Preparation and Characterization of New Ion Selective Electrode for Determination of Vitamin B12

تصنيع ودراسة خصائص مسرى انتقائي جديد لتحديد فيتامين B12

هاجر ناصر: جامعة اللاذقية – اللاذقية – سورية
هبة ناصر: جامعة اللاذقية – اللاذقية – سورية

عنوان التواصل: hajarnasrnasser@latakia-univ.edu.sy ـ hiba.nasser@latakia-univ.edu.sy

تاريخ التسليم: ٩ حزيران ٢٠٢٦ – **تاريخ القبول:** ٢ آب٢٠٢٦

ABSTRACT

In this study, a novel carbon paste potentiometric ion-selective electrode was developed and characterized for the determination of cyanocobalamin (vitamin B12). Its analytical performance and applicability in the determination of vitamin B12 in pure samples and pharmaceutical formulations were evaluated. The electrode was fabricated using an ion-pair complex formed by the reaction of cyanocobalamin with phosphomolybdic acid as the electro-active material. The ion pair was incorporated into a carbon paste consisting of graphite powder and a plasticizer. The effects of three plasticizers, namely dibutyl phthalate (DBP), dioctyl phthalate (DOP), and paraffin oil, on the potentiometric response of the electrode were investigated to obtain the optimum electrode composition. The analytical performance of the proposed electrode was evaluated using the direct potentiometric method by studying its Nernstian slope, linear concentration range, detection limit, response time, pH and temperature ranges, operational lifetime, and selectivity against interfering ions (vitamin B6, vitamin B1, Cu^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Zn^{2+}, and Mg^{2+}). The results showed that the optimum electrode composition contained 8% ion-pair complex with DBP as the plasticizer. The proposed electrode exhibited a Nernstian slope of 57.55 ± 0.16 mV/decade, a linear concentration range of (1.99×10^{-6}–2.47×10^{-3}) mol /L, and a detection limit of (1×10^{-6}) mol/ L. The electrode showed the best performance within a pH range of (4–7) and a temperature range of (25–35) °C, with a response time 50 sec and an operational lifetime of about one month. The low selectivity coefficient values confirmed good selectivity against interfering ions. Statistical evaluation confirmed the accuracy and precision of the proposed method, with recoveries ranging from (95.8 - 105.6) % and low values of standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD). Furthermore, statistical comparison with the reference method using Student's t-test and F-test revealed no significant differences between the two methods, confirming the suitability of the proposed electrode for the reliable and accurate determination of vitamin B12 in pure samples and pharmaceutical formulations.

Keywords: Cyanocobalamin (Vitamin B12), Potentiometric Ion-Selective Electrode, Carbon Paste Electrode, Ion Pair, Phosphomolybdic Acid

الملخص

يهدف هذا البحث إلى تصنيع وتوصيف مسرى انتقائي كموني جديد من نوع عجينة الكربون لتحديد السيانوكوبالامين (فيتامين B12)، وتقييم خصائصه التحليلية، والتحقق من كفاءته في تحديد تركيز الفيتامين في العينات النقية والمستحضرات الدوائية. اعتمد تصنيع المسرى على تحضير زوج أيوني ناتج من تفاعل السيانوكوبالامين مع حمض الفوسفوموليبدك بوصفه المادة الفعالة كهربائياً، ثم دمجه مع مسحوق الغرافيت والملدن، حيث تم اختبار تأثير ثلاثة ملدنات على الاستجابة الكمونية للمسرى وهي: دي بوتيل فتالات (DBP)، ودي أوكتيل فتالات (DOP)، وزيت البارافين، بهدف اختيار التركيب الأمثل للمسرى. وتم تقييم أداء المسرى باستخدام تقنية القياس الكموني المباشر من خلال دراسة خصائصه التحليلية، والتي شملت الميل النرنستي، والمجال الخطي، وحد الكشف، وزمن الاستجابة، ومجال الـ pH ودرجة الحرارة المثلى، والعمر التشغيلي، إضافةً إلى دراسة انتقائيته تجاه عدد من الأيونات المتداخلة ($B6,B1,Cu^{2+},K^{+},Na^{+},Zn^{2+},Mg^{2+}$). أظهرت النتائج أن أفضل تركيب للمسرى احتوى على 8% من الزوج الأيوني مع استخدام الملدن DBP، إذ حقق ميلاً نرنستياً مقداره (0.95±56.856) mV/decade، ومجالاً خطياً تراوح بين

