تقييم ثباتية أمبولات بـ كومبلكس المختلطة و مقارنتها مع أمبولات بـ١٢ و (بـ١ و بـ٦) المنفصلة

طالبة الدراسات العليا: آلاء رسلان كلية الصيدلة – جامعة حمص

إشراف: أ.م.د.هاني سليم

ملخص البحث

تعتبر الأشكال الصيدلانية للفيتامينات المنحلة في الماء من أكثر الأشكال قليلة الثبات والحساسة للعديد من العوامل مثل الضوء والحرارة والرطوبة والعوامل المؤكسدة والمرجعة والحموض والأسس، تشير العديد من الدراسات إلى الثباتية الضعيفة للفيتامين B_{12} في محاليله المائية بسبب حساسيته للضوء وعند تواجد العديد من الفيتامينات المرافقة له وخاصة الفيتامين B_1.

يوجد في السوق السورية نوعين من الأمبولات الحاوية على الفيتامينB_{12} ، النوع الأول يحوي الفيتامين B_{12} بالمشاركة مع الفيتامينات B_1 و B_6 مختلطين في أمبولة واحدة (مختلطة)، والنوع الثاني يحوي B_{12} في أمبولة منفصلة و B_1 ، B6 معاً في أمبولة أخرى (منفصلة)، ويتوجب مزجهما قبل الإعطاء مباشرةً.

تضمن البحث جمع عينات من الأمبولات بشكليها والمقارنة بينها بإجراء اختبارات ثبات مسرع بدرجات (٣٠° و٤٠° م) ومقارنتها مع درجة الحفظ المثالية (٢°–٨° م) في البراد لمدة ثلاثة أشهر، و تم إجراء المقايسة في مطلع كل شهر.

كانت النتيجة خروج قيم B_{12} عن الحدود الدستورية في الأمبولات المختلطة في درجة ٤٠°م في الشهر الثاني، وانخفضت قيم B_{12}عن القيم البدئية في درجة ٣٠°م ولكن بقيت ضمن الحد الدستوري، وأيضاً بقيت العينات المحفوظة في البراد ضمن الحد المسموح

لنهاية مدة الحفظ. أما بالنسبة إلى الأمبولات المنفصلة فقد أظهرت ثباتية الفيتامين B_{12} في جميع المحضرات وفي جميع درجات الحفظ ولنهاية المدة.

مما يوضح أفضلية الأمبولات المنفصلة من حيث ثباتية الفيتامين B_{12} وضرورة حفظ الأمبولات المختلطة في البراد.

الكلمات المفتاحية: جودة الأدوية، أمبولات، فيتامين B_{12}، اختبارات ثبات، فيتامين B_1

Stability Evaluation of Mixed B Complex Ampoules In comparison With Separated B12 And (B1, B6) Ampoules

Abstract

Pharmaceutical dosage forms of water-soluble vitamins are considered among the most unstable forms, they are very sensitive to a variety of factors including light, heat, moisture, oxidizing and reducing agents, acids and bases.

Many studies indicate poor stability of vitamin B_{12} in aqueous solutions, due to its photolability and sensitivity to the presence of some vitamins, especially vitamin B_1.

In the Syrian market, there are two types of ampoules containing vitamin B_{12}. The first contains B_{12} in combination with vitamin B_1

and B_6 mixed in one ampoule (mixed), And the second contains B_{12} in a separate ampoule and both B_1, B_6 in another one.

This research includes collecting samples of ampoules of both types and comparing their stability by performing accelerated stability tests at $30°$ and $40°$ c, and in comparison with ideal storage temperature in the refrigerator $2°-8°$ for 3 months.

The results showed that B_{12} values were within acceptable limits in mixed ampoules at $40°$ in the second month, while the B_{12} concentration decreased from initial values at $30°$C but remained within the acceptable limits. Additionally, the samples stored in the refrigerator stayed within the permissible limits until the end of the storage period. As for the separated ampoules, they showed that vitamin B_{12} was stabile in all preparations and at all storage temperatures until the end of the storage period.

This highlights the superiority of the separated ampoules in terms of vitamin B_{12} stability, And the necessity to store mixed ampoules in the refrigerator.

Key words: drug quality, ampoules, vitamin B_{12}, stability tests, vitamin B_1.

- **المقدمة:**

تعرّف الثباتية الدوائية بأنها الحفاظ على جودة المستحضر الدوائي مع تقدم الزمن وعدم حدوث تغيير نتيجة تأثير العوامل البيئية المختلفة، وتقاس الثباتية بسرعة وحجم التبدلات التي تطرأ على المستحضر، حيث تُعتبَر من معالم الجودة المهمة للحفاظ على فعالية وأمان الدواء وعدم حدوث تغير في جودة المستحضر أو المادة الدوائية مع تقدم الزمن. [1]

أما دراسات الثبات فهي مجموعة معقدة من الإجراءات التي تتطلب التكلفة الكبيرة والخبرة العلمية إضافة لاستهلاك الوقت من أجل ضمان جودة وفعالية وأمان الدواء خلال فترة صلاحيته.[2] تكمن أهميتها في التحقق من عدم حصول تغيرات في الصيغة المسوقة أو دراسة إمكانية تأثر الثبات بعمليات التصنيع، وتأكيد العمر على الرف المقترح، وتحديد شروط التخزين المثالية.[1]

يتعلّق ثبات المستحضرات بالاختيار الصحيح لصيغة التحضير والسواغات والمواد الحافظة ومواد التعبئة والتغليف كما أن تخزين المستحضرات خلال عمر الاستخدام ضمن شروط غير مناسبة مثل الحرارة، الرطوبة والضوء تؤثر على الثبات الفيزيائي والكيميائي والميكروبيولوجي وتقلل من فترة صلاحية المستحضر.[3]

تعرّف اختبارات الثبات المسرّعة Accelerated tests بأنها اختبارات تجرى بحسب برنامج زمني لا يتجاوز عادة ستة أشهر، حيث توضع عينات الاختبار ضمن حاضنات (incubators) مخصصة لهذا الشأن ومبرمجة لعاملي الحرارة والرطوبة النسبية بشكل خاص، ثم يجرى اختبار ثباتها دورياً، وذلك عند الزمن صفر ثم اختبار كل شهر.

