามินบี 2 ในยาผสม เนื่องจากการเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์มีขั้นตอนต่าง ๆ น้อยกว่า Fluorometric Method จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะเลือกมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไวตามินบี 2 ในยาเตรียมชนิดต่าง ๆ [15]

<u>ไรโบฟลาวิน</u> (Riboflavin)

<u>ชื่ออื่น ๆ</u> : ไวตามินบี 2 ไวตามิน G แลคโตฟลาวิน (Lactoflavin) โอโวฟลาวิน (Ovoflavin) มีสูตรโครงสร้างดังนี้ :-



$C_{17}H_{20}O_6N_4$ = 376.37

<u>ชื่อทางเคมี</u> 6,7 - dimethyl - 9 - (D - 1 - ribityl) isoalloxazine

ไรโบฟลาวิน เป็นที่รู้จักกันตั้งแต่ปี 1879 โดยพบจากนม มีลักษณะเป็นสีเรืองแสงเหลืองเขียว [18] ที่ละลายน้ำได้ จึงให้ชื่อว่า lactochrome ในปี 1925 Kallman จึงสามารถแยกสีนี้ออกมาได้ ปี 1932 Warburg และ Christian

สังเกตเห็นว่าสีนี้มีอยู่ใน enzyme สีเหลือง (yellow enzyme) ซึ่งทำหน้าที่ส่งออกซิเจนไปยัง substrate

ลักษณะของไวตามินบี 2 จะเป็นผงผลึก (crystalline powder) มีสีเหลืองหรือสีส้มเหลือง [19] มีกลิ่นและรสขมเล็กน้อย จะเรืองแสง มีอยู่ในอาหารทั่วไป เช่น นม เนยแข็ง ผักขม แครอท ข้าวงอก (wheat germ) ไข่แดง พบใน yeast ไต ตับ และทั่วไปในที่มีไวตามินบี 1 (แต่ในไข่ขาวจะมีไวตามินบี 2 ไม่มีบี 1) มักพบเป็นองค์ประกอบ (components) ของกลุ่มไวตามินบี [18,20]

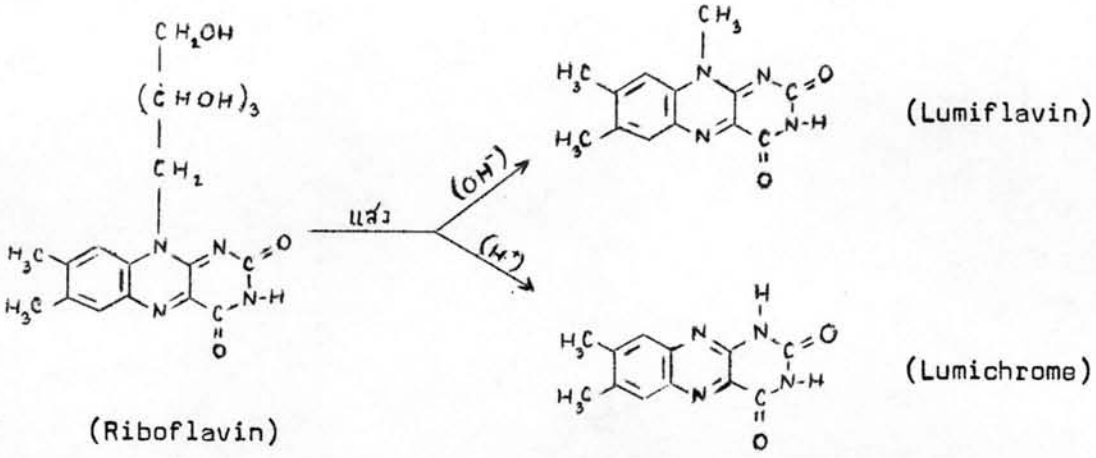
<u>คุณสมบัติทางฟิสิกส์</u>

<u>การละลาย</u> ไวตามินบี 2 ละลายน้ำได้น้อย (12 มิลลิกรัม ใน 100 มิลลิลิตร ที่ 27.5° ซ. และ 260 มก. ใน 100 มล. ที่ 100° ซ.) มันจะละลายใน isotonic sodium chloride หรือในด่างได้ดีกว่าน้ำ และละลายได้น้อยในแอลกอฮอล (4.5 มก. ใน 100 มล. ethanol ที่ 27.5° ซ.) ไรโบฟลาวินจะไม่ละลายใน lipid solvents ส่วนมาก เช่น ether, acetone, benzene และ chloroform แต่จะละลายใน formaldehyde solution, formic acid, N - methylacetamide และในด่าง เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายที่เป็นน้ำจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว ซึ่งจะหายไปเมื่อเติมกรดหรือด่าง ไรโบฟลาวินจะไม่มี optical activity ในสารละลายที่เป็นกลางหรือเป็นกรด แต่จะ optically active ในด่าง มันเป็นสาร amphoteric ที่มีค่า $K_a = 6.3 \times 10^{-12}$ และ $K_b = 0.5 \times 10^{-5}$ isoelectric point อยู่ที่ pH 6 ผลึกไรโบฟลาวินจะอยู่ตัวเมื่ออยู่ในที่มืด

<u>จุดหลอมเหลว</u> ถ้าเป็นเกลือ tetra-acetate จะหลอมตัวที่ 242° - 244° ซ. และ tetra-benzoate หลอมที่ 131° - 136° ซ. ส่วนไวตามินบี 2 จะหลอมตัวที่ 280° ซ. พร้อมทั้งสลายตัวด้วย มันจะทนต่อความร้อนได้ดีพอใช้ การทำเป็นอาหารกระป๋องจะทำลายไวตามินบี 2 ประมาณ 5 - 20 % การต้มจะไม่ทำลายไวตามิน แต่การย่างหรือทอดจะทำให้มันสลายตัว [18,20,21]

<u>คุณสมบัติทางเคมี</u>

ไรโบฟลาวินที่เป็นผงแห้งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกแสง [21] (diffused light) แต่ถ้าอยู่ในสารละลาย แสงจะช่วยให้เกิดการสูญเสียโดยเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าอยู่ในด่าง ถ้าน้ำยาอิ่มตัว จะเป็นกลางต่อลิทมัส ไวตามินบี 2 จะละลายได้ดีมากในด่าง แต่จะไม่ทนต่อความร้อนและแสง ในปี 1933 Kuhn และผู้ร่วมงานของเขาพบว่า ออกซิเจนที่มีอยู่ใน side chain ของไวตามินบี 2 จะถูกขจัดออกเมื่อถูกแสงและอยู่ในสารละลายด่างเกิดเป็น isoalloxazine ที่เรียกว่า lumiflavin [18] ซึ่งไม่มี biological activity [21] ถ้าอยู่ในสารละลายที่เป็นกลางหรือเป็นกรดและถูกแสงจะได้เป็น lumichrome [18], 6,7 - dimethylalloxazine ซึ่งก็เป็น biologically inactive ในสารละลายกรด บี 2 จะทนต่อความร้อนโดยเฉพาะ pH 1.0 - 6.5



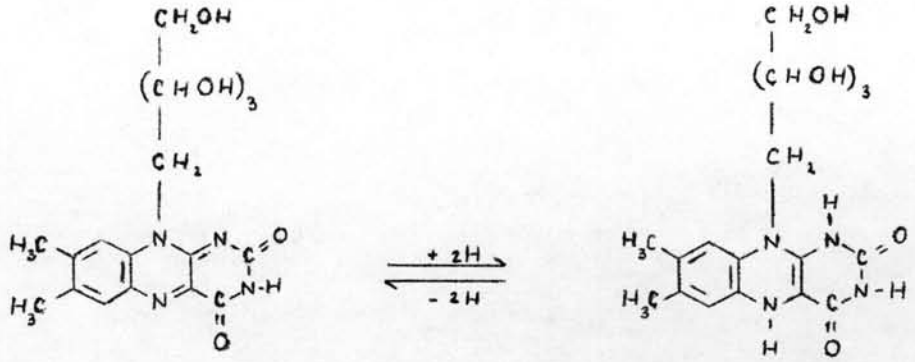
Hydroxyl ตรงปลายของ ribityl chain ของไรโบฟลาวินจะทำปฏิกิริยากับ phosphoric acid โดยเร็ว เกิดเป็น mono-ester [22] ไวตามินบี 2 ในรูปของไรโบฟลาวิน-5 ฟอสเฟท หรือ ไรโบฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์จะทำหน้าที่เป็น coenzyme ในปฏิกิริยา oxidation-reduction ทางชีวเคมีหลายอัน [18] โดยมันจะรับไฮโดรเจนและถ่ายให้กับระบบชีวเคมี (biochemical systems) คือทำหน้าที่เป็นตัวรับส่งไฮโดรเจน เมื่อเกาะ (bound) อยู่กับ apoenzymes (certain specific

proteins) ก็จะกลายเป็น enzymes เช่น Warburg's "yellow enzyme of respiration".