mol/L(1.99×10^{-6}–2.47×10^{-3})، وحد كشف بلغ 1×10^{-6} mol/L كما أظهر المسرى أفضل استجابة ضمن مجال pH (4–7) ودرجات حرارة تراوحت بين 25 – 35) °C، مع زمن استجابة بلغ نحو 50sec وعمر تشغيلي يقارب شهراً واحداً. وأثبتت معاملات الانتقائية المنخفضة أن المسرى المقترح يتمتع بانتقائية جيدة تجاه الأيونات المتداخلة، كما بينت الدراسة الإحصائية أن المسرى يتمتع بالصحة والدقة حيث تراوحت نسب الاسترجاع بين (95.8–105.6) %، مع قيم منخفضة للانحراف المعياري والانحراف المعياري النسبي. كما أظهرت المقارنة الإحصائية مع الطريقة المرجعية باستخدام اختباري ستودنت وفيشرعدم وجود فروق معنوية بين الطريقتين، مما يؤكد صلاحية المسرى المقترح لتحديد فيتامين B12 في العينات النقية والمستحضرات الدوائية بكفاءة وموثوقية عالية.

الكلمات المفتاحية: سيانوكوبالامين (فيتامين B12)، مسرى انتقائي كموني، مسرى عجينة الكربون، الزوج الأيوني، حمض الفوسفوموليبدك.

المقدمة

تلعب الفيتامينات دوراً أساسياً في الحفاظ على الصحة العامة والوقاية من الأمراض، وهي مركبات عضوية يحتاجها الجسم بكميات ضئيلة. وتُعد فيتامينات B–Complex، وخاصة فيتامين B12 (السيانوكوبالامين)، من أهم العناصر الحيوية لدورها في إنتاج الطاقة وتكوين خلايا الدم الحمراء ودعم الجهاز العصبي، ويمكن الحصول على فيتامين B12 من مصادر غذائية متعددة، ويؤدي نقصه إلى اضطرابات عصبية وتأخر في النمو [1–5].اهتم الكثير من الباحثين بتطوير طرائق تحليلية مختلفة لتحديد تركيز فيتامين B12 في العينات الدوائية أهمها الطرائق الكروماتوغرافية خاصة HPLC [6–8] والطرائق الطيفية [9,10].تمتلك هذه الطرائق خصائص جيدة من ناحية الانتقائية والحساسية العاليتين، إلا أنها تتطلب فترة تحليل طويلة وتكلفة باهظة ومعالجة للعينات قبل استخدامها. وبالمقارنة مع الطرائق السابقة تعد الطرائق الكهركيميائية خياراً بديلاً بسبب بساطتها، تكلفتها المنخفضة، حساسيتها العالية، سهولة التصنيع [11]، منها الطرائق الفولط أمبيرومترية [12–15] والحساسات الالكتروكيميائية التي تتميز بالحساسية، الانتقائية، السرعة، سهولة الاستخدام [16–18]. تعتمد هذه الحساسات على تحويل الإشارة الكيميائية الناتجة عن تفاعل المادة المراد تحليلها إلى إشارة كهربائية قابلة للقياس مثل الكمون، مما يتيح تحديد التركيز بدقة وفعالية. وتشمل هذه الفئة مجموعة واسعة من الأجهزة مثل الالكترودات الانتقائية الأيونية (ISEs)، والتي تُستخدم في تطبيقات متعددة تشمل التحليل البيئي، والتشخيص الطبي، والصناعات الدوائية والغذائية [19,20]. تعمل الالكترودات الانتقائية الكمونية للأيونات وفق مبدأ يعتمد على تكوين فرق كمون كهربائي عند واجهة الحساس مع محلول العينة، ويكون هذا الكمون مرتبطاً بشكل لوغاريتمي بنشاط الأيون المدروسة وفق معادلة نرنست (Nernst equation). من بين الالكترودات الانتقائية مايُعرف بالكترودات عجينة الكربون المعدلة. تُستعمل هذه المساري كمساري انتقائية في حال تعديل عجينة الكربون بمخاليط لمركبات أخرى [21]، إذ تتعلق حساسية وانتقائية المسرى الانتقائي بمكوناته، حيث وجد أن محتوى وطبيعة الزوج الأيوني والمادة الملدنة لها تأثير هام على استجابة المسرى [22]. إذ يُعد نوع الملدن من العوامل الهامة في تحديد أداء الالكترودات الانتقائية للأيونات، حيث يُسهم في ضبط الخصائص الفيزيائية والكيميائية للحساس، وخاصة حركة الزوج الأيوني داخل الطور العضوي. كما ينبغي أن يتمتع الملدن بخصائص مناسبة مثل انخفاض اللزوجة والسمية والتطاير، إضافة إلى توافقه الجيد مع الزوج الأيوني وقدرته على إذابة المكونات الفعالة دون حدوث ارتشاح إلى الوسط المائ [23–25]تتجلى أهمية البحث في مسايرة الأبحاث العالمية في تطوير وتحديث الطرائق التحليلية للكشف والتحديد في المواد النقية والمستحضرات الصيدلانية بطريقة سهلة وميدانية، واستخدام هذه الطرائق في المراقبة الدورية الصحية. حيث تتلخص أهداف البحث في: تصنيع مسرى انتقائي لفيتامين B12 يعتمد على تقنية مساري عجينة الكربون المعدلة ودراسة الخصائص التقنية والتحليلية ثم المقارنة مع عينات عيارية وواقعية.