يتم اختيار درجة الحرارة ٤٠°م ورطوبة نسبية ٧٥% لمعظم الأدوية المعروف ثباتها، ويمكن اختيار شروط إضافية أشد أو أضعف قليلاً تبعاً للمعلومات المتوفرة عن ثبات المادة الدوائية أو المستحضر.[1]

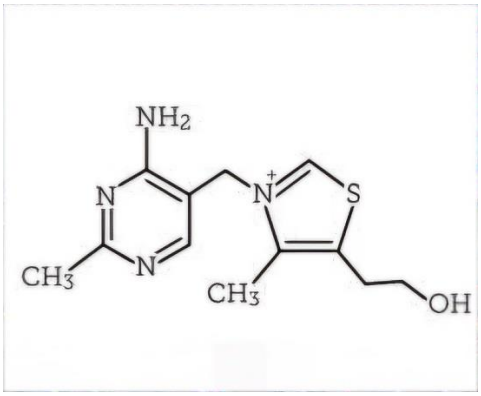
تعتبر الأشكال الصيدلانية للفيتامينات المنحلة في الماء من أكثر الأشكال قليلة الثبات والحساسة للعديد من العوامل مثل الضوء والحرارة والرطوبة والعوامل المؤكسدة والمرجعة والحموض والأسس، وتشكل صياغة هذه الفيتامينات في مستحضرات مشتركة تحدياً كبيراً للمصنعين وذلك بسبب اختلاف ثباتيتها ودرجة الحموضة المثالية لكل منها والتداخل الذي قد يظهر بينها.[4]

تقسم الفيتامينات من حيث الثباتية إلى مجموعتين: الأولى ثابتة نسبياً حيث لا توجد مشاكل واضحة تتعلق بثباتيتها في الأشكال الصيدلانية التي تحويها، وتتضمن (فيتامين D، فيتامين E، فيتامين B7، فيتامين B3، فيتامين B6، فيتامين B2).

المجموعة الثانية: والتي غالباً ما تظهر مشاكل في ثباتيتها في الأشكال الصيدلانية هي (فيتامين A، فيتامين K، فيتامين C، فيتامين B12، فيتامين B9، فيتامين B5، فيتامين B1). [5]

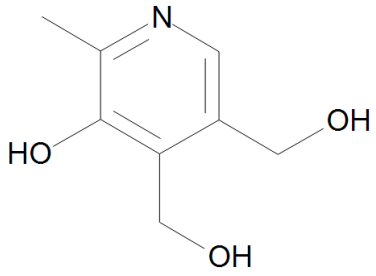
- **التيامين أو فيتامين B1**: هو مسحوق بلوري أبيض أو مائل للبياض منحل في الماء لا ينحل في المذيبات غير القطبية، درجة الحموضة المفضلة لثبات محضراته الحقنية (٢,٥ – ٤,٥) [6]. يعمل كتميم للأنزيمات التي تستقلب الكربوهيدرات (نازعات الهيدروجين). [7]

التيامين حساس جداً للأكسدة والحرارة والإشعاع ثابت في الوسط الحمضي غير ثابت في الوسط القلوي. وعند تعرضه لأحد هذه الشروط غالباً ما ينشطر إلى حلقتي البيريميدين والثيازول المشكلتين له (الشكل ١)، حيث تملك الأخيرة بعض الخواص الإرجاعية. [8]



الشكل (١): الصيغة الكيميائية للتيامين أو فيتامين B1

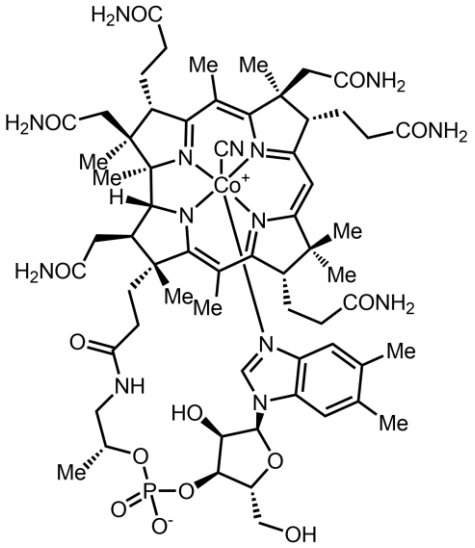
❖ **البيريدوكسين أو فيتامين B6:** مسحوق بلوري أبيض أو مائل للبياض ذواب بحرية في الماء وذواب بشكل قليل في الكحول، درجة الحموضة المفضلة لثبات محضراته الحقنية (٢-٣,٨). [6] غير ثابت عند التعرض للضوء في الوسط المعتدل والقلوي ثابت نسبيا في الحرارة [5] يعمل كتميم انزيم بشكل رئيسي للأنزيمات ناقلة الأمين وبالتالي في تصنيع البروتينات ويساهم في تشكيل النواقل العصبية.[9] و يبين الشكل (٢) صيغة هذا المركب.