Sugar side chain ต่าง ๆ กันหลายชนิดได้ถูกนำเข้ามาแทนที่ D-ribose ปรากฏว่าจะได้เป็นสารประกอบที่ inactive ทั้งนั้น ยกเว้น L-arabinose ซึ่งจะให้เป็นอนุพันธุ์ของ dimethyl isoalloxazine ที่มี moderately active

ไรโบฟลาวินจะถูกดูดซึมออกจากสารละลายกรดหรือเป็นกลางได้โดยเร็วด้วยสารบางชนิด เช่น frankonite, fuller's earth, zeolites, charcoal และ elute ออกมาได้ด้วย acetone หรือสารละลาย pyridine มีการใช้ adsorbates เหล่านี้ในยาเตรียม แต่สำหรับยาพวกไวตามินจะไม่มีประโยชน์ต่อคน เพราะยากแก่การ elute ในทางเดินลำไส้ (intestinal tract).

สารละลายของไรโบฟลาวินจะมีแสงเรืองสีเหลืองเขียวเฉพาะตัวที่มี maximum absorption ที่ 565 nm. ในย่าน pH ที่เป็นกรด [21] จากคุณสมบัตินี้จึงใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณของไรโบฟลาวิน ไวตามินบี 2 จะถูก reduced โดย hydrosulfite หรือโดยไฮโดรเจนในที่มีสังกะสีและอยู่ในสารละลายกรด มันจะเปลี่ยนไปอยู่ใน leucoform ซึ่งไม่มีสีและไม่เรืองแสง leucoriboflavin จะถูก



(Riboflavin) (Leuco-riboflavin)

oxidised กลับได้ง่าย ๆ โดยเขย่าในอากาศ และคุณสมบัติในการเกิด oxidation-reduction นี้จะเป็นรากฐานเบื้องต้นสำหรับความสำคัญในทางชีววิทยาของไรโบฟลาวินใน

respiratory enzyme systems

การหาปริมาณของไวตามินบี 2 ในตอนแรก ๆ ทำโดยวัดความเจริญเติบโตของหนู ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ทางชีววิทยา (Bioassay Method) แต่ต่อมาก็ได้เปลี่ยนมาใช้ทั้ง physicochemical และ microbiological methods

การหาปริมาณทางเคมีโดยอาศัยหลักตามกรรมวิธีของ colorimetric และ fluorimetric สำหรับการวิเคราะห์ยาเตรียม [21] สามารถทำได้โดยวัด intrinsic yellow color ของไรโบฟลาวิน Fluorometric method จะเป็นวิธีที่ไวกว่าและปราศจากสิ่งรบกวน จึงเหมาะกับการวิเคราะห์หาปริมาณไวตามินในอาหาร ซึ่งก็จะมีการสกัดไวตามินด้วยกรด การกรอง และการทำลายสี (pigment) ที่รบกวน แล้ววัด fluorescence

การทดลองที่ดีที่สุด ควรทำในแสงสลัว ๆ และใช้เครื่องแก้วสีชา (ควรกั้นไม่ให้แสงโดน flask จะช่วยลดการสูญเสียลงได้) การสกัดเอาไวตามินบี 2 ออกมาโดยทั่วไปมักทำบน water bath หรือ steam bath แต่อย่างไรก็ดี ถ้าเพิ่มอุณหภูมิอัตราการสูญเสียก็เพิ่มขึ้นด้วย วิธีต่อไปนี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณไวตามินบี 2 ในยาเตรียมได้

1. Chemical and Physicochemical Methods
   - 1.1 Colorimetric Method
   - 1.2 Spectrophotometric Method
   - 1.3 Spectrofluorometric Method
   - 1.4 Polarographic Method
2. Microbiological Method
3. Animal Assay

<u>มาตรฐานความบริสุทธิ์</u>

<u>ไรโบฟลาวิน</u>

97.0 - 102.0 % ไวตามินบี 2 ของสารที่แห้ง [23]

ไม่น้อยกว่า 98 % ไวตามินบี 2 ของสารที่แห้ง [25]

98.0 - 102.0 % ไวตามินบี 2 ของสารที่แห้ง [19]

ยาฉีดไรโบฟลาวิน	95 – 120 %	ของไวตามินบี 2 ของที่ระบุไว้บนฉลาก	[25]
	95 – 120 %	ของไวตามินบี 2 ของที่ระบุไว้บนฉลาก	[19]
ยาเม็ดไรโบฟลาวิน	95 – 120 %	ของไวตามินบี 2 ของที่ระบุไว้บนฉลาก	[24]
	95 – 115 %	ของไวตามินบี 2 ของที่ระบุไว้บนฉลาก	[25]
	95 – 115 %	ของไวตามินบี 2 ของที่ระบุไว้บนฉลาก	[19]

Colorimetric Method [24]

ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ : ยาเม็ดไรโบฟลาวิน

หลักการ

ละลายยาเม็ดไวตามินบี 2 ที่บดเป็นผงในน้ำ แล้วนำไปเทียบสีกับสารละลายมาตรฐาน ซึ่งเตรียมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน สีเขียวเหลืองของสารละลายจากยาเม็ดส่องกับแสงสีขาวต้องไม่จางกว่า 95 % reference standard และต้องไม่เข้มกว่า 120 % reference standard การเปรียบเทียบนี้ทำในหลอดแก้วที่เหมือนกัน โดยใช้ colorimeter

Colorimetric Assay with Chromotropic Acid [8]

หลักการ

ทำการ oxidise ไวตามินบี 2 ด้วย periodate เกิดเป็น formaldehyde แล้วตรวจหา formaldehyde ที่เกิดขึ้น เช่นให้ทำปฏิกิริยากับ chromotropic acid วิธีนี้เหมาะกับ B_2 Tablets, B Complex และ B_2 ที่มีขายอยู่ในท้องตลาด แต่ไม่เหมาะกับ multivitamin preparation เพราะจะมีไวตามินซี ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ periodate การใช้วิธีนี้จะต้องไม่มีสิ่งรบกวน คือ สารที่มี group $-CH(OH)CH_2OH$ อยู่ด้วย

Microbiological Method [25]

วิธีนี้ใช้ Lactobacillus casei (Lactobacillus helveticus) เป็นวิธีที่เหมาะกับการวิเคราะห์หาปริมาณของไวตามินบี 2 ในยาเตรียม

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ ไรโบฟลาวิน

หลักการ

ควรป้องกันสารละลายไม่ให้ถูกแสงเพราะแสงจะทำลายไรโบฟลาวิน และควรจะรักษาให้ pH ต่ำกว่า 7.0 เพื่อป้องกันการสูญเสียไวตามินบี 2

นำตัวอย่างมาละลายใน 0.1 N HCl โดยใช้ความร้อนช่วย และตกตะกอน protein ออกโดยปรับให้อยู่ที่ isoelectric point ของมัน กรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรองที่ไม่ดูดซึมไวตามินบี 2 สารละลายตัวอย่างที่ใสนำไปผสมกับตัวกลางที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และเพาะเชื้อลงไป หลังจากนั้นนำไป incubate แล้วนำแต่ละหลอดไป titrate ด้วยด่าง บริมาตรของด่างที่ใช้นำไปอ่านจาก standard curve ของอนุกรมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (series of standard solution) ก็จะทราบปริมาณของไวตามินบี 2 ในตัวอย่าง

