تطوير مسرى معجونة الكربون المعدلة كيميائياً بمعقد الزوج الأيوني لتحديد ميكوفينولات موفيتيل في المستحضرات الصيدلانية

اعداد الطالب: احمد النقري اشراف: أ.د.محمد جمال الخطيب ، د.هزار القصير

الملخص

يهدف هذا البحث إلى تطوير مسرى معجونة كربون معدل كيميائياً بمعقد الزوج الأيوني المتشكل بين ميكوفينولات موفيتيل(MPM) وكاشف رينكات الأمونيوم، واستخدامه في التحديد الكمي المباشر للمادة الدوائية في صورتها النقية وفي مستحضراتها الصيدلانية بطريقة كمونية.

حُضر المسرى بإدماج معقد الزوج الأيوني بوصفه المادة الفعالة كهروكيميائياً ضمن معجونة كربون مؤلفة من 46% مسحوق غرافيت و 46% من ثنائي أوكتيل فتالات (DOPH) و8% من معقد الزوج الأيوني. أظهر المسرى المحضر استجابة نرنستية قريبة من النظرية ضمن المجال الخطي 3630–0.119 µM، وبميل مقداره 58.71 mV/decade، وحد كشف مقداره 0.0758 µM، وزمن استجابة يقارب 20s، وثباتاً في الاستجابة ضمن مجال pH من 1.83 إلى 6.35، مع استقرار تشغيلي جيد لمدة تصل إلى 40 يوماً. أظهرت دراسة الانتقائية قدرة المسرى على التمييز بين ميكوفينولات موفيتيل وعدد من الأيونات الشائعة والسواغات والمواد الحافظة المستخدمة في المستحضرات الصيدلانية. وطُبقت الطريقة المقترحة بنجاح في تقدير ميكوفينولات موفيتيل في المستحضرات الصيدلانية، وأظهرت النتائج دقة وصحة واسترجاعية مرضية، إلى جانب بساطة الإجراء وسرعة التنفيذ وانخفاض التكلفة، مما يدعم ملاءمة الطريقة للاستخدام في مختبرات الرقابة الدوائية.

الكلمات المفتاحية: ميكوفينولات موفيتيل، مسرى معجونة الكربون، معقد الزوج الأيوني، رينكات الأمونيوم، الطريقة الكمونية.

Development of a Chemically Modified Carbon Paste Electrode Based on an Ion Pair Complex for the Quantitative Determination of Mycophenolate Mofetil in Pharmaceutical Formulations

Prepared by the student:Ahmad Alnoukari

Supervised by: Prof.Dr.Mohammed Jamal Alkhatib,

Dr.Hazar Alksair

ABSTRACT

A chemically modified carbon paste electrode based on an ion-pair complex was successfully developed for the potentiometric determination of mycophenolate mofetil (MPM) in its pure form and pharmaceutical formulations. The proposed sensor was fabricated using an ion-pair complex formed between mycophenolate mofetil and ammonium reineckate as the electroactive sensing material incorporated into a carbon paste matrix. The electrode composition consisting of 46% graphite powder, 46% dioctyl phthalate (DOPH), and 8% ion-pair complex exhibited the optimum analytical performance.

Under the optimized experimental conditions, the proposed electrode exhibited a near-Nernstian slope of 58.71mV per decade over a linear concentration range of 0.119–3630μM, with a low detection limit of 0.0758 μM. The sensor demonstrated a rapid response time of approximately 20s, stable potential response within the pH range of 1.83–6.35, and satisfactory operational stability for up to 40 days. The selectivity studies confirmed excellent discrimination of the proposed sensor against various inorganic ions, pharmaceutical excipients, and preservatives, indicating its high selectivity toward mycophenolate mofetil. The developed electrode was successfully applied to the determination of mycophenolate mofetil in pharmaceutical formulations, providing satisfactory accuracy, precision, and recovery values.

The proposed potentiometric method offers a simple, rapid, sensitive, and cost-effective analytical approach for the routine quality control of mycophenolate mofetil in pharmaceutical preparations and represents a practical alternative to more sophisticated instrumental techniques.

Keywords: Mycophenolate mofetil, Carbon paste electrode, Ion-pair complex, Ammonium reineckate, Potentiometric method

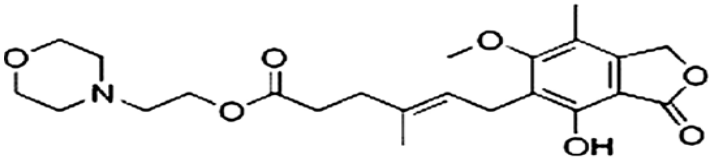
مقدمة:

يُعد ميكوفينولات موفيتيل أحد الأدوية المثبطة للمناعة واسعة الاستخدام في الممارسة السريرية، إذ يُستخدم بصورة رئيسة للوقاية من رفض الأعضاء المزروعة، كما يدخل في علاج عدد من الأمراض المناعية الذاتية. ويُعد هذا المركب طليعة دوائية (Prodrug) تتحول داخل الجسم إلى حمض الميكوفينوليك، وهو الشكل الدوائي الفعال المسؤول عن تثبيط إنزيم نازعة هيدروجين أحادي فوسفات الإينوزين (IMPDH)، مما يؤدي إلى تثبيط تكاثر الخلايا اللمفاوية التائية (T-cells) والبائية (B-cells)، وبالتالي إضعاف الاستجابة المناعية.

ونظراً للأهمية العلاجية لهذا الدواء، تبرز الحاجة إلى تطوير طرائق تحليلية دقيقة وحساسة تتيح تقدير تركيزه في المواد الخام والمستحضرات الصيدلانية، بما يضمن مراقبة الجودة والتحقق من مطابقة المنتجات للمواصفات الدوائية المعتمدة [1,2].