الشكل (٢): الصيغة الكيميائية للبيريدوكسين أو فيتامين B6

❖ **الفيتامين B12 أو السيانوكوبالامين:** مسحوق بلوري ذو لون احمر غامق منحل في الماء والكحول غير ذواب عملياً في الاسيتون، درجة الحموضة المفضلة لثباته في الأمبولات (٤,٥ – ٧). [6] يعمل كتميم أنزيم في تفاعلات تشكيل النكليوتيدات البورينية و من ثم تصنيع DNA. [10]

حساس جداً للضوء والعوامل المرجعة والمؤكسدة وتغييرات pH، يتعرض للعديد من تفاعلات التخرب ويعزى ذلك إلى بنيته المعقدة واحتوائه على العديد من المجموعات الوظيفية. كما هو موضح في الشكل (٣).



الشكل (٣): الصيغة الكيميائية للسيانوكوبالامين أو فيتامين B12

من أهم تفاعلات التخرب التي يتعرض لها:

- تخرب ضوئي للرابطة CN–CO
- إرجاع الكوبالت
- إزالة الأميد من السلاسل الجانبية
- حلمهة الرابطة الفوسفورية في الجزء النكليوتيدي. [11]

وأغلب هذه التفاعلات تؤدي بالمحصلة إلى فقدان الفعالية الحيوية للفيتامين B12 أو تشكيل مركبات سامة خلوياً. [12]

تتعلق ثباتية الفيتامين B12 تتعلق بالعديد من العوامل مثل وجود الفيتامينات الأخرى المنحلة في الماء معه، حيث أن وجود الفيتامين C يؤدي إلى إرجاع السيانوكوبالامين إلى الهيدروكسوكوبالامين الذي قد يتأكسد إلى منتجات أكسدة غير عكوسة. [13] و تحفز الفيتامينات B3 و B2 التخرب الضوئي للفيتامين B12. [14] [15]

و فيما يخص الفيتامين B1 فأشارت الدراسات إلى كون منتوجات تخربه وخصوصاً حلقة الثيازول تزيد من تخرب الفيتامين B12 وذلك بوجود الحرارة المرتفعة التي تساهم في تخرب الفيتامين B1. [16]

تساهم أيضاً درجة الحموضة بشكل كبير في ثباتية الفيتامين B12 بسبب كونه حساس جداً للحلمهة الحمضية أو القلوية، وذلك في درجات الحموضة المنخفضة أقل من ٣ أو شديدة القلوية. [17]

وأخيراً يكون تأثير درجة الحرارة واضح جداً في المحاليل المائية للفيتامين B12، كما تم ذكره في عدة دراسات حيث يتخرب المحلول المائي الفيتامين B12 بعد 24 ساعة من التعرض لدرجة حرارة 60° مئوية [18]. وتبين أن تخرب الفيتامين B12 يتبع للدرجة الأولى. بينما لوحظت الثباتية القصوى عند 4° مئوية. [19]

- **هدف البحث:**

تهدف هذه الدراسة إلى المقارنة بين الشركات الوطنية المصنعة للأمبولات المختلطة والمنفصلة لمعرفة تأثير خلط الأمبولات على الثباتية وذلك بسبب حساسية الفيتامين B_{12} الكبيرة لمختلف العوامل المذكورة، وعدم وجود دراسات كافية عن ثباتية الأمبولات بنوعيها المختلط و المنفصل. وأيضاً إلى تحديد مدى تأثير شروط الحفظ والتخزين خلال عمر الرف على ثباتية الأمبولات وذلك بتطبيق درجات حرارة مختلفة، وذلك نظراً لعدم التقيد

بشروط الحفظ المثالية للأمبولات في الصيدليات بسبب الظروف الحالية و عدم توفر التيار الكهربائي بشكل دائم.

- **المواد والطرائق:**
- **المواد:**

١. ماء مقطر (Water grade HPLC)
٢. حمض خل ثلجي 99.7 % Carlo Ebra, Italy
٣. هيدروكسيد الصوديوم 1N Sisco Research Laboratories,India (SRL)
٤. ميتانول Alpha Chemika,India
٥. سيانوكوبالامين (95,65 %) Yuxing Biotechnology,china
٦. تيامين هيدروكلورايد (96,06 %) Sino-Kemmed,china
٧. بيريدوكسين هيدروكلورايد (100,05 %) Sino-Kemmed,china

- **الأجهزة:**

١. جهاز HPLC نوع Shimadzu prominence-i
٢. ميزان إلكتروني حساس Sartorius CPA225D
٣. حمام الأمواج الصوتية Skymen Ultrasonic Cleaner 040S
٤. جهاز pH Meter نوع SARTORIUS PB_11
٥. مراشح ميكرونية قياس 0.45 µm / Membrane solutions
٦. أدوات زجاجية (بيشر، دوارق حجمية، ممصات عيارية بأحجام مختلفة)
٧. حواضن (incubators) Medenter Einrichtungen GmbH

تم جمع عينات من أمبولات الفيتامينات المتوفرة في السوق المحلية وكانت إحدى العينات تتضمن فيتامين B_{12} بشكل منفصل وفيتامين B_1 وB_6 معاً، وتمّ الترميز لها بالرمز D، بينما تضمنت العينتان A و C الفيتامينات الثلاثة معاً.