Spectrophotometric Method

หลักการ

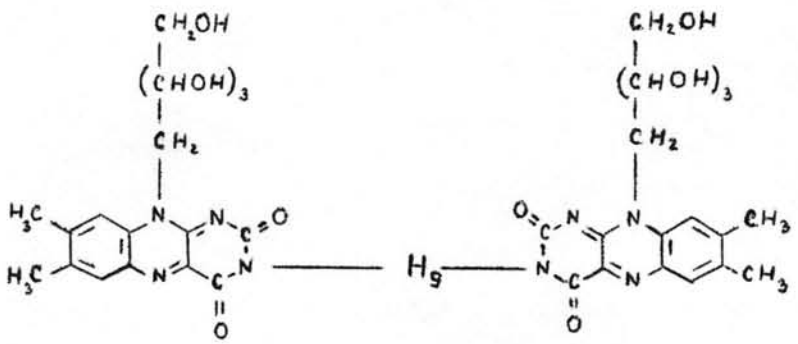
สีเหลืองตามธรรมชาติของไวตามินบี 2 ในสารละลายที่เป็นกลางหรือเป็นกรด จะดูดซึมแสงได้สูงสุดที่ 223, 267, 374, 445 nm. ค่าเฉพาะตัวที่ 445 [10] จากคุณสมบัติข้อนี้จึงนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณไวตามินบี 2 ในตัวอย่างที่ไม่มีสารสีเหลืองอื่น ๆ อยู่ พวกสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ที่เกิดจากสี (dyes) และตัวยาอื่นจะรบกวนการวิเคราะห์นี้ ดังนั้นจึงต้องแยกไวตามินบี 2 ออกมาจากไวตามินผสม อาจจะทำได้โดยการดูดซับบน purified talcum columns [9] หรือสกัดด้วยน้ำยาผสมของ methanol, pyridine, น้ำ และ glacial acetic acid (30: 10: 10: 1) [27]

วิธีนี้มีความไวน้อยเมื่อเทียบกับ fluorometry แต่ก็สามารถใช้วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชได้ เพราะโดยทั่วไปแล้วมักมีไวตามินบี 2 จำนวนสูงพอจะทำได้

นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นอีกที่ใช้ Spectrophotometry เช่นการใช้ Mercuric Sulfate, Silver Nitrate หรือ Cupric Chloride - Triphenylphosphine

Complex [12]

เนื่องจากไรโบฟลาวินเป็น imide มันจะทำปฏิกิริยากับ mercuric sulfate หรือ Silver Nitrate โดยเร็ว ในตอนแรกจะเกิดสีส้มแดงแล้วต่อมาก็เปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ ซึ่งจะ obey Beer's Law สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดกับ mercuric sulfate จะมีสูตรโครงสร้างดังนี้ :-



ไวตามินบี 2 ทำปฏิกิริยากับ cupric chloride triphenylphosphine complex ในตัวกลางที่เป็นด่าง จะมีสีส้มซึ่งดูดซึมแสงได้สูงสุดที่ 460 – 465 nm. ความเข้มข้นขนาด 1 ไมโครแกรม/มิลลิลิตร จะสามารถตรวจเอกลักษณ์ได้ ปฏิกิริยาจะ obey Beer's law และเฉพาะตัวสำหรับไรโบฟลาวิน

<u>Spectrofluorometric Method</u>

<u>หลักการ</u> [32,44,45]

วิธีนี้เหมาะกับยาเตรียมที่มีไวตามินบี 2 อยู่ในของผสมที่มีตัวยาอื่นหลายตัว ต้องให้ pH ต่ำกว่า 7 และป้องกันแสงตรง ๆ ตลอดเวลาทำการทดลอง [26]

ไรโบฟลาวิน จะให้ fluorescence สีเหลืองเขียวซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารตัวนี้ (B_2) ความเข้มข้นของ fluorescence จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของไวตามินในสารละลายที่เจือจาง ความเข้มข้นสูงสุดจะพบใน pH ระหว่าง 6 และ 7 ดำเนินการทดลองโดยวัดความแตกต่างของ fluorescence ก่อนและหลังการเติม sodium hydrosulphite

หลังจากการวัด fluorescence ทั้งหมดของสารละลายที่จะวิเคราะห์ (assay solution) ไรโบฟลาวินก็จะถูก reduced ด้วย sodium hydrosulphite ไปเป็น non-fluorescent, leuco-riboflavin วัด fluorescence ที่เหลือ แล้วนำไปหักออกจาก main fluorescence reading ค่าที่แตกต่างนี้ใช้คำนวณหาปริมาณของไรโบฟลาวินที่มีอยู่ในสารละลายที่วิเคราะห์ ขีดจำกัด (limitation) ของวิธีนี้ก็คือการใช้ sodium hydrosulphite กำจัด fluorescence sod. hydrosulphite เป็น reducing agent ที่มีอำนาจมาก มันอาจจะ reduce สารรบกวนที่มีปนมากับบี 2 ไปบางส่วน ตัวอย่างเช่น thiochrome ซึ่งเป็น oxidation product ของ thiamin ก็จะถูก reduced ไปบางส่วนโดย sod. hydrosulphite ดังนั้น fluorescence สีน้ำเงินจะถูกกำจัด

Fluorometric method มีความไวมากและเหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของไรโบฟลาวินระหว่าง 0.5 และ 5 ไมโครแกรม/มล. เป็นวิธีที่ใช้อยู่ใน U.S.P. และใช้ได้กว้างขวางมากในการหาปริมาณของบี 2 เนื่องจากยาเตรียมมีไรโบฟลาวินเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างที่ใช้จึงต้องทำให้เจือจางลง fluorometric method เป็นที่เชื่อถือได้ในเมื่อไม่มีสารเรืองแสงตัวอื่นปนอยู่ด้วย impurities จะถูก oxidised ด้วย $KMnO_4$ และ H_2O_2 การเติมสารทั้ง 2 ตัวนี้จะไม่มีผลต่อ thiamine ที่มีในสารละลายตัวอย่าง บางคนแนะนำว่าควรทำให้สารละลายที่จะวิเคราะห์นั้นบริสุทธิ์ก่อนโดย Permutit'T หรือ fuller's earth

ถ้าตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มีสารที่เป็นด่างอยู่เป็นจำนวนมาก กรดที่จะไป digestion ก็ต้องใช้ไปสำหรับ neutralization ด้วยเหตุนี้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของกรดเพื่อให้สารที่สกัดออกมาได้เป็นกรด 0.1 N ปริมาณของ sodium hydrosulphite ที่ใช้ในการ quenching แต่ละการวิเคราะห์ต้องเท่ากัน Ferric ions จะ reduce fluorescence ของไรโบฟลาวิน ดังนั้นจึงต้องขจัดออกไปโดยตกตะกอนด้วย alkali phosphate และปรับ pH ให้ได้ 6.5 โดยใช้ NaOH solution เหล็กจะถูกขจัดไปในระหว่างการทำให้ตัวอย่างวิเคราะห์บริสุทธิ์โดยผ่าน 'Permutit'T. Column

นอกจากนี้ยังมีอีกวิธีที่เป็น Spectrofluorometric Method คือ Lumiflavin

Method [28]

หลักการ

ปกติแล้วไรโบฟลาวินจะไม่ละลายใน chloroform แต่ถ้าถูกแสงและอยู่ในสารละลายด่างจะเปลี่ยนเป็น lumiflavin ซึ่งละลายใน chloroform ปฏิกิริยานี้จะเฉพาะตัวและไวมาก ส่วน flavin ตัวอื่นที่มีอยู่ในสารละลายจะไม่ให้ผลเช่นนี้ เมื่อนำสารละลายที่ถูกแสงนี้ไปทำให้เป็นกรดและสกัด lumiflavin ที่เกิดขึ้นด้วย chloroform วัดการดูดซึมของแสงโดย photometry (ที่ 450 nm.) หรือวัด fluorescence ที่ 513 nm. เนื่องจาก fluorometric method จะมีความไวมากเมื่อเทียบกับ photometric method จึงใช้กับสารละลายที่เจือจาง แต่ในยาเตรียมจะมีไรโบฟลาวินอยู่เป็นจำนวนที่มากพอ ดังนั้นโดยทั่วไปจึงมักใช้ photometry ในการวัดการดูดซึมของแสงที่ 450 nm.