ميكوفينولات موفيتيل يرمز له MPM، وصيغته الجزيئية ($C_{23}H_{31}O_7N$)، وكتلته المولية 433.49 g/mol اسمه الكيميائي :

2-morpholinoethyl(E)-6-(1,3-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-methyl-4-hexenoate



شكل رقم (1) الصيغة المفصلة للميكوفينولات موفيتيل

وتُعد الطرائق الكمونية، ولا سيما تلك المعتمدة على المساري المنتقية للأيونات، من البدائل التحليلية الواعدة لما تمتاز به من بساطة التصميم، وسرعة الاستجابة، وانخفاض تكلفة التشغيل، وإمكانية إجراء القياسات بصورة مباشرة دون الحاجة إلى خطوات معالجة معقدة للعينة. كما حظيت مساري معجونة الكربون باهتمام متزايد خلال السنوات الأخيرة نظراً لما تتمتع به من سهولة التحضير، وإمكانية تجديد سطحها، واستقرارها الكيميائي، فضلاً عن قابليتها للتعديل بمواد فعالة كهركيميائياً مما يسهم في تحسين حساسيتها وانتقائيتها تجاه المركبات الدوائية المختلفة [3, 4].

وتعتمد كفاءة هذا النوع من المساري بصورة أساسية على طبيعة المادة الفعالة كهركيميائياً ونوع الملدن المستخدم ونسبتهما في تركيب معجونة الكربون، إذ يسهم اختيار هذين العاملين في تحسين انتقال الأيونات داخل المعجونة، ومن ثم رفع كفاءة الاستجابة الكمونية للمسرى وزيادة مجال تطبيقه التحليلي.

وعلى الرغم من تعدد الدراسات المتعلقة بتحديد ميكوفينولات موفيتيل باستخدام تقنيات تحليلية مختلفة، فإن الدراسات التي تناولت تطوير مساري كهركيميائية تعتمد على معقدات الأزواج الأيونية ما تزال محدودة، الأمر الذي يبرز الحاجة إلى تطوير مسرى يتميز بالحساسية والانتقائية وسهولة التحضير وانخفاض التكلفة، ليكون مناسباً للاستخدام في مختبرات الرقابة الدوائية.

أجريت العديد من الدراسات لتحديد ميكوفينولات موفيتيل (MPM) في الحالة النقية وفي المستحضرات الصيدلانية باستخدام عدد من الطرائق التحليلية المختلفة، ويستعرض هذا العمل بعضاً منها فيما يأتي:

- حُدد MPM في مستحضراته الصيدلانية بالتحليل الطيفي بالمجال فوق البنفسجي UV عند طول الموجة الأعظمي 250nm ضمن المجال الخطي µg/mL (10-50).[5]
- كما حُدد كل من ميكوفينولات موفيتيل(MPM) وحمض الميكوفينوليك(MPA) بالطريقة الطيفية الحركية لمعقد المركب الدوائي مع أيونات الحديد(III) عند pH=4، تحققت علاقة بير– لامبرت ضمن المجال الخطيµg/mL(50-250), µg/mL(10-200) لكل من MPM, MPA على الترتيب، وحد كشف µg/mL(1.62,4.88) على الترتيب [6].
- وقُدر MPM في البلازما باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء باستخدام طور متحرك مؤلف من (حمض الفورميك: الميتانول) بنسبة (80:20 v/v) وطور ثابت عمود C18 وباستخدام كاشف مطياف الكتلة، حيث كان المجال الخطي: pg/mL (40.2-4986.0) [7].
- كما استخدمت طريقة HPLC لتحديد MPM في المستحضرات الصيدلانية، حيث استخدم طور متحرك مؤلف من (الميتانول: الماء) بنسبة (25:75 v/v)، والطور الثابت المستخدم عمود C18، واستخدم كاشف UV عند طول موجة 250nm، حيث كان المجال الخطي µg/mL (0.1-10.0)، وحد الكشف 3.660 ng/mL [8].
- اقترحت طريقة كروماتوغرافيا السائلة معكوسة الأطوار(RP-HPLC) لتحديد MPM في المستحضرات الصيدلانية باستخدام عمود C18 عند طول الموجة 250nm وطور متحرك مؤلف من (اسيتونتريل: واقي فوسفاتي: ميتانول)، حيث كان المجال الخطي µg/mL (2-7).[9]
- كما حُدد كل من MPM و MPA في عينات البلازما والبول باستخدام الطريقة الفولط أمبيرومترية النبضية التفاضلية (DPV) باستخدام مسرى الكربون الزجاجي المعدل بأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدران

MWCNTs/GCE، حيث أظهر MPM قمتي أكسدة عند قيمتي الكمون V(1.1 ;0.87) بينما أظهر MPA قمة أكسدة واحدة عند الكمون 0.87V، وكان الكهرليت المستخدم: محلول واقي فوسفاتي pH=5، أظهر المسرى استجابة خطية MPM ضمن المجال M$(5.0 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-4})$ وبحد كشف M9.0×10^{-7}، أما المجال الخطي لـ MPA فكان M$(2.5 \times 10^{-6} - 6.0 \times 10^{-5})$ وبحد كشف M4.0×10^{-7} [10].

- وأيضا حُدد MPM بالطريقة الفولط أمبيرومترية ذات الموجة المربعة (SWV) باستخدام مسرى معجونة الكربون المعدل بأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدران MWCNTs/CPE، امتد المجال الخطي ما بين (9.9nM-87µM) وكان حد الكشف 7.0nM حيث أبدت الطريقة انتقائية وحساسية عاليتين تجاه MPM في عينات السوائل البيولوجية [11] .
- كما تم التحديد المتزامن لكل من التاكروليمس وميكوفينولات موفيتيل بالطريقة الفولط أمبيرومترية. حيث حضر المسرى بطريقة البلمرة الكهربائية لأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدران مع الإطار العضوي Cu-1N-allyl-2-(2,5-dimethoxyphenyl)-4,5-diphenyl-1H-imidazole

وامتد المجال الخطي ما بين $(0.85 - 155) \times 10^{-8} M$ و$(1.1 - 170.0) \times 10^{-8} M$ لكل من MPM وTAC على الترتيب وكان حد الكشف $0.28 \times 10^{-8} M$ و 0.36×10^{-8} لكل من MPM وTACعلى الترتيب [12].