تمت مقايسة العينات على أربع مراحل (عند الفتح وبعد شهر، شهرين وثلاثة أشهر) ضمن ثلاثة درجات حرارة (30°, 40°) وفي البراد بدرجة (2-8°) لكل عينة.

تم الحضن في درجات الحرارة المطلوبة بالاستعانة بحاضنة incubator و في البراد، وتمت المقايسة بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا السائلة باستخدام جهاز من نوع Shimadzu prominence-i، بواسطة الطريقة التحليلية المتبعة في مختبرات ميديكو وهي عبارة عن مرحلتين، الأولى فصل B1 و B6 بتمرير الوقاء الأسيتاتي فقط، وعند الانتهاء ننتقل إلى المرحلة الثانية وهي فصل B12 بإضافة الميثانول بنسبة 30% . أُتبعت هذه الطريقة لتحليل جميع العينات (تم التحقق من صلاحيتها مسبقاً) وهي موضحة في الجدول (1).

الجدول (1): طريقة المقايسة المتبعة

العمود المستخدم	Inertsil ODS-3(250×4.6) mm, 5µm
الطور المتحرك	بالنسبة لـ B_1 و B_6 : وقاء أسيتاتي pH=3.4 بالنسبة لـ B_{12}: ميثانول : وقاء أسيتاتي pH=3.4 30 : 70
طول موجة الكشف	بالنسبة لـ B_1 و B_6 : 280 nm بالنسبة لـ B_{12}: 385 nm

معدل التدفق	1.5 ml/min
حجم الحقنة	20 µL
درجة الحرارة	25°

كما تم إجراء ملائمة للنظام للطريقة التحليلية المتبعة قبل استخدامها في المقايسة، وذلك من خلال تكرار حقن الشاهد ثلاثة مرات وحساب قيم RSD%، وبعد إتمام المقايسة عند الأشهر الثلاث، تمت مقارنة النتائج مع الحدود الدستورية ومعالجتها إحصائياً بواسطة برنامج SPSS ومناقشتها لمعرفة تأثير كل من مزج الفيتامينات ودرجة الحرارة على ثباتها.

الفحوص العيانية (الظاهرية):

تم فحص المظهر الخارجي للعينات عند الفتح وبعد الحضن في درجات حرارة مختلفة، وملاحظة التغيرات الحاصلة في المظهر الخارجي من لون و رائحة و ذلك بعد إفراغ محتواها في بيشر و مقارنتها مع الشاهد.

اختبار درجة الحموضة:

تم قياس درجات الحموضة للعينات عند الفتح و في نهاية كل شهر من الحفظ باستخدام جهاز SARTORIUS PB_11، وذلك بغمس المسرى مباشرةً ضمن العينة بعد إفراغ محتواها في بيشر، وتم تسجيل النتائج ومناقشتها

الاختبارات الإحصائية:

تم الاستعانة ببرنامج SPSS لإجراء الاختبارات الإحصائية المساعدة في تفسير النتائج، حيث تم إجراء اختبار بيرسون لتحري وجود علاقة أو ارتباط بين درجة حرارة الحفظ وتركيز الفيتامينات في كل من الأمبولات المنفصلة والمختلطة، كما تم دراسة احتمالية وجود علاقة بين تركيز $Vit\ B_1$ و $Vit\ B_{12}$ في الأمبولات المختلطة بواسطة اختبار بيرسون أيضاً.

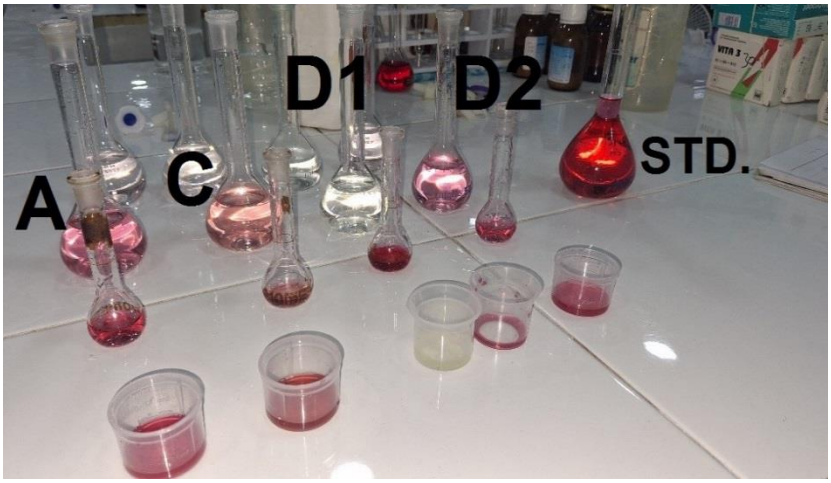
١. النتائج والمناقشة:

نتائج الفحوص الظاهرية :

عند الفتح كانت جميع العينات المختلطة تبدو بلون أحمر قاني. وكذلك بالنسبة إلى عينات B12 الخاصة بالعينات المنفصلة. أما عينات (B1, B6) فكانت بلون أصفر شفاف.