المواد والطرائق

اعتمد البحث على تصنيع مسرى عجينة كربون معدل انتقائي لفيتامين B12 يعتمد على الطريقة الكمونية وذلك بتحضير المادة الفعالة، ثم اختيار الشروط المثلى التقنية (نسبة المكونات، زمن التجاوب، زمن الثبات)، والتحليلية (الميل النرنستي، درجة الـ pH، درجة الحرارة) لعمل المسرى، كما تمت دراسة انتقائية المسرى بطريقة الكمون الموافق، ثم إجراء الدراسة الإحصائية على محاليل عيارية (الصحة، الدقة، حد الكشف) وقياس عينات واقعية (صيدلانية) ومقارنة الطريقة المتبعة بطريقة معتمدة وبالطرائق المرجعية.

المواد الكيميائية والأجهزة المستخدمة

شركة Merck (ألمانيا): زيت البارافين (Paraffin oil) عالي النقاوة، درجة تحليلية. ملدن دي بوتيل فتالات (Dibutyl phtha–late–DBP) ($C_{16}H_{22}O_4$) وزنه الجزيئي (278.34g/mol) نقاوة≤98%. حمض الفوسفوموليبدك: Phosphomolybdic ac–id–PMA ($H_3[Mo_{12}PO_{40}].12H_2O$) عالي النقاوة 99%.

شركة TM Media – قسم من شركة Titan Biotech Ltd (الهند): سيانوكوبالامين–فيتامين (cyanocobalamin–vitamin B_{12} B12) صيغته العامة ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) عياري وزنه الجزيئي (1355.37g/mol) نقاوة 99%. بيريدوكسين هيدروكلورايد–فيتامين B6 (Pyridoxine Hydrochloride–vitamin B6) عياري صيغته (($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$) وزنه الجزيئي (205.64g/mol) نقاوة 99%. ثيامين هيدروكلورايد–فيتامين B1 (Thiamine Hydrochloride– vitamin B1) عياري صيغته ($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$) وزنه الجزيئي (337.27g/mol) نقاوة 99%. مسحوق الغرافيت النقي (Graphite powder) نقاوة عالية 99%. مجموعة أملاح نقية نقاوتها 99% حُضرت بتراكيز مختلفة وتشمل كلوريد الصوديوم (NaCl)، كبريتات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$)، كلوريد البوتاسيوم (KCl)، كلوريد الزنك ($ZnCl_2$)، كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$).