ถ้ามีสารรบกวนอยู่ในสารละลายวิเคราะห์ ควรขจัดสิ่งรบกวนออกก่อนโดยการทำให้บริสุทธิ์ด้วย fuller's earth หรือ 'Permutit' T

ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ การที่ ribose side chain หลุดออกไปเหลือเป็น lumiflavin อย่างไม่เป็นไปโดยปริมาณ ดังนั้นถ้าต้องการให้ได้ผลเป็นที่เชื่อถือและทำซ้ำได้ ทุก ๆ ตัวอย่างจะต้องให้ถูกแสงในสภาวการเฉพาะ (identical conditions) สภาวะที่สำคัญต่าง ๆ ก็มี เช่น ชนิดของดวงไฟ และ light output อุณหภูมิของสารละลาย เวลาในการถูกแสง ระยะทางระหว่างผิวหน้าของของเหลวและไฟ มักใช้ไฟ 60 และ 1000 วัตต์สำหรับให้แสง ดวงไฟที่มีกำลังสูง (มาก) ก็จะให้ lumiflavin มาก แต่จะให้ความร้อนสูง ซึ่งทำให้ไรโบฟลาวิน หรือ lumiflavin สลายตัวในสารละลายด่าง และทำให้เกิดความผิดพลาดขึ้นในการวิเคราะห์ ไฟที่ใช้ควรเป็นหลอดเรืองแสงที่มีความดันต่ำ ซึ่งให้แสงใส (bright) ที่ไม่ทำให้ร้อนมาก

โพลาโรกราฟิค เทคนิค [48-50]

วิธีโพลาโรกราฟิคที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ ใช้หลักของการเกิด current voltage curves โดยที่การกระจายตัวจะกำหนดอัตราการสูญเสียประจุของ ions ที่ microelectrode อันเป็นผลเนื่องมาจาก concentration overpotential สามารถที่จะทำการวิเคราะห์สารได้ทั้ง qualitative และ quantitative ถ้าสารนั้นเกิด cathodic reduction หรือanodic oxidation ได้ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ประมาณ $10^{-5} - 10^{-2}$ M

หลักเบื้องต้น

เมื่อapply potential ให้electrode ที่อยู่ในสารละลาย เช่น จุ่ม platinum electrode ลงในสารละลายของ copper (II) ions ที่มีความเข้มข้น 0.1M ในกรด sulfuric เมื่อต่อเข้ากับ calomel reference electrode ก็จะถือว่า platinum electrode มี potential เท่ากับ calomel electrode และไม่มีกระแสไหล ขณะนี้ platinum electrodeถูก polarised และจะยังคงเป็นอยู่เช่นนั้นจนกว่าจะ apply emf ผ่าน electrode ทั้งสองสูงเกิน decomposition potential ของ cupric ions copper ก็จะ deposite บน platinum ที่ potential นี้จะไม่มี reversible electrode reaction หลังจากที่ copper บางส่วน deposite ไปแล้ว electrode ก็จะถูก depolarized จะหา potential ของมันโดยใช้สมการของ เนินส์ (Nernst equation)

$$E = E^0 + \frac{0.0591}{2} \log (Cu^{++})$$

ถ้าทำการทดลองกับสารละลายที่คนอย่างดี เมื่อถึง E_d (decomposition potential) ของ copper (II) copper จะออกจากสารละลายมาเคลือบ electrode และเริ่มมีกระแสไหล การเพิ่ม voltage ขึ้นอีกจะทำให้กระแสเกิดเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรง ตามกฎของโอห์ม (Ohm's law) ตรงข้าม ถ้าลด voltage ลงมาถึง E_d กระแสจะลดลงมาถึงศูนย์ ตรงนี้ copper ส่วนที่ deposit อยู่กับ platinum electrode จะละลายออกมา

แต่ถ้าทำการทดลองซ้ำโดยไม่คนสารละลาย และใช้ electrode ที่มีพื้นที่สัมผัสกับสารทดลองเพียงเล็กน้อย เมื่อ apply potential จนถึง E_d ถ้า voltage ยังคงที่

กระแสจะเริ่มไหล แต่จะลดลงโดยเร็วเนื่องจากความเข้มข้นของ ion ตรง microelectrode surface ลดลง เพราะเกิด deposition กระแสที่เกิดขึ้นนี้แสดงถึงอัตราที่ ionsใหม่ ๆ กระจายตัวไปยังmicroelectrode ขณะที่มีการกระจายตัวเกิดขึ้นช้า ๆ ก็จะเกิด concentration gradientระหว่างผิวหน้าของelectrode กับสารละลายส่วนใหญ่ ความเข้มข้นของ ions ที่ผิวหน้าของelectrode (C_0) จะลดลงและแตกต่างจากความเข้มข้นในสารละลายส่วนใหญ่ (bulk of the solution), C

อัตราการกระจายตัวของionic species จะเป็นสัดส่วนกับความแตกต่างของความเข้มข้นทั้งสอง ดังนี้

โดยกฎของฟิค (Fick's law) $\frac{ds}{dt} = \frac{AD}{d}(C - C_0)$

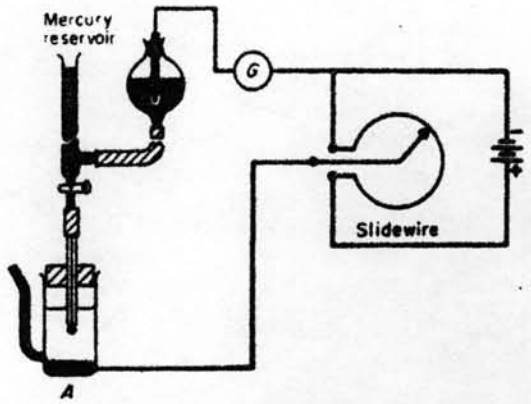
A = ผิวหน้าของ electrode เฉพาะส่วนที่สัมผัสกับสารละลาย

D = สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของ ion

d = ความหนาของชั้นที่เกิดการกระจายตัวรอบ ๆ microelectrode

ions ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ microelectrodeจะเริ่มลดจำนวนลงจน C_0 เข้าใกล้ศูนย์ อัตราการกระจายตัวจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นในสารละลายส่วนใหญ่ (C) แสดงว่า electrode ถูกpolarized อย่างสมบูรณ์ เมื่อเกิดสมดุลย์ขึ้นที่microelectrode อัตราการสูญเสียประจุของ ion ก็จะเท่ากับอัตราการกระจายตัวไปยัง electrode

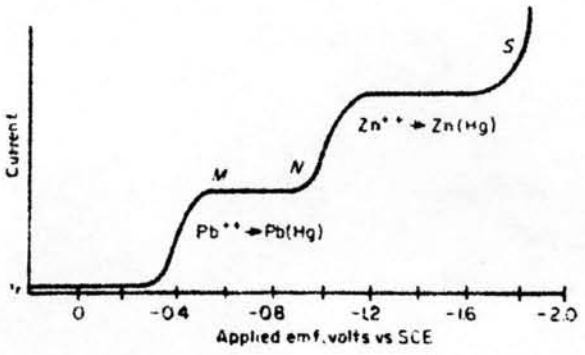
<u>วงจรของโพลาโรกราฟิค</u>



<u>รูปที่ 1</u> <u>ไดอะแกรมเครื่องมือ โพลาโรกราฟ</u>

ดังในรูปที่ 1 anode คือชั้นของปรอทที่อยู่ก้น flask (A) cathode คือ ปรอทหยดจากอ่างปรอท (reservoir) ผ่านทางปลายของหลอด capillary ด้วยความเร็ว 1 หยด/3 วินาที anode และ cathode ต่อเข้ากับขั้วบวกและลบของ potenteometer slidewire เพื่อที่จะเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ระหว่าง anode กับ cathode วัดกระแสที่เกิดขึ้นโดย galvanometer (G)

ขบวนการ cathodic และ anodic ใน cell ชนิดนี้จะถูกแยกจากกันโดยทำให้ electrode อันหนึ่งมีขนาดใหญ่มากเมื่อเทียบกับอีกอัน ความหนาแน่นของกระแสของ electrode ที่ใหญ่กว่าจะมีค่าต่ำกว่าของ electrode อันเล็ก electrode อันหลังนี้จะถูก polarized ได้ง่าย anode จะมีพื้นที่กว้าง และโดยทั่วไปกระแสมีค่าน้อย เช่นเป็น ไมโครแอมแปร์ ดังนั้นจะถือว่ามันมี potential คงที่



รูปที่ 2 Current-voltage curves ของตะกั่วและสังกะสีใน 0.1 M potassium chloride.