وبعد الحضن بدرجات حرارة °30 و °40كان هناك تفاوت في ألوان العينات، حيث كانت العينات المختلطة تميل للون البني مع وجود رائحة تزنخ، وقد يعود ذلك غالباً إلى إرجاع ذرة الكوبالت، حيث أشارت بعض الدراسات إلى ملاحظة تغير اللون إلى اللون البني عند إرجاع الكوبالت من التكافؤ الثلاثي إلى التكافؤ الثنائي. [20]، بينما لم يظهر أي تغير على الأمبولات المنفصلة بنوعيهاز

ويوضح ذلك في الأشكال ٤ و٥.

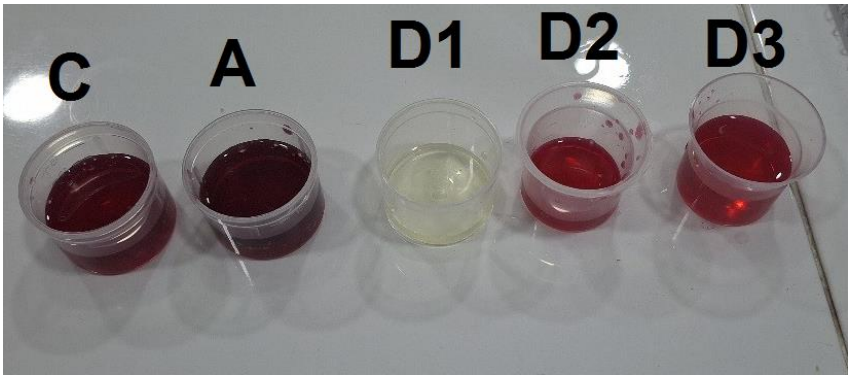


الشكل (4): التفاوت في ألوان العينات بعد شهرين من الحضن بدرجة حرارة 40°C

حيث A و C العينات المختلطة

و D1 هي (B1 و B6) من العينة المنفصلة ، و D2 هي B12 من العينة المنفصلة ،

و .STD هو الشاهد للفيتامينات الثلاثة



الشكل (5): المظهر الخارجي للعينات بعد الحضن بدرجات حرارة 40°C لمدة ثلاثة أشهر

حيث A و C العينات المختلطة و D1 هي (B1 و B6) من العينة المنفصلة

و D2 هي B12 من العينة المنفصلة

و D3 بعد مزج D1+D2

نتائج ملاءمة النظام: يوضح الجدول (2) نتائج ملاءمة النظام للطريقة التحليلية المتبعة، ونلاحظ أن قيم %RSD للمساحات تحت المنحني الناتجة أقل من 2%.

الجدول (2): نتائج ملاءمة النظام

الشاهد المحقون	B_1	B_6	B_{12}
AUC للتكرار الأول	2344897	5264417	329291
AUC للتكرار الثاني	2328555	5245205	329767
AUC للتكرار الثالث	2321931	5242298	329963
المتوسط الحسابي	2331797	5250640	329673.3
SD	11820.71	12019.4	345.167
RSD%	0.507	0.229	0.105

نتائج مقايسة الأمبولات المنفصلة: يوضح الجدول (3) نتائج مقايسة الفيتامينات في أمبولات الشركة D (التي تحتوي على الفيتامينات بشكل منفصل).

الجدول (3): نتائج مقايسة أمبولات الشركة D (المنفصلة)

درجة الحرارة	في البراد			30°C			40°C		
%عند الفتح	94.47	100.30	99.87	94.47	100.30	99.87	94.47	100.30	99.87
%بعد شهر	92.82	99.58	97.97	89.12	95.78	108.97	89.15	95.93	102.55

%بعد شهرين	91.79	95.68	94.48	93.79	98.93	89.84	92.1	98.55	97.86
%بعد ثلاثة أشهر	92.33	98.69	90.76	89.88	96.74	89.67	85.81	95.02	91.87

نلاحظ من الجدول (3) عدم ظهور انخفاض كبير في تراكيز أي من الفيتامينات وبقاء التراكيز ضمن الحدود الدستورية، لكن نلاحظ انخفاض تركيز فيتامين B12 عند درجة ٤٠ وظهور قمم إضافية ضمن الكروماتوغرام من المحتمل أنها عائدة لنواتج التخرب كما في الشكل(٧-٨)وعند دراسة العلاقة الإحصائية بين تركيز فيتامين B_{12} (كونه الأكثر حساسية للتخرب) ودرجة الحرارة بواسطة اختبار بيرسون، تبين أن العلاقة ضعيفة وغير معنوية كما هو موضح في الشكل (6).