أهمية البحث وأهدافه:

يهدف هذا البحث إلى تطوير مسرى معجونة الكربون المعدل كيميائياً بمعقد الزوج الأيوني المتشكل بين ميكوفينولات موفيتيل ورينكات الأمونيوم، ودراسة خصائصه الكهروكيميائية، وتقييم أدائه التحليلي من حيث المجال الخطي، وحد الكشف، وزمن الاستجابة، ومجال pH، وعمر المسرى، والانتقائية، والدقة، والصحة، ومن ثم تطبيقه في تقدير ميكوفينولات موفيتيل في المستحضرات الصيدلانية، بهدف توفير طريقة تحليلية بسيطة ودقيقة ومنخفضة التكلفة يمكن اعتمادها في تطبيقات الرقابة الدوائية.

مواد وطرائق البحث:

الأجهزة:

استخدم مقياس كمون رقمي من شركة Sanwal نموذج DT9201A، ومقياس pH/mV/ºC نوع Orion أمريكي الصنع طراز 250A. واستخدم مسرى الكالوميل كمسرى مقارن (SCE).



الشكل(2) مقياس كمون رقمي من شركة Sanwal نموذج DT9201A

المواد الكيميائية والصيدلانية:

كانت جميع المواد المستخدمة ذات درجة تحليلية عالية النقاوة. واستخدم الماء ثنائي التقطير في جميع التحضيرات. لتحضير معجونة الكربون، استخدم فحم غرافيتي عالي النقاوة من شركة Aldrich، إضافةً إلى عدد من الملدنات منها: ثنائي أوكتيل فتالات (DOPH) بنقاوة 99.5%، ثنائي بوتيل فتالات (DBPH) بنقاوة 99%، وزيت البارافين Paraffin Oil من شركتي BDH و Fluka. كما استُخدم لتحضير معقد الزوج الأيوني كاشف رينكات الأمونيوم(R.A) $[NH_4(Cr(NH_3)_2(SCN)_4]$ بنقاوة 99.0% من شركة SIGMA. أما المادة الدوائية النقية ميكوفينولات موفيتيل(MPM) فكانت بنقاوة (99.0%) ($C_{23}H_{31}O_7N$=433.49g/mol) من انتاج شركة(Globel Pharma) الهندية. كما استخدمت مستحضرات صيدلانية محلية الصنع تحتوي على ميكوفينولات موفيتيل على شكل حبوب دوائية بعيار(500mg/tab) من شركة مسعود فارما للصناعات الدوائية.

طريقة العمل من أجل المادة النقية:

حُضر المحلول العياري لـ MPM بتركيز $1 \times 10^{-2}M$ بشكل يومي، وذلك بإذابة (0.10837g) في دورق سعة 25mL مع أخذ النقاوة بعين الاعتبار ثم أُكمل الحجم حتى العلامة بالماء ثنائي التقطير، وتم تجانس المحلول بالرجّ. حُضرت منه محاليل عيارية بتراكيز $1 \times 10^{-3}M$ و $1 \times 10^{-4}M$. تمت إضافة حجوم محددة على دفعات صغيرة من المحلول العياري لـ MPM إلى

(25mL ماء ثنائي التقطير + 25mL إيثانول)، بحيث يتزايد التركيز تدريجياً وصـــولاً إلى أعلى تركيز يمكن عنده الحفاظ على خطية العلاقة بين الكمون وتركيز MPM، ثم رُسمت المنحنيات البيانية المحققة للعلاقة $E = f(pC_{MPM})$

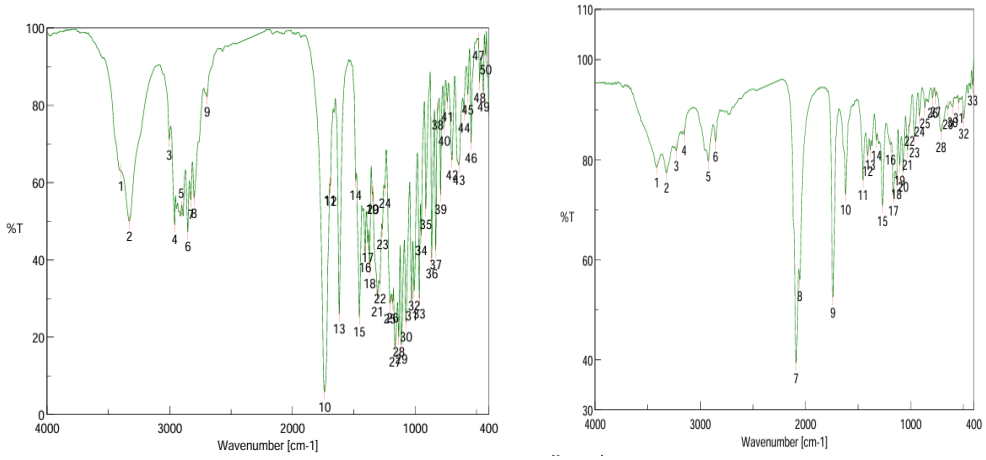
طريقة العمل من أجل المستحضر الدوائي:

حُضر محلول بتركيز (1×10^{-2}M) تقريباً من المستحضر الصيدلاني، ثم أُضيفت حجوم محددة على دفعات صغيرة من المحلول المحضر إلى (25mL ماء ثنائي التقطير+25mL ايتانول)، وطُبقت الطريقة الكمونية المباشرة لتحديد MPM في المستحضرات الصيدلانية.

تحضير معقد الزوج الأيوني ميكوفينولات موفيتيل–رينكات الأمونيوم (MPM-R.A):

مُزج محلولان متساويا التركيز 1×10^{-2}M لكل من المادة الدوائية MPM وكاشف رينكات الأمونيوم R.A بنسبة ارتباط (1:1)، ثم رُشح الراسب الناتج وغُسل بالماء ثنائي التقطير وجُفف في درجة حرارة المخبر. حُفظ المعقد ضمن عبوة عاتمة محكمة الإغلاق. أجري الكشف الكروماتوغرافي على طبقات رقيقة من السيليكاجل (TLC) بتحميل محلول المركب المحضر على الطبقة الرقيقة باستخدام طور متحرك من ثنائي ميتيل سلفوكسيد (DMSO)، وتركت الطبقة لتجف في الهواء حتى ظهور البقعة بشكل واضح، ثم فحصت تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية والذي أظهر وجود بقعة وحيدة تعود للمعقد الناتج وتؤكد نقاوته. كررت التجربة باستخدام عدة أطوار متحركة أخرى ولم يُلاحظ ظهور أي بقعة أخرى غير بقعة المعقد الناتج.