รูปนี้แสดงถึง cathodic current-voltage curve ที่เรียกว่าโพลาโรแกรมของตะกั่ว และสังกะสีใน 0.1 M KCl wave ที่หนึ่งบนโพลาโรแกรมคือการ reduction ของ lead ion เกิดเป็น amalgam บาง ๆ อยู่บนผิวหน้าของหยดปรอท

$$Pb^{++} + 2e^{-} + Hg \longrightarrow Pb\ (Hg)$$

wave ที่สองเป็นการ reduction ของ zinc ion ในตอนแรกของ curve คือ residual current ซึ่งจะมีค่าน้อย เมื่อถึง E_d ของ lead ion กระแสจะเกิดเพิ่มขึ้นทีละน้อย และจะเร็วขึ้นในตอนกลาง ๆ เกือบเป็นเส้นตรง และเริ่มช้าลงในที่สุดก็ถึงค่า limiting

current ซึ่งควบคุมโดยขบวนการกระจายตัว คือระหว่าง M และ N จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกระแส จนกว่าจะเกิน E_d ของ zinc ion ก็จะเกิด zinc wave ขึ้นในทำนองเดียวกัน ตอนท้ายกระแสจะเพิ่มขึ้นที่ S เกิดจาก reduction ของ potassium ions ที่มีอยู่ใน supporting electrolyte

เนื่องจากพื้นที่ของหยดปรอทมีน้อยมาก กระแสจะมีค่าประมาณ 1 – 100 ไมโครแอมแปร์ การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นในสารละลายที่ทำการทดลองมีน้อยมาก จะสามารถบันทึกโพลาโรแกรมได้หลาย ๆ อัน โดย limiting current ไม่เปลี่ยนแปลงเลย

diffusion current ของสาร electroactive จะให้ polarographic wave เฉพาะตัว แต่จะมีบางอย่างที่มีอิทธิพลต่อ total limiting current เช่นอาจมี residual current, adsorption current และ kinetic current เกิดร่วมด้วย จึงต้องกำจัดกระแสเหล่านี้ หรือแก้ไขค่าของ limiting current ที่วัดได้

005749

Migration Current

electroactive material จะไปถึง electrode ได้โดย electrostatic attraction และ diffusion forces cations จะเคลื่อนไปยัง cathode ด้วยอิทธิพลของสนามไฟฟ้า ทำให้เกิด cathode diffusion current เพิ่มขึ้น ถ้า cation อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประจุลบ เช่น $Cd(CN)_4^{=}$ diffusion current จะลดลง

migration current จะถูกกำจัดได้ง่าย ๆ โดยการเติม inert electrolyte ที่ไม่รบกวนขบวนการ electrode (electrode process)ลงไปเป็นจำนวนมาก เช่นเติม 0.1 M KCl ลงใน 0.01 M cadmium ion กระแสจะถูกพาผ่าน cell ด้วย ions ทั้งหมดที่มีอยู่ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของแต่ละ ion และ transference number ของมัน ในกรณีนี้กระแสประมาณ 90 % จะถูกส่งไปยัง cathode โดย potassium ions ถ้าความเข้มข้นของ pot. ion เพิ่มจนมีจำนวนมากกว่า 99 % ของ cations ทั้งหมด relative current ที่ถูกพาไปโดย cations อื่นก็จะลดลงจนเป็นศูนย์ chloride ion ก็จะพากระแสไปในทิศตรงข้าม และเนื่องจาก pot. ions จะไม่สูญเสียประจุที่ electrode จนกว่าจะ apply voltage สูงมาก ๆ ดังนั้น จึงมี ions ของ pot. จำนวนมากมายอยู่หนาแน่นรอบ ๆ

i17956110

cathode ประจุบวกจะอยู่หนาแน่นจนถึงบริเวณใกล้ผิวหน้า electrode ที่สุด ทำให้ electrostatic attraction ไม่สามารถดึงดูด reducible ions อื่นจากสารละลายส่วนใหญ่ (bulk solution) ถ้ามี supporting electrolyte มากเกินพอ ก็จะกำจัด migration current ออกไปได้ โดยมาก sup. electrolyte มักจะเป็น buffer ที่ควบคุม pH ด้วย

Diffusion Current

$$i_d = 607\ nD^{\frac{1}{2}}\ Cm^{2/3}\ t^{1/6}$$

i_d = ค่าของกระแสโดยเฉลี่ยของแต่ละหยด – ไมโครแอมแปร์

n = จำนวนของอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาของหนึ่ง ion หรือหนึ่งโมเลกุลของ depolarizer

D = สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร reducible หรือ oxidisable – ซ.ม.^{2}/วินาที

C = ความเข้มข้นของ depotarizer – มิลลิโมล / ลิตร

m = อัตราการไหลของปรอทจาก electrode – มิลลิกรัม / วินาที

t = ระยะเวลาของหนึ่งหยด – วินาที (วัดตรง $E_{\frac{1}{2}}$)

Polarographic Maxima

current voltage curve ที่ได้จาก dropping mercury electrode จะเปลี่ยนแปลงไปถ้าเกิดมี maxima (ลักษณะเป็นรูปแหลมหรือโค้งมน มีกระแสเพิ่มสูงขึ้นกว่า diffusion current ปกติโดยเร็ว จนถึง critical value แล้วก็จะลดลงโดยเร็วมายัง plateau ปกติ) ต้องกำจัด maxima ออกจาก true diffusion current plateau surface active agent เช่น dye ions หรือ colloids จะสามารถลด maxima ได้ มักใช้ gelatin 0.002 – 0.01% ถ้าน้อยไปก็ไม่ได้ผล ถ้ามากไปจะลด diffusion current ด้วย อาจใช้ agar, methylcellulose หรือพวก dyestuffs เช่น methyl red, acid และ basic fuchsine โดยทั่วไปมักจะใส่ suppressor ลงในสารละลายโพลาโรกราฟิคเป็นการป้องกันไว้ก่อน ขนาดของ maxima จะขึ้นกับระยะเวลาของหนึ่งหยด ถ้าช้า maxima จะเล็กลง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่บังคับ diffusion current

จากสมการของ อิลโควิค แสดงให้เห็นว่า

1. Diffusion current จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร electroactive ซึ่งนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ
2. Diffusion current จะเป็นสัดส่วนกับผลคูณของ $m^{2/3}$ $t^{1/6}$

ปริมาณของ m และ t จะขึ้นกับขนาดของหยดปรอทและความดันของลำปรอท(mercury column) ที่ต่อเข้ากับ electrode ความดันเพิ่มขึ้นจะไม่เปลี่ยนขนาดของหยดปรอท แต่จะเพิ่มอัตราความเร็วของการหยด เท่ากับเพิ่มพื้นที่ของ electrode ที่สัมผัสกับสารละลาย อ่างปรอท(mercury reservoir) มีพื้นที่มากจะสัมผัสกับลำปรอท เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความสูงของcolumn ตลอดการวิเคราะห์

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อ diffusion current เนื่องจากสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของ ions หลายชนิดจะเปลี่ยนแปลง 1 – 2 % ต่ออองศาในช่วงใกล้ ๆ 25°ซ. ดังนั้นควรควบคุมให้อยู่ใน 0.5°ซ. หรือน้อยกว่านี้