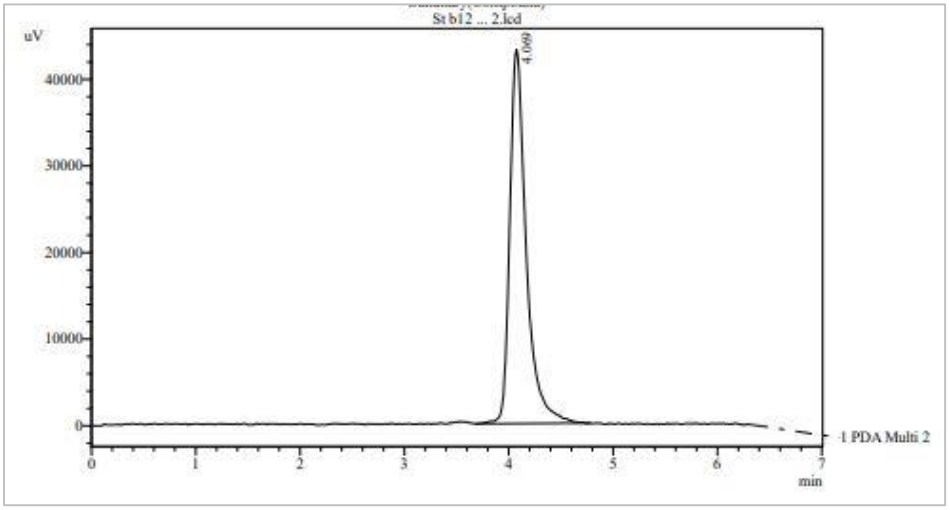
Correlations

Correlations

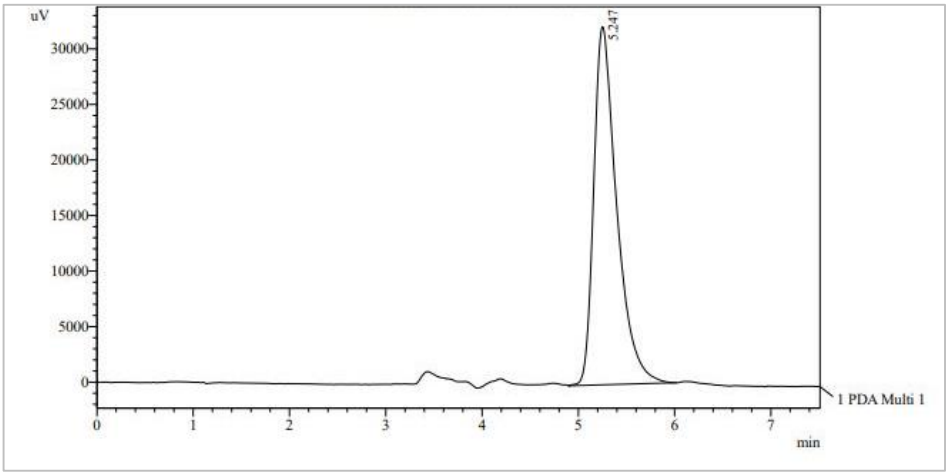
		temp	conc
temp	Pearson Correlation	1	.199
	Sig. (2-tailed)		.607
	N	9	9
conc	Pearson Correlation	.199	1
	Sig. (2-tailed)	.607	
	N	9	9

الشكل (6): نتائج الاختبار الإحصائي للعيّنة

وتبين الأشكال(7,8) بعض الكروماتوغرامات العائدة للشركة D.



الشكل (7): كروماتوغرام شاهد $Vit\ B_{12}$



الشكل (8): كروماتوغرام $Vit\ B_{12}$ للشركة D بعد شهر من الحفظ في درجة حرارة 40°C

نتائج مقايسة الأمبولات المختلطة: توضح الجداول (4,5) نتائج مقايسة الفيتامينات خلال الأشهر الثلاث في أمبولات كل من الشركة A و C (التي تحتوي على الفيتامينات الثلاثة في أمبولة واحدة).

الجدول (4): نتائج مقايسة أمبولات الشركة A (المختلطة)

درجة الحرارة	في البراد			30°C			40°C		
%عند الفتح	94.15	98.57	117.12	94.15	98.57	117.12	94.15	98.57	117.12
%بعد شهر	95.75	101.49	99.63	94.51	101.80	81.71	91.94	98.78	106.12
%بعد شهرين	98.03	101.05	91.11	96.43	100.6	97.04	93.24	99.61	54.69
%بعد ثلاثة أشهر	95.68	100.43	94.74	90.03	98.11	102.46	82.49	95.25	45.26

الجدول (5): نتائج مقايسة أمبولات الشركة C (المختلطة)

درجة الحرارة	**في البراد**			**30°C**			**40°C**		
الفيتامين	B_1	B_6	B_{12}	B_1	B_6	B_{12}	B_1	B_6	B_{12}

%عند الفتح	108.73	113.45	148.24	108.73	113.45	148.24	108.73	113.45	148.24
%بعد شهر	108.86	114.22	116.33	99.34	110.16	131.27	95.93	102.44	105.15
%بعد شهرين	111.81	114.27	112.19	110.22	114.25	91.11	106.17	114.17	87.29
%بعد ثلاثة أشهر	109.34	113.95	113.42	105.53	114.43	102.68	98.69	113.4	74.25

وعند إجراء اختبار بيرسون الإحصائي لدراسة العلاقة بين درجة حرارة الحفظ وتركيز الفيتامين B_{12} في الأمبولات المختلطة، تبين وجود علاقة عكسية متوسطة ومعنوية، أي بازدياد درجة حرارة الحفظ يتناقص تركيز الفيتامين B_{12}، كما هو موضح في الشكل (9).

Correlations

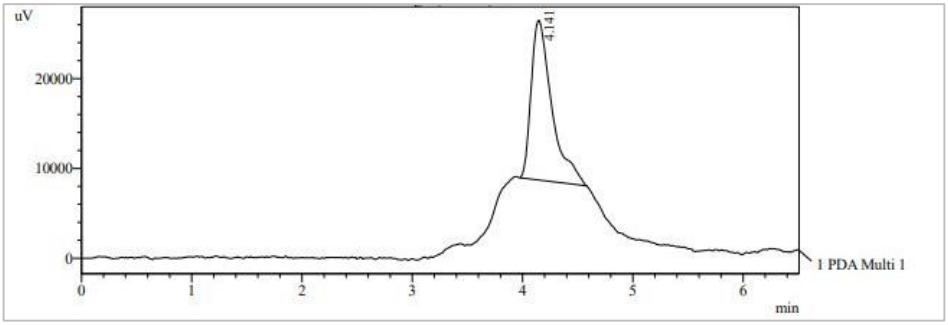
Correlations

		b12	temp
b12	Pearson Correlation	1	-.494-*
	Sig. (2-tailed)		.037
	N	20	18
temp	Pearson Correlation	-.494-*	1
	Sig. (2-tailed)	.037	
	N	18	18

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

الشكل (9): نتائج اختبار بيرسون الإحصائي للأمبولات المختلطة

يوضح الشكل (10) التخرب الكبير الحاصل في فيتامين B_{12} في الأمبولات المختلطة العائدة للشركة A، وذلك بعد ثلاثة أشهر من الحفظ في درجة حرارة 40°C.