كما تم التأكد من الزمر الوظيفية الموجودة في المعقد المحضر بدراسة طيف الأشعة تحت الحمراء لكل من المادة الدوائية والكاشف والمعقد الشكل (3)، حيث يُظهر طيف IR للمعقد الناتج اتساع في عصابة الامتصاص الواقعة في المنطقة ($3500\text{-}3200\text{cm}^{-1}$) والعائدة لاهتزاز مجموعة الهيدروكسيل وذلك بسبب تكون روابط هيدروجينية، كما يُظهر الطيف انزياح عصابة الامتصاص الخاصة بزمرة الكربوكسيل في المعقد نحو الأعداد الموجية الأقل، بالإضافة إلى ظهور عصابة امتصاص جديدة عند ($2100\text{-}2060\text{cm}^{-1}$) العائدة لاهتزاز الرابطة $C \equiv N$ لمجموعة الثيوسيانات، كما يُلاحظ انزياح عصابات الامتصاص الزمر الوظيفية الأخرى في طيف المعقد الناتج عنه في طيف المادة الدوائية الشكل (3).



(b) (a)

الشكل (3): طيف IR

a: طيف المعقد، b: طيف المادة الدوائية

تحضير مسرى معجونة الكربون المعدلة كيميائياً:

حُضر مسرى معجونة الكربون بمزج مسحوق الغرافيت مع المادة الفعالة كهركيميائياً (معقد الزوج الأيوني) والملدن العضوي بالنسب الوزنية المحددة، ثم خلطت المكونات جيداً حتى الحصول على معجونة متجانسة. بعد ذلك تم حشوة المعجونة داخل جسم المسرى، وسوي سطحها للحصول على سطح أملس ومتجانس يضمن ثبات الاستجابة أثناء القياس. ثم غُرز سلك نحاسي داخل المعجونة لتأمين التوصيل الكهربائي، ثُبت المسرى المحضر إلى جانب مسرى الكالوميل المرجعي ضمن خلية كهركيميائية وتم توصيلهما إلى جهاز قياس الكمون. وبناءً عليه يمكن تمثيل المخطط الترسيمي للخلية الكهركيميائية كما يلي:

Cu|معجونة الكربون المعدلة|المحلول المدروس|(مشبع)KCl|(صلب) KCl|Hg_2Cl_2|Hg

ولتحديد أفضل تركيب للمسرى، حضرت عدة تراكيب اختلفت في نوع الملدن ونسبة معقد الزوج الأيوني، ثم قورنت استجاباتها الكمونية لاختيار التركيب الذي يوفر أعلى حساسية وأفضل مجال خطي وأطول عمر زمني.

منحنى المعايرة:

أُنشئ منحنى المعايرة بقياس الكمون الناتج عن سلسلة من المحاليل القياسية ذات التراكيز المختلفة لميكوفينولات موفيتيل، مع تسجيل قيمة الكمون بعد الوصول إلى حالة الاستقرار. ثم رُسمت العلاقة بين الكمون وناقص لوغاريتم التركيز، واستُخدمت معادلة الخط البياني لحساب ميل المنحنى ومعامل الارتباط والمجال الخطي وحد الكشف.

النتائج والمناقشة:

1-دراسة التركيب الأمثل لمعجونة الكربون الفعالة كهربائياً:

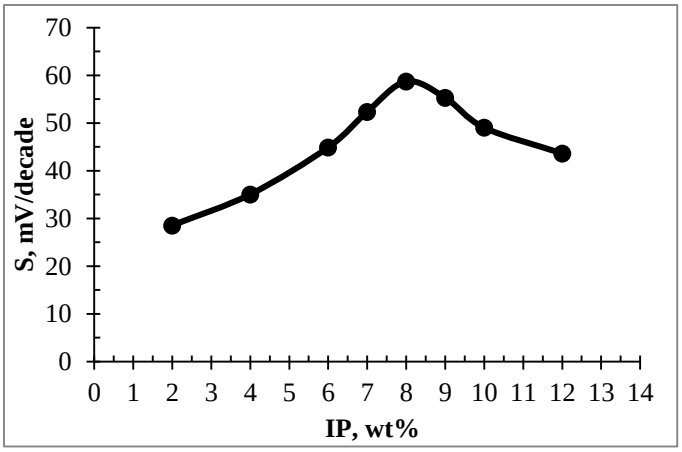
يعتمد الأداء التحليلي لمسرى معجونة الكربون بصورة رئيسة على طبيعة مكوناته ونسبها، إذ تؤثر هذه العوامل بصورة مباشرة في انتقال الأيونات داخل المعجونة، ومن ثم في حساسية المسرى وانتقائيته واستقراره. لذلك جرى تحضير عدة تراكيب للمسرى باختلاف نسبة معقد الزوج الأيوني ونسبة ونوع الملدن المستخدم، بهدف الوصول إلى التركيب الذي يحقق أفضل استجابة كمونية.

أظهرت النتائج أن المسرى المحتوي على 8% من معقد الزوج الأيوني، و46% من مسحوق الغرافيت، و46% من الملدن (DOPH) حقق أفضل أداء تحليلي مقارنة ببقية التراكيب، إذ أظهر استجابة نرنستية قريبة من القيمة النظرية، ومجالاً خطياً واسعاً، بالإضافة إلى ثبات ملحوظ في الكمون أثناء القياس، كما يبين الجدول (1). ويشير ذلك إلى أن هذه النسبة توفر توازناً مناسباً بين عدد المواقع الفعالة المتاحة للتبادل الأيوني وبين المحافظة على الخواص الفيزيائية لمعجونة الكربون.