شركة BDH Chemicals (المملكة المتحدة): ثنائي أوكتيل فتالات (Dioctyl phthalate–DOP) صيغته (C24H38O4) وزنه الجزيئي (390.56g/mol) عالي النقاوة، درجة تحليلية.

شركة Loba Chemie (الهند): حمض كلور الماء (Hydrochloric acid–HCl) بتركيز 37% وزناً.

CC BY

شركة Eurolab (فرنسا): هيدروكسيد الصوديوم (Sodium hydroxide–NaOH) نقاوة 99%.
شركة Biosolve Chimie (فرنسا): ميتانول (Methanol–CH4O) عالي النقاوة بدرجة كروماتوغرافيا سائلة (HPLC grade).
شركة SRL (الهند): ماء فائق النقاوة منزوع الأيونات ومصفى بدرجة ملائمة لأجهزة HPLC.
المستحضرات الدوائية التجارية: مضغوطات نيوروبيون (Neurobion Tablets) إنتاج شركة P&G Health (ألمانيا)، تحتوي على 200µg سيانوكوبالامين للمضغوطة الواحدة.
إنتاج شركة ابن الهيثم(Vita3 Ampoules)أمبولات فيتا 3 سيانوكوبالامينmgللصناعات الدوائية (سوريا)، تحتوي على 1 للأمبولة الواحدة.
ماء ثنائي التقطير محلي الصنع.

الأجهزة المستخدمة

– شركة victor/ vici (الصين): مقياس ميلي فولت رقمي (Digital Multimeter) طراز VC97.
– شركة WTW (ألمانيا): مقياس pH/mv متر "مزود بالكترود زجاجي جمعي".
– شركة Sartorius (المانيا): ميزان تحليلي حساس بدقة 0.001g.
– شركة Jasco (اليابان): جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC system) مزودة بكاشف PDA، وعمود فصل كروماتوغرافي C–18 بأبعاد (250mm×4.6mm,5µm).
– شركة Elma (ألمانيا): حمام أمواج فوق الصوتية (Ultrasonic Cleanerl/Bath) لنزع الغازات وإذابة العينات.
– شركة Memmert (ألمانيا): حمام مائي منظم للحرارة (Water Bath).
– شركة DLAB (الصين): محرك مغناطيسي مزود بسخان.
– تجهيزات أخرى:الكترود الكالوميل المشبع (Saturated Calomel Reference Electrode–SCE) كالكترود مقارن، ميكروبيبيت بحجوم متغيرة مختلفة، أدوات زجاجية مخبرية متنوعة.

طرائق التحضير والعمل المخبري

1– تحضير محلول أم من سيانوكوبالامين بتركيز (0.005mol/L) وذلك بإذابة g4961.0 منه في25ml l ماء مقطر.
2– تحضير العينات الدوائية
–**تحضير مضغوطة *(B–Complex)*** تم طحن 10 مضغوطات وأخذ وزن يعادل مضغوطة واحدة (0.72g)، ثم إذابتها في 40ml ماء مقطر مع التحريك لمدة 30min بالأمواج فوق الصوتية، ثم يتم الترشيح وغسل الراسب المتبقي على ورقة الترشيح بالماء المقطر ليتم استخلاص كامل فيتامين B12 ثم يتمم بعدها الحجم حتى 50 ml.[17].
–***تحضير الأمبولة*** تم إفراغ محتوى الأمبولة في بالون معايرة سعة 052 lm وإتمام الحجم بالماء المقطر حتى علامة السعة.
3– تحضير الزوج الأيوني: تم تحضير الزوج الأيوني من خلال إضافة 20ml) من سيانوكوبالامين المحضر بتركيز (1×10^{-2} mol/L) والمحمض بحمض كلور الماء إلى(60ml) من حمض الفوسفومولبيدك المحضر بنفس التركيز مع التحريك، لنلاحظ تشكل راسب بلون أحمر.
4– تحضير مسرى عجينة الكربون: تم تحضير مسرى عجينة الكربون المعدل في طبق بتري، عن طريق خلط مسحوق الغرافيت بعناية مع الزوج الأيوني بنسب متفاوتة ثم إضافة الملدن بنسب مختلفة وأنواع متعددة والخلط جيداً لتتشكل العجينة. ليتم بعد ذلك حفظ العجائن الناتجة لمدة 42 ساعة بدرجة حرارة البراد [52].