الشكل (10): كروماتوغرام B_{12} Vit للشركة A بعد ٣ أشهر من الحفظ في درجة حرارة 40°C

ولمعرفة تأثير الخلط على التخرب تم دراسة العلاقة بين تركيز الفيتامين B_1 وتركيز الفيتامين B_{12} في الأمبولات المختلطة بواسطة اختبار بيرسون، فتبين وجود علاقة طردية متوسطة، أي بانخفاض تراكيز فيتامين B_1 تنخفض تراكيز الفيتامين B_{12}، حيث أشارات عدة دراسات إلى أن تخرب الفيتامين B12 يحدث عند وجوده مع الفيتامين B1 في درجة حرارة مرتفعة و ذلك غالباً بسبب منتجات تخربه ، و بشكل أساسي 4-Methyl 5(hydroxyethyl)thiazole ذو الخواص الإرجاعية [16] ، الذي من الممكن أنه يقوم بإرجاع ذرة الكوبالت ذات التكافؤ الثلاثي الموجودة في السيانوكوبالامين إلى التكافؤ الثنائي.[10]

ويتم ذلك بوجود الحرارة، حيث نلاحظ أن الأمبولات المختلطة المحفوظة في البراد لم تظهر تخرب واضح للفيتامينات، و هذا يتوافق مع الدراسات التي أظهرت تأثير الحرارة و الفيتامين B1 على ثباتية الفيتامين B12. [21]

كما نلاحظ الثبات الكبير لفيتامين B_6 في مختلف العينات والشروط.

نتائج قياس درجة الحموضة : تم قياس درجات الحموضة للعينات عند الفتح و في نهاية كل شهر باستخدام جهاز SARTORIUS PB_11 و كانت النتائج كما هو موضح في الجداول (6,7,8)

الجدول (6): نتائج درجة الحموضة للشركة A

	عند الفتح	بعد شهر	بعد شهرين	بعد ثلاثة أشهر
في البراد	3.79	3.45	3.7	3.77
في درجة حرارة 30°C	3.79	3.35	3.66	3.67
في درجة حرارة 40°C	3.79	3.38	3.5	3.68

الجدول (7): نتائج درجة الحموضة للشركة C

	عند الفتح	بعد شهر	بعد شهرين	بعد ثلاثة أشهر
في البراد	3.8	3.49	3.74	3.83
في درجة حرارة 30°C	3.8	3.47	3.6	3.75
في درجة حرارة 40°C	3.8	3.49	3.59	3.78

الجدول (8): نتائج درجة الحموضة للشركة D

	عند الفتح	بعد شهر	بعد شهرين	بعد ثلاثة أشهر
في البراد	3	2.86	2.92	3.08
في درجة حرارة 30°C	3	2.88	2.94	3.03
في درجة حرارة 40°C	3	2.99	2.8	2.98

درجة الحموضة الدستورية لأمبولات Vit B_{12} حسب دستور الأدوية الأميريكي هي ضمن المجال (4.5–7)، بينما لا يوجد درجة حموضة دستورية لمزيج الفيتامينات الثلاث.

كانت قيم pH لأمبولات فيتامين B_{12} المنفصلة ضمن المجال (5.09–5.28) وهو ضمن المجال الدستوري، مما يفسر الثبات الأفضل في الأمبولات المنفصلة.

أما في الأمبولات المختلطة، فكانت قيم درجة الحموضة ضمن المجال (2.68–3.8) وهو خارج المجال الدستوري المناسب لثباتية فيتامين B_{12} ، وقد يكون ذلك عامل مساعد في تخرب فيتامين B_{12}. [17]

كما نلاحظ ارتفاع درجة الحموضة بشكل طفيف لا يتجاوز 0.5 بعد حفظ العينات في درجات حرارة 30° و40° وقد يعود ذلك لتشكل الهيدروكسوكوبالامين الذي ينتج بعد إرجاع الكوبالت ثلاثي التكافؤ إلى الكوبالت الثنائي و الذي قد يتأكسد إلى منتجات أكسدة غير عكوسة كما ورد في دراسة Ahmad وزملاؤه. [22]

الخلاصة :

- تؤثر الحرارة سلباً على ثبات B12 و B1 في الأمبولات المختلطة حيث يزداد التخرب بازدياد الحرارة و هو تفاعل معتمد على الزمن والحرارة حيث خرجت قيم B12 للعينات المختلطة المحفوظة بدرجة °40 بعد شهرين بينما بقيت العينات المختلطة المحفوظة في درجة °30 لثلاث أشهر ضمن الحدود الدستورية تقريباً. أما بالنسبة إلى العينات المحفوظة في البراد فقد بقيت جميعها ضمن الحدود الدستورية. بينما حافظت العينات المنفصلة على تركيز B12 ضمن الحد الدستوري حتى بعد الحضن بدرجات C °30 و °40 وبغض النظر عن مدة الحفظ.
- يؤثر B1 سلباً على ثبات B12 حيث يزيد من تخربه ، غالباً بسبب نواتج تخربه الإرجاعية.
- كانت درجة الحموضة للأمبولات المختلطة غير مثالية لحفظ B12 مما قد يكون ساهم في زيادة تخربه.
- كان هناك تفاوت بين شركات الأمبولات المختلطة من حيث التراكيز البدئية ودرجة التخرب.