อัตราการหยดของปรอท ถ้าเร็วไปก็เท่ากับไปกวนสารละลาย ทำให้ความหนาของชั้นการกระจายตัวเปลี่ยนไป และทำให้เกิดกระแสเพิ่มมากขึ้นอย่างผิดปรกติ เนื่องจาก dropping electrode ต้องการสารละลายที่อยู่นิ่ง ๆ ถ้าหยดปรอทไม่ได้ตกลงมาเนื่องจากน้ำหนักตัวของมันเองแล้ว ก็จะไม่ได้reproducible diffusion current ดังนั้น electrode ก็ควรจะติดแน่นไม่แกว่งไปมา

ธรรมชาติและความหนืดของตัวทำละลายจะมีอิทธิพลต่อdiffusion current สัมประสิทธิ์การกระจายตัว(D) จะแปรกลับกับสัมประสิทธิ์ความหนืดของสารละลาย ionic species ขนาดต่างกันจะมีอัตราการกระจายตัวต่างกัน แล้วแต่ว่าจะอยู่ในสภาพของ aquo complex หรือสภาพอื่น เช่น stanic ions จะไม่เกิด reduction ใน nitrate หรือ perchlorate media ซึ่งมีaquo complex อยู่ แต่จะให้ wave ของ Sn $Cl_6^=$ species อย่างดีในสารละลาย chloride

Half Wave Potential ($E_{\frac{1}{2}}$) คือ potential ตรง inflection ของ current voltage curve จะอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของระยะทางระหว่าง residual current และ limiting current plateau (ในรูปที่ 4) $E_{\frac{1}{2}}$ จะสัมพันธ์กับ standard reduction potential (E^0) ของ oxidation reduction system $E_{\frac{1}{2}}$ นี้จะเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว สามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจเอกลักษณ์

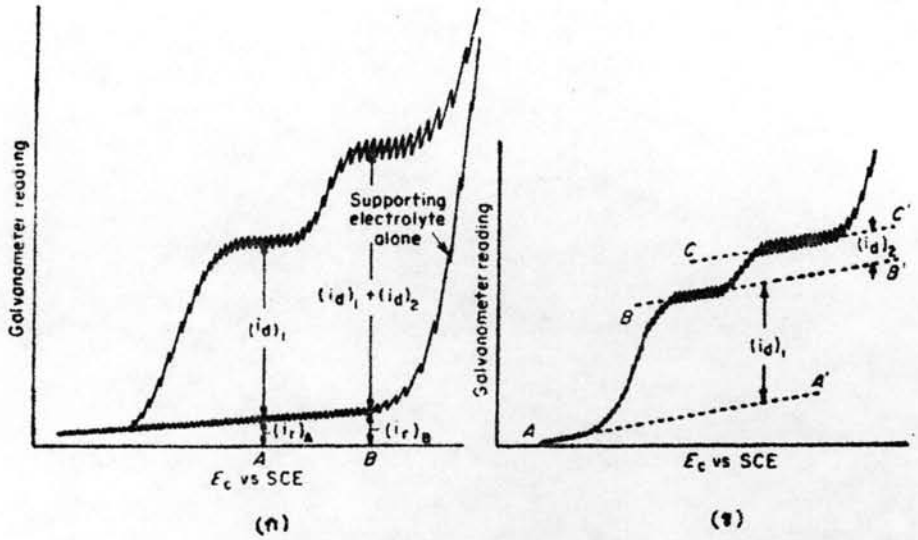
การกำจัดออกซิเจนที่ละลายอยู่

ออกซิเจนจะถูก reduced ได้ง่ายที่ dropping electrode มันจะเกิดขึ้น 2 แห่ง คือที่ - 0.1 และที่ - 0.9 V. V.S. S.C.E. (Saturated Calomel Electrode) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องกำจัดอากาศที่ละลายอยู่ออกจากสารละลายวิเคราะห์ ทำได้โดยการผ่าน inert gas เช่น ไฮโดรเจนหรือไนโตรเจน ลงในสารละลายประมาณ 10 - 15 นาทีในทันทีก่อนที่จะบันทึกโพลาโรแกรม

ไนโตรเจน หรือ ไฮโดรเจนที่ใช้ทางการค้าต้องนำไปชจัดออกซิเจนเสียก่อน

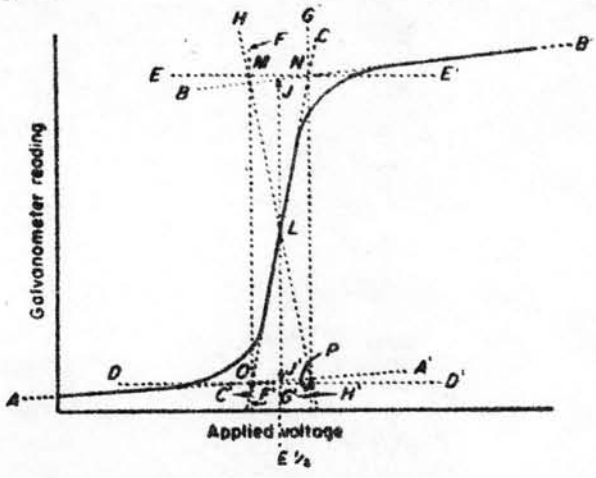
การวัดความสูงของ wave

ในการหาปริมาณด้วยโพลาโรกราฟี ต้องวัดความสูงของ wave ถ้า wave ที่ดี จะให้ limiting current plateau ขนานกับ residual current ก็วัดหา diffusion current ได้ง่าย การทดลองที่แน่นอนต้องทำการบันทึกโพลาโรแกรมของ



รูปที่ 3 การวัด diffusion current: ก. exact method ข. extrapolation method.

supporting electrolyte เดี่ยว ๆ แล้วนำไปหักออกจาก limiting current ที่ voltage เดียวกัน อีกวิธีง่ายกว่า คือ คอ residual current ออกไป แล้ววัดค่าแตกต่างระหว่าง limiting current กับส่วนต่อของ residual current วิธีนี้ใช้กันมากในทางปฏิบัติ (รูปที่ 3) แต่ wave ที่ไม่ดอยดีต้องใช้ "point method" วิธีนี้ความสูงของ wave คือระยะทางในแนวดิ่งตรง $E_{\frac{1}{2}}$ ระหว่างเส้นตรงที่เป็น residual และ diffusion current (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การวัดความสูงของ wave โดยใช้ "point method"

ข้อจำกัดเมื่อใช้ปรอทเป็น electrode คือใช้ voltage ไม่ให้สูงถึง + 0.4 V. V.S. S.C.E. เพราะที่ voltage นี้ปรอทจะละลายแล้วให้ anodic current

ไวตามินบี 2 จะทำให้เกิด reversible redox system ซึ่งมี $E_{\frac{1}{2}}$ คงที่เฉพาะตัว จึงมีการนำเอาโพลาโรกราฟิค เทคนิคเข้ามาใช้วิเคราะห์หาปริมาณของไวตามินชนิดนี้ในยาเตรียมชนิดต่าง ๆ มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการที่ $E_{\frac{1}{2}}$ ขึ้นกับ pH และศึกษาเกี่ยวกับ reversibility ของไรโบฟลาวิน และ leuco form [31] ในสารละลายกรด จะมี prewave [32] เกิดขึ้นก่อน curve และความสูงของ wave นี้จะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของบี 2 prewave นี้เกิดโดยการดูดซับของ reduced form ของบี 2 บนหยดปรอท การศึกษา kinetics ของการดูดซับโดยใช้ Oscillography พบว่า prewave จะป้องกันได้ถ้าเติม pyridine แต่ถ้าใช้ urea จะไม่ได้ผล

เกี่ยวกับการสลายตัวของบี 2 อันเนื่องจากแสง โดยใช้โพลาโรกราฟีภายใต้สภาพการณ์ต่าง ๆ พบว่ามี wave ใหม่เกิดเพิ่มขึ้น นอกจาก polarographic curve ของบี 2 ซึ่งเกิดขึ้นที่ pH 7 และ $E_{\frac{1}{2}} = -0.48$ V. reduction wave ใหม่นี้จะต่างไปจากของบี 2 สารที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของบี 2 เนื่องจากแสงนี้ คือ lumichrome