الجدول (1): تأثير تركيب معجونة الكربون على خصائص المسرى الانتقائية

التركيب % (w/w)			القرائن التحليلية		
الغرافيت (G)	الملدن (P)	معقد الزوج الأيوني (MPM-RA)	الميل (S) mV/decade	المجال الخطي (L.R)، µM	R^2
49.0	49.0	2	28.512	1.72-2980	0.9951
48.0	48.0	4	35.017	1.687-2980	0.9990
47.0	47.0	6	44.877	0.870- 3307	0.9988
46.5	46.5	7	52.346	0.551- 3630	0.9993
46.0	46.0	8	58.707	0.119- 3630	0.9991
45.5	45.5	9	55.312	0.119- 3630	0.9977
45.0	45.0	10	49.023	1.360- 1786	0.9987
44.0	44.0	12	43.601	1.360- 1786	0.9956

أُجريت الدراسة البيانية لتغيرات متوسط ميل المنحنيات العيارية $\bar{s}$ مع تغير النسبة المئوية الوزنية لمعقد الزوج الأيوني في المعجونة وذلك كما هو موضح في الشكل (4).



الشكل (4): تحديد النسبة المثلى للزوج الأيوني MPM-R.A

وُجد أن نسبة 8% من معقد الزوج الأيوني MPM-R.A والمبيّنة في الجدول (1) تمثل النسبة المثلى نظراً لتقارب قيمة الميل مع القيمة النظرية لميل معادلة نرنست، إضافةً إلى أنها وفّرت مجالاً خطياً واسعاً.

2- دراسة تأثير نوع الملدن على خصائص المسرى الانتقائية:

يرتبط أداء وحساسية مساري معجونة الكربون بنوع الملدن المستخدم، حيث تؤثر الخصائص الفيزيائية للملدنات بشكل ملحوظ على حركية معقد الزوج الأيوني داخل معجونة الكربون [13]، ولهذا الغرض تم استخدام ثلاث ملدنات مختلفة في خصائصها الفيزيائية وهي ثنائي أُكتيل فتالات (DOPH)، ثنائي بوتيل فتالات (DBPH)، زيت البارافين (P.oil)، كما هو موضح في الجدول (2). أظهر المسرى الملدن بـ DOPH تحسناً واضحاً في الخصائص التحليلية للمسرى المحضر من خلال قيمة ميل قريبة من القيمة النظرية لمعادلة نرنست إضافة إلى انخفاض قيمة حد الكشف.

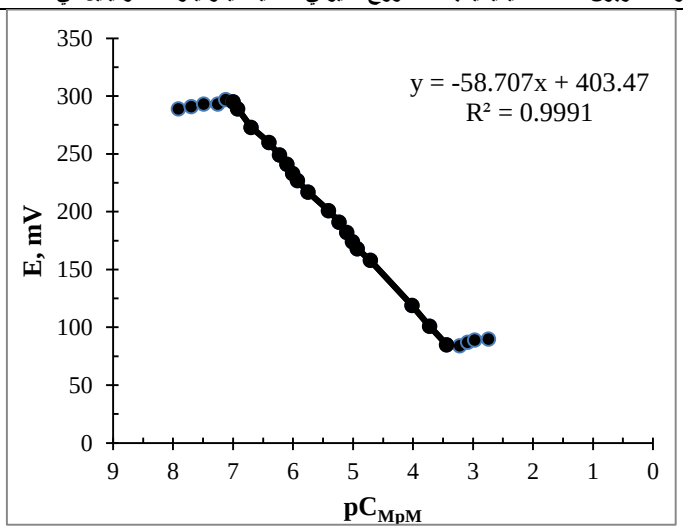
الجدول (2): تأثير نوع الملدن على خصائص المسرى الانتقائية

نوع الملدن	نسبة معقد الزوج الأيوني %	الميل mV/decade	المجال الخطي، µM	حدالكشف، µM	زمن الاستجابة، sec
DOPH	8	58.707	0.119-3630	0.0758	20
DBPH	5	53.487	4.250-900.550	8.240	30
P. Oil	6	48.433	4.250-900.550	3.770	35

3- توصيف أداء المسرى:

1.3- المنحني العياري للمسرى المحضر:

أُضيفت حجوم متزايدة من محلول MPM العياري بتركيز $1 \times 10^{-2}M$ إلى (25 mL ماء ثنائي التقطير + 25 mL إيثانول)، بحيث يزداد التركيز تدريجياً وصولاً إلى أعلى تركيز يمكن عنده الحفاظ على خطية تزايد الكمون مع زيادة التركيز. قيس كمون خلية المسرى بعد كل إضافة، ثم رُسمت العلاقة بين الكمون E والقيمة pC_MPM باستخدام طريقة أصغر المربعات. أُعطي منحنى المعايرة العلاقة التقريبية $E = -58.707pC_{MPM} + 403.47$، مع معامل ارتباط $R^2 = 0.9991$ الشكل(5).



الشكل (5): المنحني العياري لمسرى MPM الانتقائي

2.3–المجال التحليلي للمساري المحضرة:

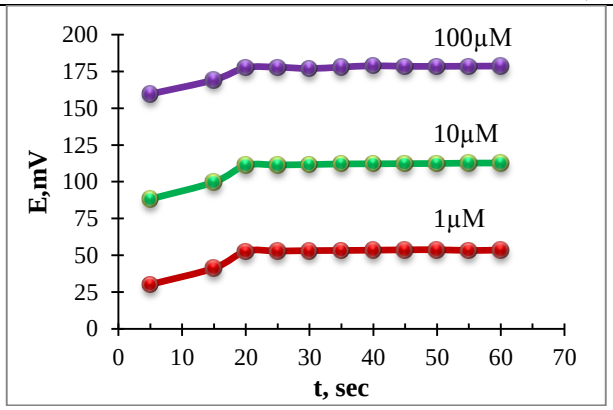
حُدد المجال الخطي التحليلي من المنحني العياري للمسرى الانتقائي لـ MPM المبين في الشكل (5)، حيث وُجد أنه يمتد بين(0.119-3630µM) بالنسبة للمسرى المحضر(MPM-R.A$_{8\%}$ SE) باستخدام الملدن DOPH وبمعامل ارتباط قدره 0.9991.