- **التوصيات:**

١. التأكيد على حفظ الأمبولات المختلطة ضمن البراد وذلك ضمن الصيدلية والمستودع وعند المريض.
٢. يمكن تقصير فترة الصلاحية للأمبولات المختلطة وإضافة تراكيز إضافية من الفيتامينات (متوافقة مع دساتير الأدوية).
٣. عدم استخدام الأمبولات المختلطة في حال حدوث تغيير في لونها أو رائحتها.
٤. إجراء دراسات أكثر عن إمكانية زيادة ثباتية الأمبولات المختلطة.
٥. إجراء المزيد من الدراسات لمعرفة ماهية نواتج التخرب وتأثيراتها الحيوية.
٦. تفعيل دور الرقابة الدوائية لتقييم جودة جميع المستحضرات الدوائية.

- **المراجع:**

1. ALMARDINI M, 2014-Quality Control Book. Damascus University- Syria (In Arabic).
2. SAAD N, 2020-Quality evaluation of the locally marketed Tretinoin drugs and monitoring their stability during "in-use shelf-life". Q . Albaath University- Syria (In Arabic).
3. HAMDAN H, 2021-Quality Evaluation of Locally Marketed Dermatological Preparations Contain Fusidic Acid and Monitoring their Stability during "In-Use Shelf-Life. Q . Albaath University- Syria (In Arabic).
4. VORA A, PATEL P, 2022- A REVIEW ON VITAMINS: IT'S BIOLOGICAL ROLE AND DEFICIENCIES IN HUMANS. VIDYA - A JOURNAL OF GUJARAT UNIVERSITY. Vol. 1. 70-75.
5. ELMER D, 1982- Vitamins in Pharmaceutical Formulations, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 71. 1073-1096
6. USP 36-NF 31 ;United States Pharmacopeia: National Formulary, 2013
7. EWA N, 2023- Thiamine: overview of history of discovery, mechanism of action, role and deficiency, Prospects in Pharmaceutical Sciences, Vol. 21. 15-21.
8. BASANT K, Roy A, 1973- Chemistry of thiamine degradation on food products and model systems. Review Journal of Agricultural and Food Chemistry , Vol. 21. 54-60
9. PARRA M, STAHL S, HELLMAN H, 2018- Vitamin B_6 and Its Role in Cell Metabolism and Physiology, Cells, Vol 22;7(7):84.

10. MUTTI E, 2015- Vitamin B12: Chemical aspects, transport, cause and symptoms of deficiency, dietary sources, and health benefits.
11. NEIMAN A, LAZEREVA N, 1995- Analytical methods for control of cyanocobalamin quality and its stability in drug dosage forms (review), Pharm Chem J Vol.29. 722–731
12. KRAULTER B, 2015- Antivitamins B12--A Structure- and Reactivity-Based Concept, Chemistry
13. AHMAD I, QADEER K, ZAHID S, 2014- Effect of ascorbic acid on the degradation of cyanocobalamin and hydroxocobalamin in aqueous solution: a kinetic study. AAPS Pharmscitech. Vol. 15(5). 1324-1333.
14. IQPAL S, KIRAN Q, 2012- Effect of Riboflavin on the Photolysis of Cyanocobolamin in Aqueous Solution, The Open Analytical Chemistry Journal, Vol. 6. 22-27.
15. AHMAD I, ANSARI A, ISMAIL T, 2003- Effect of nicotinamide on the photolysis of cyanocobalamin in aqueous solution, J Pharm Biomed Anal, Vol. 31(2):369-74.
16. BEATA A,THOMAS J, Effect of Thiamine Hydrochloride on the Stability of Solutions of Crystalline Vitamin B12, 1955- Journal of the American Pharmaceutical Association, Vol. 44(11) 662-665,
17. COMBS GF, 2008- Chemical and Physiological Properties of Vitamins, The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 503–514.
18. TEMOVA R, GEREMIA S, 2023- Vitamin B12 in Foods, Food Supplements, and Medicines—A Review of Its Role and Properties with a Focus on Its Stability, Molecules , Vol.28. 240.

19. BAJAJ R, SINGHAL R, 2020- Degradation kinetics of vitamin B12 in model systems of different pH and extrapolation to carrot and lime juices, Journal of Food Engineering, Vol. 272

20. HADINATE LA, CHANDRA VM, ARKOT J, 2020- Sorbitol enhances the physicochemical stability of B12 vitamers, Int J Vitam Nutr Res, Vol. 90(5-6):439-447

21. MONAJJEMZADEH F, EBRAHIMI F, ZAKERIMELANI P, VALIZADEH H, 2014- Effects of formulation variables and storage conditions on light protected vitamin B12 mixed parenteral formulations, Advanced Pharmaceutical Bulletin, Vol. 4(4):329-338.

22. AHMAD I, WAQAR H, 1993- Stability of cyanocobalamin in parenteral preparations, *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* , Vol. 6. 53-9 .