ถ้าบี 2 ในตัวกลางที่เป็นด่าง pH 12 ในที่ไม่มีอากาศ เมื่อถูกแสงสว่างจะให้ 2 waves ใหม่เกิดขึ้นที่ $E_{\frac{1}{2}} = -1.69$ และ -1.85 V. ซึ่งเป็น wave ของ decomposition products อันเกิดเนื่องจาก dehydrogenation ของ sugar side chain และความสูงของมันจะสมดุลย์กับ lumichrome ที่เกิดขึ้น สารประกอบตัวแรกจะเกี่ยวข้องกับพวก glycolaldehyde และ glycerylaldehyde [33] แต่ไม่ใช่ formaldehyde ส่วนสารประกอบซึ่งถูก reduced ใน wave ที่ 2 ยังไม่ทราบว่าเป็นอะไร แต่ไม่ใช่ erythrose และไม่ใช่ ribose

ในที่ไม่มีอากาศ photochemical process ก็ทำให้เกิด reduction ของ flavin ถ้าในตัวกลางที่เป็นกรดจะได้ rhodoflavin มีสีแดง ถ้าในตัวกลางที่เป็นกลางและไม่มีอากาศ ก็จะให้ reduced form [34] ซึ่งจะถูก oxidised โดยโพลาโรกราฟี ที่ E เป็น + มากกว่า reduction ของบี 2 = 200 มิลลิโวลท์ หรือถูก oxidised ด้วยอากาศได้เป็นบี 2 สารประกอบตัวนี้ได้ชื่อว่า deuteroriboflavin

เพราะสามารถเปลี่ยนเป็น lumiflavin ได้โดยไม่ต้องถูกแสงสว่าง

ทำนองเดียวกัน บี 2 ในด่างจะเกิดการสลายตัวในที่ไม่มีอากาศ เป็น deuterolumiflavin [34]

reduction wave สำหรับบี 2 จะเป็น + เมื่อเทียบกับในของผสมที่มีไวตามินอื่น ๆ ของกลุ่มบี เช่น บี 1 nicotinic acid [35] และ folic acid [36] การวิเคราะห์โดยปริมาณของบี 2 นี้จะไม่ถูกรบกวนโดย p-aminobenzoic acid, pyridoxine, meso-inositol หรือ choline

a well-developed curve จะเกิดใน pH กว้างมาก แต่เนื่องจากบี 2 มีการเปลี่ยนแปลงในตัวกลางที่เป็นด่าง pH 7 จึงดีที่สุดสำหรับงานวิเคราะห์ [35] และใช้ 0.1 N KCl [35,36] สำหรับยาเม็ดและยาฉีด ควรใช้ buffer pH 7.4 และมี 2 % urea [1] เพื่อเพิ่มการละลายของบี 2 เนื่องจากความสูงของ diffusion current (i_d) ขึ้นกับ pH ของสารละลาย ดังนั้น calibration curve ต้องบอกไว้ด้วยว่าใช้ pH เท่าใด ไวตามินบี 2 วัดในความเข้มข้น 5×10^{-6} M จะมีความแม่นยำ ± 3 % [35]

ในการวิเคราะห์หาปริมาณในยาเตรียม สามารถใช้ได้ทั้งนั้นกับตัวกลางทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว วิธีนี้เหมาะสมกว่า colorimetric (ตาม U.S.P. XII) และเร็วกว่าการวิเคราะห์หาปริมาณทาง spectro-fluorometric, microbiological และ spectrophotometric

ใน buffer pH 2.8 การหาปริมาณด้วยโพลาโรกราฟีจะมีความแม่นยำ (accuracy) พอ ๆ กับ fluorometry และผลที่ได้รับจากทั้งสองวิธีนี้จะสอดคล้องกัน [37] แต่ fluorometry จะมี pretreatment มากกว่า

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณโดยโพลาโรกราฟิคที่ pH 2.8</u> [15]

<u>หลักการ</u>

ไรโบฟลาวินจะให้ well defined wave ในย่าน pH 1 - 12 การวิเคราะห์

หาปริมาณไรโบฟลาวิน ทำในตัวกลาง (media) ที่เป็นกรดประมาณ pH 2.8 ใช้หาปริมาณใน purified riboflavin in dry form, solubilised riboflavin และใน solid vitamin mixtures Supporting electrolyte คือ buffer solution ซึ่งประกอบด้วย acetic, boric, phosphoric acid และ potassium chloride

ปรากฏว่าผลของ recoveries ของไรโบฟลาวิน โดยวิธีโพลาโรกราฟิค สอดคล้องอย่างใกล้ชิดกับของ fluorometric method percentage error = ± 3 ไรโบฟลาวินสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ในที่มี calcium pantothenate, nicotinic acid และ choline chloride

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้ โพลาโรกราฟิคใน Phosphate Buffer</u>

<u>หลักการ</u>

การวิเคราะห์หาปริมาณของไรโบฟลาวิน โดยใช้ โพลาโรกราฟี ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 [16] ทั้ง diffusion current และความสูงของ wave จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นในย่าน $5 \times 10^{-5} \longrightarrow 5 \times 10^{-4}$ M ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่จะวัดปริมาณได้ คือ 5×10^{-6} M สำหรับ dropping mercury electrode ไวตามินบี 2 จะให้ wave เฉพาะตัวที่มี (half wave potential) $E_{\frac{1}{2}} = -0.47$ V.

เนื่องจากไรโบฟลาวินละลายน้ำได้น้อย แต่จะละลายในน้ำยาที่เป็นกรดหรือด่างได้ดีกว่า ถ้าทำในสารละลายที่เป็นกรด [38] จะเกิด anomalous fore-wave [39] ซึ่งขึ้นกับการดูดซับ reduction product บนผิวหน้าของหยดปรอท ถ้าสารละลายมี pH สูงกว่า 6 wave นี้จะไม่เกิด แต่ถ้าในสารละลายด่าง บี 2 จะสลายตัวเนื่องจากแสงโดยเร็ว จึงเลือกทำในสารละลายที่เป็นกลาง และใช้ urea เพิ่มการละลายของบี 2 [1] จะไม่มีการเกิด close compound ระหว่าง urea และไรโบฟลาวิน [15]

Lingane และ Davis ได้ทำการทดลอง [1] เกี่ยวกับอิทธิพลของ urea และ

pyridine ที่มีต่อไวตามินบี 2 (4×10^{-4} M) ใน pH 7.38 Sorensen's phosphate buffer พบว่า urea ไม่ทำให้ i_d ของบี 2 เพิ่มขึ้นเลย และไม่ทำให้ $E_{\frac{1}{2}}$ เปลี่ยนแปลงด้วย คืออยู่ประมาณ - 0.465 V. (E ในการ reduce urea = - 1.8 V.) ส่วนการกำจัดการดูดซับของบี 2 และ reduction product บนหยดปรอท pyridine เท่านั้นที่จะสามารถกำจัดได้ และไม่ทำให้ pH เปลี่ยน สำหรับความเข้มข้นของไวตามินบี 2 ขนาด 10^{-4} - 10^{-3} M จะมีความแม่นยำ (accuracy) ของการวัด = ± 2 %

ผลของ soluble tablet excipients ที่มีต่อ diffusion current [1]

เมื่อทดลองกับยาเม็ดเคลือบน้ำตาลที่มีสี พบว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ใน tablet base ไม่ทำให้ผลเปลี่ยน และสีที่เคลือบยาเม็ดก็ไม่ถูก reduced ใน potential range ที่ใช้

ผลของ suspended tablet ที่มีต่อการวิเคราะห์โดยใช้โพลาโรกราฟี [1]