3.3– زمن استجابة المسرى:

أظهرت القياسات أن المسرى يصل إلى حالة الاتزان خلال نحو 20sec فقط، وهو زمن استجابة قصير مقارنة بالعديد من المساري الكهركيميائية المستخدمة في التحليل الدوائي [14].

ويُعزى ذلك إلى كفاءة انتقال الأيونات داخل معجونة الكربون، وإلى التوزيع المتجانس لمعقد الزوج الأيوني داخل بنية المسرى، مما يضمن سرعة تكوين حالة الاتزان بين سطح المسرى والمحلول.

حُدد زمن الاستجابة اللازم لوصول كمون المسرى المحضر إلى حالة الاستقرار باستخدام ميقاتيه رقمية، ولم يتجاوز زمن الاستجابة عند قياس محاليل تراكيزها تتراوح بين µM(100-1) من MPM قيمة 20sec وذلك بالنسبة للمسرى المحضر (MPM-R.A$_{8\%}$SE) كما هو موضح في الشكل (6).



الشكل (6): زمن استجابة المسرى المحضر المنتقي لـ MPM

4.3- عمر المسرى:

يُعد العمر التشغيلي من المؤشرات المهمة في تقييم كفاءة المساري الكهركيميائية، إذ يعكس قدرة المسرى على المحافظة على خصائصه التحليلية خلال فترة الاستخدام. ويكتسب هذا المؤشر أهمية خاصة في التطبيقات العملية، لأنه يحدد مدى إمكانية استخدام المسرى بصورة متكررة دون الحاجة إلى إعادة تحضيره.

رُسمت المنحنيات العيارية للمسرى المحضر والمنتقي لمادة MPM لتحديد العمر الأمثل للمسرى. كما دُرست بيانياً تغيرات متوسط الميل $\bar{S}$ للجزء الخطي من المنحني العياري للمسرى مع تقدم زمن العمل (t)، كما هو موضح في الجدول (3)

الجدول (3): تأثير زمن العمل على أداء المسرى المحضر

زمن العمل	S mV/decade	المجال الخطي µM
MPM-R.A 8%SE		
ساعة	58.707	0.119-3630
يوم	58.71	0.119-3630
2 يوم	58.94	0.119-3630
5	58.45	0.119-3630
10	58.61	0.119-3630

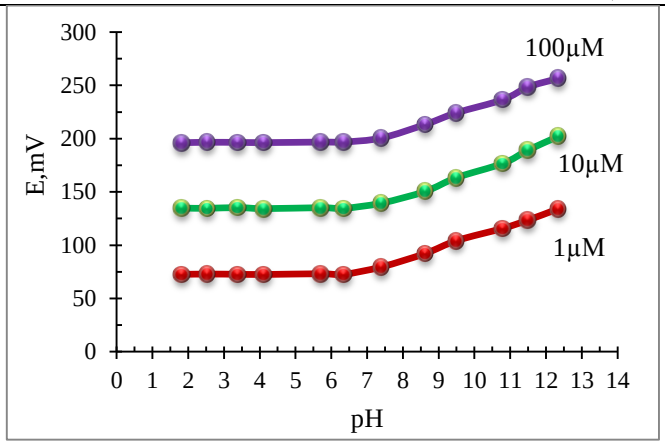
زمن العمل	S mV/decade	المجال الخطي µM
MPM-R.A 8%SE		
15	58.7	0.536-3630
20	58.77	0.536-3630
25	58.32	0.119-3630
30	58.85	0.774-3630
35	58.15	0.774-3630
40	58.24	0.119-3630
45	57.88	1.36-3630
50	57.11	1.36-3630
55	56.10	5.72-1786
60	55.40	5.72-1786
65	53.47	2.56-3630
70	50.91	5.72-1786

أظهرت النتائج أن المسرى حافظ على استجابة نرنستية مستقرة لمدة بلغت 40 يوماً، مع انخفاض تدريجي في الأداء بعد هذه المدة. ويُعزى ذلك إلى التغير التدريجي في خواص معجون الكربون، وما يصاحبه من فقدان جزئي للمادة الفعالة كهركيميائيا نتيجة الاستعمال المتكرر، إضافة إلى احتمالية تلوث سطح المسرى أو انخفاض كفاءة انتقال الأيونات داخل المعجونة بمرور الزمن.

وتشير هذه النتائج إلى أن المسرى يتمتع باستقرار تشغيلي جيد، الأمر الذي يجعله مناسباً للاستخدام الروتيني في مختبرات الرقابة الدوائية.

4- تأثير pH الوسط على ثبات أداء المسرى:

غُمر المسرى الانتقائي لمادة MPM مع مسرى زجاجي لقياس pH ضمن محلول MPM بتركيز 1µM، ثم دُرس تأثير تغير قيمة pH الوسط ضمن المجال (14–1) من خلال إضافة حجوم صغيرة من محاليل HCl أو NaOH بتركيز M(1.0–0.1). سُجلت قيم الكمون و pH للمحلول عند درجة حرارة 25°C وتكرر العمل على محاليل أخرى من مادة MPM بتراكيز 10µM و100 µM، ثم رُسمت تغيرات الكمون بدلالة pH لكل تركيز مدروس، كما هو موضح في الشكل (7).



الشكل (7): دراسة تأثير قيم pH على قيم الكمون للمسرى المحضر

يلاحظ من المنحني البياني أن المسرى يعمل ضمن مجال pH يقع بين (1.83-6.35) دون تغير محسوس في قيمة الكمون، بينما لا يمكن العمل في الأوساط القلوية حيث نلاحظ ارتفاع في قيم الكمون المقاسة.