5–تشكيل خلية المسرى: تمت تعبئة العجائن ضمن أنبوب أسطواني بلاستيكي هو عبارة عن محقنة سعتها 1ml ذات طرف مقصوص، مزودة بمكبس يُلف عليه سلك من النحاس كناقل كهربائي. كُبست العجائن على سطح زجاجي أملس ودُفع جزء منها إلى الخارج، ثم أزيلت العجينة الخارجة لكشف طبقة جديدة من العجينة على طرف المسرى. تم بعد ذلك صقل سطح العجينة بورق الترشيح حتى لمعان سطح عجينة الكربون [52].
تم تشكيل خلية القياس من خلال وصل المسرى المقترح والمسرى المقارن بمقياس فولط وغمس المسريين بالمحلول المدروس لتتشكل الخلية:
مسرى الكالوميل المقارن/ محلول القياس /مسرى عجينة الكربون المعدل

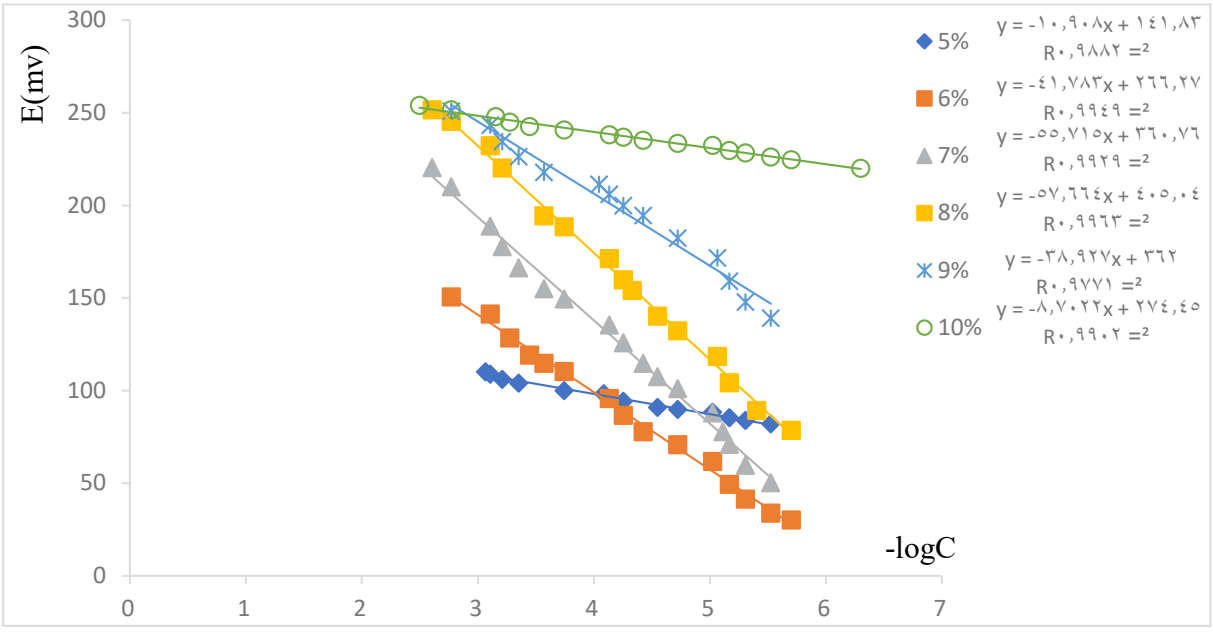
النتائج

دراسة تأثير مكونات عجينة الكربون

تمت دراسة تأثير المكونات على استجابة المسرى المقترح بدرجة حرارة الغرفة الجدول (1)، ورسم تغيرات الاستجابة الكمونية للمساري المدروسة كتابع للتركيز المولاري للفيتامين ضمن مجال تراكيز يتراوح بين mol/L (5×10^{-3}–5×10^{-7}) باستعمال DBP كمادة ملدنة بدايةً، حيث خُلط الزوج الأيوني بنسبة تراوحت بين % (10–1) مع كل من المادة الملدنة ومسحوق الغرافيت بنسبة (1:1) (وزن:وزن). كُررت كل تجربة ثلاث مرات وأخذ المتوسط الحسابي.