เนื่องจาก suspended tablet มีผลต่อ colorimetry ทำให้ต้องเสียเวลากรองผ่าน sintered glass filter เมื่อทดลองโดยใช้ โพลาโรกราฟี ไม่ต้องกรองสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ พบว่าถ้าเติมไวตามินบี 2 จำนวน 3 มก. ผลออกมาเป็น 3.08 และ 2.95 มก. แสดงว่า suspended tablet มีผลต่อ โพลาโรกราฟีเพียงเล็กน้อย คือไปแทนที่บริมาตรของของเหลว จึงมีผลต่อความเข้มข้นของไวตามินบี 2 ที่ละลายอยู่เท่านั้นเอง และบริมาตรโดยเฉลี่ยของเศษหัก ๆ ของเม็ดยาจะแทนที่ของเหลว 0.05 มล. ความผิดพลาดจากเรื่องนี้น้อยกว่า 0.2 % ซึ่งน้อยกว่าจากการวัด diffusion current เสียอีก

การเปรียบเทียบระหว่างโพลาโรกราฟิค และ U.S.P. Colorimetric Methods [1]

Colorimetric method มีข้อยุ่งยากตรงการตัดสินสีที่เท่ากัน เพราะคนส่วนมากตัดสินไม่เหมือนกัน เขาจึงใช้ Duboscq colorimeter เพื่อหาปริมาณบี 2 ในยาเม็ด แต่มีข้อเสียคือ สารละลายของยาเม็ดจะให้สีเหลือบเล็กน้อย เกิดเป็น

สีเทาของสารละลายใน colorimeter และเมื่อกรองผ่าน sintered glass filter porousity No. 4 แทนกระดาษกรองซึ่งจะดูดซับไรโบฟลาวินไว้ ก็ไม่ใส และอัตราการไหลก็ช้ามาก พบว่าผลของ colorimetric ต่ำกว่าของโพลาโรกราฟิค (สำหรับยาเม็ดไวตามินบี 2) แต่ถ้าเทียบโดยชั่งบี 2 บริสุทธิ์ แล้วหาปริมาณโดยใช้ colorimétric เทียบกับโพลาโรกราฟิค พบว่าผลของโพลาโรกราฟิคจะได้ค่าใกล้เคียงกับจำนวนบี 2 ที่ชั่งมา ส่วนผลของ colorimetric จะสูงกว่าโพลาโรกราฟิค แสดงว่าการที่มีวัตถุจาก tablet base แขวนตัวอยู่ แม้จำนวนเล็กน้อย ก็จะมีอิทธิพลต่อ colorimetry และผลนี้ก็จะต่างไปตามการตัดสินของผู้วิเคราะห์ด้วย

<u>การหาปริมาณบี 2 ในยาฉีด</u> [1] (ampoule solution)

ทดลองโดยใช้ยาฉีด 1 มล. ใน buffer pH 7.38 ผลของ colorimetric สูงกว่าโพลาโรกราฟิค

สำหรับสารละลายที่ทำให้เจือจางด้วย buffer pH 7.38 มีสีส้มเหลือง แต่ของสารมาตรฐาน (standard) ที่เตรียมสำหรับ colorimetry เป็นสีเขียวเหลือง ผลของ colorimetry ย่อมไม่น่าเชื่อถือ

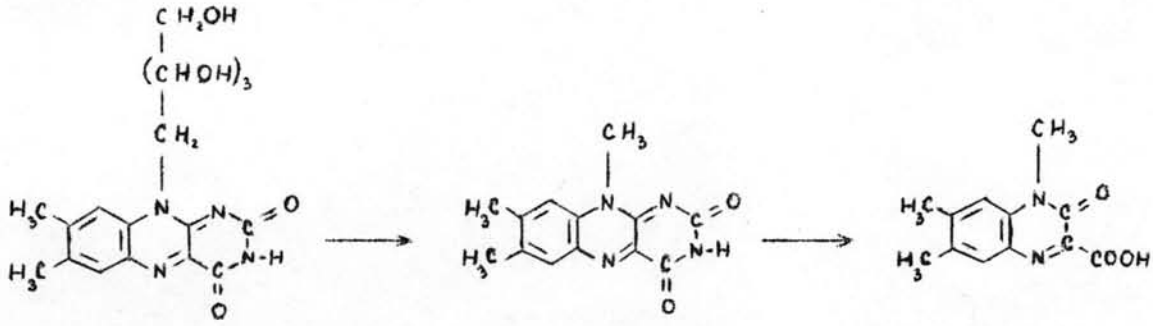
<u>อิทธิพลของแสงที่มีต่อไวตามินบี 2 ศึกษาโดยใช้โพลาโรกราฟี</u> [1]

สารละลายไวตามินบี 2 โดยปรกติจะไม่คอยอยู่ตัวเมื่อถูกแสง โดยเฉพาะถ้าเป็นด่าง การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้น 4×10^{-4} M ใน buffer pH 7.38 ใช้ urea เป็น co-solvent พบว่าความสูงของ wave ทั้งหมดจะลดลงเพียงเล็กน้อย และการที่สารละลายถูกแสง โดยใช้ดวงไฟ (heating lamp) ในระยะเวลาพอสมควร (moderate period of time) ก็จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงในสารละลายเมื่อใช้โพลาโรกราฟี

สำหรับการสลายตัวเมื่อถูกแสง (photolysis) จะเกิดได้เร็วมาก (ขึ้น) ถ้าอยู่ใน pH สูง (ขึ้น) ไวตามินบี 2 ที่ละลายใน buffer pH 11 เมื่อถูกแสง 2 - 3 ชม. จะให้ wave ที่สองที่มี $E_{\frac{1}{2}}$ เป็นลบมากกว่าของไรโบฟลาวิน ถ้าถูกแสงต่อไป

ความสูงของ wave ที่สองนี้จะเพิ่ม และ wave ของบี 2 ก็จะลดลง สารใหม่ที่ให้ wave ที่สอง คือ lumiflavin

ถ้านำสารละลายไปถูกแสงต่อไปอีก ก็จะได้ wave ที่สาม แสดงว่าเกิดการ break down ของ lumiflavin ถ้า wave ที่สามสูงมากขึ้น wave ที่สองก็จะลดลง สำหรับการ break down ของ lumiflavin ยังไม่ทราบว่าอาศัยความช่วยเหลือของแสงด้วยหรือไม่ จากโพลาโรแกรม จะแสดงให้เห็นถึงการที่ค่อย ๆ สูญเสียบี 2 ไปอย่างช้า ๆ ในกรณีที่สารละลายถูกแสง และจะไม่พบ lumiflavin ในสารละลายเดียวกันนี้ที่เก็บไว้ในที่มืดเลย แต่จะมีการสูญเสียไรโบฟลาวินไปเล็กน้อย แต่ในอัตราที่ช้ามากเมื่อเทียบกับสารละลายส่วนที่ถูกแสง และเกิดเป็น break down product ของ lumiflavin ซึ่งแสดงว่า break down product นี้ เกิดโดยฤทธิ์ของด่างที่มีต่อ



Riboflavin Lumiflavin break-down product

ทั้งไวตามินบี 2 และ lumiflavin (Kuhn and Ludy)[40] เรื่องของ break down product ที่พบจากโพลาโรกราฟีไปยืนยันงานของ Daglish, Baxter และ Wokes[41] ซึ่งพบในเรื่องของ Spectroscopy ว่าสารละลายด่างของไวตามินบี 2 จะให้ decomposition product บางตัวนอกจาก lumiflavin แต่ถ้าสารละลายที่เป็นกลางเมื่อถูกแสง จะให้ small ill-defined wave มีค่า $E_{\frac{1}{2}}$ เป็นลบมากกว่าของบี 2 ประมาณ 0.06 V. (60 mV.) เขาเชื่อว่าเพราะมี lumichrome อยู่ด้วย อันเกิดจากการที่สารละลายที่เป็นกลางหรือเป็นกรดถูกแสงสว่าง ใน compressed tablet และยาฉีดจะไม่พบ product เหล่านี้

การวิเคราะห์หาปริมาณของไรโบฟลาวินโดยใช้ โพลาโรกราฟีในสารละลาย KCl [17]

หลักการ

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของไรโบฟลาวินในสารละลาย KCl ในกรด acetic วิธีนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของไรโบฟลาวินในยาเม็ดและยาน้ำ เช่น พวก polyvitamin emulsion ยาเตรียมที่มี minerals ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ถ้าไม่ขจัดสิ่งที่รบกวนออกไปก่อน