5- دراسة انتقائية المسرى المنتقي لمادة MPM:

طُبقت طريقة الكمون الموافق [15] لحساب معامل الانتقائية $pK_{MPM}^{pot,MPM-R.A}$ كما يلي: أُضيف إلى (25mL ماء ثنائي التقطير+25mL ايتانول) 0.5 mL من محلول MPM بتركيز (1×10^{-2}M) فتم الحصول على محلول بتركيز ($a_{MPM}=9.90\times10^{-5}$M)، باستخدام المسرى المحضر-MPM R.A$_{8\%}$SE سجلت قيمة الكمون (245.0mV)، بعد ذلك أضيف 0.01mL من محلول MPM إلى نفس المحلول، فارتفع التركيز إلى (a'=1.01×10^{-4}M)، أي بمقدار (a'-a=0.2 $\times10^{-5}$)، وسجلت قيمة كمون جديدة (246.0mV)، أي بزيادة مقدارها (1mV). أُعيدت الخطوات نفسها لكن استُبدلت الإضافة الأخيرة من محلول MPM بإضافة أحد محاليل السواغات والمواد الحافظة المتوقع وجودها مع العينات الدوائية، وذلك حتى حدوث ارتفاع في قيمة الكمون بمقدار (1mV)، عندها تم تحديد تركيز المادة المضافة (a_B)، وحُسب معامل الانتقائية لمادة MPM تجاه مختلف هذه المواد وفقاً للعلاقة: $K_{AB}^{pot} = \frac{a'A-aA}{aB}$

يبين الجدول (4) قيم ثوابت الانتقائية الكمونية للأيونات والمواد المعيقة المدروسة الموجودة مع MPM في المستحضرات الصيدلانية.

الجدول (4): أهم ثوابت الانتقائية الكمونية لخلية المسرى المحضر

المادة المعيقة	aB, M	K
Na^+	2.53×10^{-3}	6.32×10^{-4}
K^+	3.36×10^{-3}	4.76×10^{-4}
Ca^{2+}	3.36×10^{-3}	1.93×10^{-3}
NH_4^+	4.02×10^{-3}	3.98×10^{-4}
Mg^{2+}	8.08×10^{-4}	1.98×10^{-3}
Mn^{2+}	9.13×10^{-3}	1.75×10^{-4}
نشاء	1.69×10^{-3}	9.47×10^{-4}
لاكتوز	-	-
فركتوز	-	-
سكروز	-	-
غلوكوز	-	-

تدل قيم ثوابت الانتقائية على أن المسرى المحضر يُظهر حساسية منخفضة تجاه بعض الأيونات الشائعة عند وجودها في المحلول، كما أنه لا يستجيب للمركبات العضوية الشائعة وبعض السكريات المستخدمة في تركيب السواغات. وبناءً على ذلك، يمكن اعتبار المسرى المقترح انتقائي لمادة MPM.

6- دقة وصحة الطريقة المقترحة باستخدام المساري المقترحة:

لتحديد دقة وصحة الطريقة المقترحة، حُضرت مجموعة من المحاليل العيارية ضمن المجال الخطي المعتمد. استُخدمت معادلة الجزء الخطي من منحنى المعايرة $E = -58.707pC_{MPM} + 403.47$ لحساب التركيز، وفق العلاقة: $C_{MPM} = 10^{(E-403.47)/58.707}$. أُخذ متوسط التراكيز، وتم تكرار العمل خمس مرات، ثم أُجريت المعالجة الإحصائية للنتائج كما هو موضح في الجدول (5).

الجدول (5): نتائج تحديد MPM ضمن المحلول النقي باستخدام المسرى المحضر

المسرى	$C_{t.aken}$, µM	C_{found}, µM	SD*, µM	RSD%	R%
MPM-R.$A_{8\%}$SE	5.000	4.950	0.100	2.02	99.00
	50.000	49.960	0.817	1.64	99.92
	500.000	502.200	5.404	1.08	100.44
	1000.000	1002.800	6.834	0.68	100.28

*متوسط خمس تجارب

تدل نتائج تحديد MPM في المحلول النقي باستخدام المسرى المحضر على أن الطريقة المتبعة مقبولة تحليلياً حيث لم يتجاوز الانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% القيمة 2.02% وبلغت نسبة الاسترجاعية R% القيمة 100.44%، مما يؤكد دقة وصحة الطريقة المقترحة.

7- التطبيق العملي:

طُبقت طريقة المنحني العياري لتحديد MPM في مستحضراته الصيدلانية (500mg/tab) باستخدام المسرى المحضر، وذلك بهدف تقييم مدى صلاحية الطريقة للاستخدام في الرقابة الدوائية.

أُجريت مقارنة إحصائية بين النتائج التي تم الحصول عليها ونتائج الطريقة المرجعية [16]. باستخدام اختباري t-test وF-test عند مستوى دلالة $\alpha=0.05$. وبالاعتماد على متوسطات الاسترجاعية والانحرافات المعيارية المبلّغ عنها في الجدول (6)، بلغت قيمة F المحسوبة 1.23، بينما بلغت قيمة t المحسوبة نحو 3.32 عند استخدام اختبار t لعينتين مستقلتين، وتُفسر هذه القيم بالرجوع إلى القيم الحرجة المبينة أسفل الجدول (6).

تؤكد هذه النتائج إمكانية الاعتماد على المسرى المطور في التحليل الروتيني للمستحضرات الصيدلانية دون الحاجة إلى إجراءات فصل أو معالجة معقدة للعينة، وهو ما يمثل إحدى المزايا المهمة للطريقة المقترحة.