لوحظ من الجدول(1) ، أن المسرى لا يبدي أي استجابة عندما كانت نسبة الزوج الأيوني أقل من 5%، ثم بدأت استجابة ضعيفة وكانت أفضل استجابة عند نسبة زوج أيوني 8%، حيث أعطى المسرى أفضل ميل نرنستي 57.664 mv/decade ضمن مجال خطي يتراوح بين mol/L (1.99×10^{-6}–2.47×10^{-3}).

الجدول (1): تأثير تغير نسبة الزوج الأيوني على الاستجابة النرنستية للمسرى المقترح بدرجة حرارة الغرفة، الملدن المستخدم DBP.

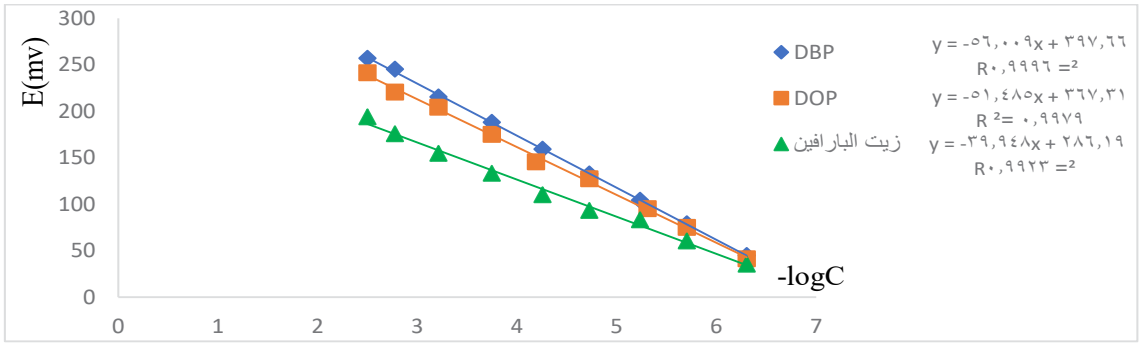
الرقم	التركيب			الميل النرنستي mv/ decade	المجال الخطي mol/L
	نسبة الزوج الأيوني %	نسبة مسحوق الغرافيت%	نسبة الملدن DBP%		
1	0	50	50	—	—
2	1	49.5	49.5	—	—
3	3	48.5	48.5	—	—
4	5	47.5	47.5	10.908	2.98×10^{-6}-8.59×10^{-4}
5	6	47	47	41.783	1.99×10^{-6}-1.69×10^{-4}
6	7	46.5	46.5	55.715	2.98×10^{-6}-2.47×10^{-3}
7	8	46	46	57.664	1.99×10^{-6}-2.47×10^{-3}
8	9	45.5	45.5	38.927	2.98×10^{-6}-1.69×10^{-3}
9	10	45	45	8.7022	4.99×10^{-7}-3.19×10^{-3}



الشكل ١ :تأثير تغير نسبة الزوج الأيوني على الاستجابة النرنستية للمسرى المقترح بدرجة حرارة الغرفة.النسبة المثلى 8%، الملدن المستخدم DBP