الجدول (6) : مقارنة نتائج تحديد MPM في المستحضر الصيدلاني بالطريقة المقترحة والطريقة المرجعية باستخدام المسرى المحضر MPM-R.A$_{8\%}$SE

المستحضرالصيدلاني		الطريقة المقترحة	الطريقة المرجعية
ميكوفينولات موفيتيل [c]500mg/tab	R%±SD[a]	99.60±0.10	99.80±0.09
	t-test (tcalc)	3.32	—
	F-test (Fcalc)	1.23	—

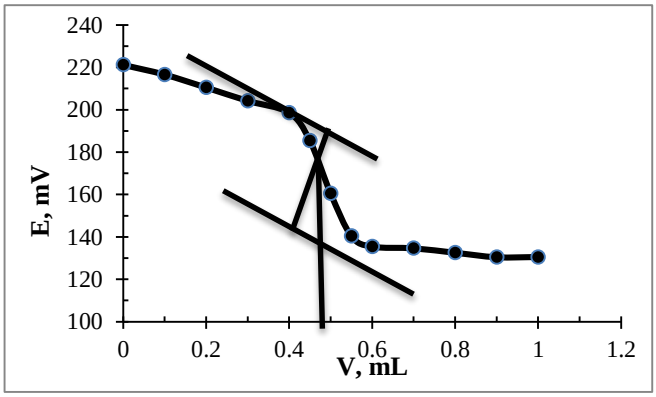
a متوسط خمس تجارب

b عند استخدام اختبار t لعينتين مستقلتين، n=5 لكل طريقة، ودرجات الحرية التقريبية df=8، وقيمة t الجدولية عند مستوى ثقة 5% هي 2.306. أما اختبار F فتم على أساس 4 درجات حرية لكل تباين، وقيمة F الجدولية عند مستوى ثقة 95% هي 6.39

c مضغوطات عيار500mg/tab من شركة مسعود فارما.

8- تحديد MPM بطريقة المعايرة الكمونية باستخدام المسرى MPM-R.A$_{8\%}$SE:

استخدم المسرى المحضر MPM-R.A$_{8\%}$SE كمسرى كاشف في المعايرات الكمونية لمادة MPM، وذلك بمعايرة 50mL من المحلول العياري للمادة الدوائية بتركيز 1×10^{-4}M بمحلول R.A تركيزه 1×10^{-2}M، حيث حصلنا على معقد الزوج الأيوني MPM-R.A، الشكل (8)



الشكل (8): منحني المعايرة الكمونية لـ MPM تركيزه $1\times10^{-4}M$ بمحلول R.A تركيزه $1\times10^{-2}M$

يتضح من الشكل (8) أن نسبة ارتباط المادة الدوائية مع الكاشف (MPM:R.A) هي (1:1).

الخلاصة:

اتسمت الطريقة التحليلية المقترحة في هذا البحث والمبنية على تحضير مسرى انتقائي لمادة ميكوفينولات موفيتيل والمعدل كيميائياً بمعقد الزوج الأيوني (MPM-R.A)، بالصحة من خلال قيم الاسترجاعية الجيدة، والدقة في النتائج من خلال قيم الانحراف المعياري النسبي المئوي، كما امتازت بالبساطة وسهولة التحضير وانخفاض التكلفة، إضافةً إلى قدرتها على تحديد ميكوفينولات موفيتيل في المحاليل النقية وفي المستحضرات الصيدلانية دون أي تأثير يُذكر من الأيونات أو السواغات أو المواد المالئة المرافقة للمادة الدوائية المدروسة.

المراجع:

[1] Allison, A. C., & Eugui, E. M. (2000). Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, *47*(2-3), 85-118.

[2] Broen, J. C., & van Laar, J. M. (2020). Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, *16*(3), 167-178.

[3] Kalcher, K., Schachl, K., Švancara, I., Vytřas, K., & Alemu, H. (1997). Recent progress in the development of electrochemical carbon paste sensors.

[4] Vytřas, K., Švancara, I., & Metelka, R. (2009). Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Journal of the Serbian Chemical society*, *74*(10), 1021-1033.

[5] Pattanayak, S., Prasanna, A. A., Kiranmayi, C., & Padmalatha, K. (2015). Analytical UV spectroscopic method development and validation for the estimation of mycophenolate Mofetil. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, *5*(4) 209-213.

[6] Bahram M.، Mojarrad S.، Moghtader M.، 2018- Simultaneous Kinetic–Spectrophotometric Determination of Mycophenolate Mofetil and Mycophenolic Acid Based on Complexation With Fe(III) Using Chemometric Techniques ، Journal of the Iranian Chemical Society، 15(4), 779-786

[7] Partani, P., Verma, S. M., & Monif, T. (2015). Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantitation of mycophenolate mofetil in human plasma: Application to a bioequivalence study and metabolite identification. *Journal of separation science*, *38*(20), 3533-3544.

[8] Kaur, P., Kumar, M., & Mandal, U. K. (2020). Development and validation of a simple HPLC method for estimation of Mycophenolate Mofetil in microemulsion formulation. *Int J Pharm Pharm Sci*, *12*(4), 16-20.

[9] Kumar, P., Mishra, V., Verma, S., & Bhatia, A. (2018). Development of RP-HPLC method for simultaneous estimation of mycophenolate mofetil and tacrolimus. *J Mater Environ Sci*, *9*, 1357.

[10] Madrakian, T., Soleimani, M., & Afkhami, A. (2014). Simultaneous determination of mycophenolate mofetil and its active metabolite, mycophenolic acid, by differential pulse voltammetry using multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering: C*, *42*, 38-45.

[11] Momeneh, H., & Gholivand, M. B. (2018). Mycophenolate mofetil sensor based on molecularly imprinted polymer/multi-walled carbon nanotubes modified carbon paste electrode. *Analytical biochemistry*, *557*, 97-103.

[12] Mahnashi, M. H., Mahmoud, A. M., Alkahtani, S. A., Ali, R., & El-Wekil, M. M. (2020). Facile fabrication of a novel disposable pencil graphite electrode for simultaneous determination of promising immunosuppressant drugs mycophenolate mofetil and tacrolimus in human biological fluids. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *412*(2), 355-364.

[13] Issa, Y. M., Abdel-Fattah, H. M., & Abdel-Moniem, N. B. (2013). Chemically modified carbon paste sensor for potentiometric determination of doxycycline hydrochloride in batch and FIA conditions. *International Journal of Electrochemical Science*, *8*(7), 9578-9592.

[14] Bailey, P. L., & Riley, M. (1975). Performance characteristics of gas-sensing membrane probes. *Analyst*, *100*(1188), 145-156.

[15] Umezawa, Y., Bühlmann, P., Umezawa, K., Tohda, K., & Amemiya, S. (2000). Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, *72*(10), 1851-2082.

[16] Pharmacopoeia, B. (2009). Her Majesty's stationery office. *London, UK*, *1*, 2011416.