تأثير نوع الملدن المستعمل

لدى دراسة تأثير الملدن المستعمل عند درجة حرارة الغرفة، ونسبة زوج أيوني 8% على استجابة المسرى، لوحظ تميز الملدن DBPعلى باقي الملدنات حيث أعطى أقرب قيمة للميل النرنستي الشكل (2). إذ تمت الدراسة باستعمال ثلاث ملدنات [29,30,32]



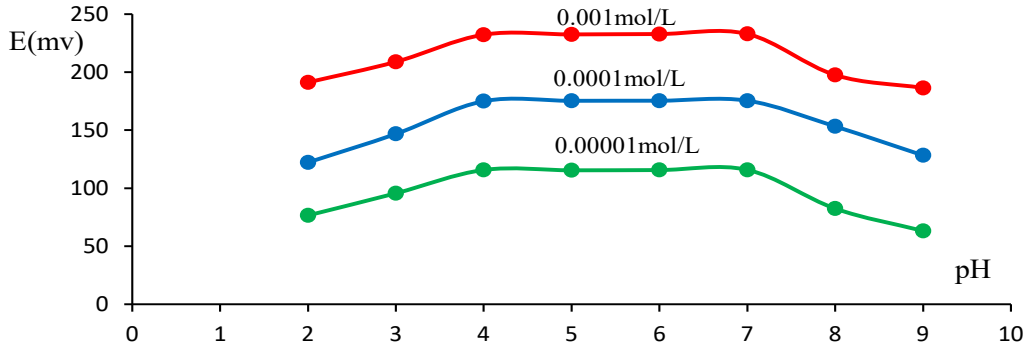
الشكل ٢ :تأثير نوع الملدن على الاستجابة النرنستية للمسرى المقترح عند نسبة زوج أيوني 8% وبدرجة حرارة الغرفة

الجدول(2): خصائص الملدنات المستعملة

المادة الملدنة Plasticiser	الصيغة المجملة	الذوبان في الماء mg/L	الوزن الجزيئي g/mol	الكثافة g/ml	ثابت العزل الكهربائي	اللزوجة mpa.s/20◦C
ثنائي بوتيل فتالات Dibutyl phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$	11.2	278.00	1.043	6.4	20
ثنائي أوكتيل فتالات Dioctyl phthalate	$C_{26}H_{38}O_4$	0.02	391.00	0.985	5.1	78.73
برافين Paraffin	———	غير ذائب عملياً	———	0.85	1.9-2.5	100-200

تأثير Hp الوسط

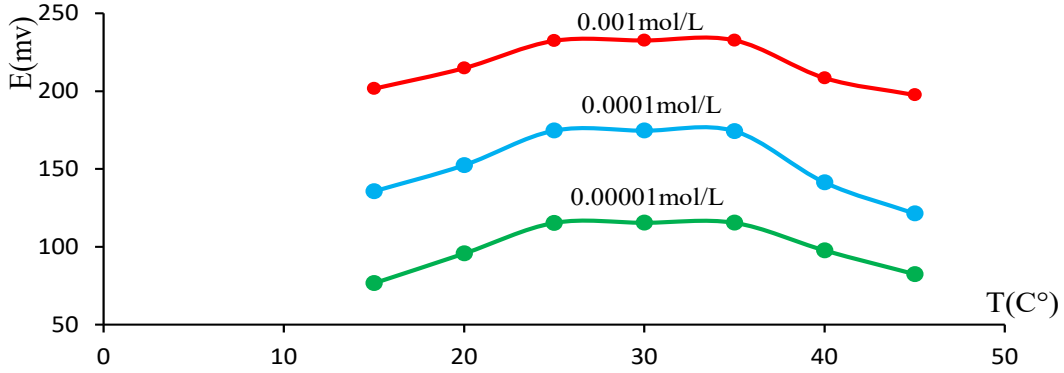
تمت دراسة تأثير تغير قيمة pH الوسط على استجابة كمون المسرى المقترح على تراكيز مختلفة من فيتامين B_{12} وهي (1×10^{-3}, 1×10^{-4} mol/L) عن طريق غمر المسرى المقترح بوجود مسرى 1×10^{-5}, pH ضمن المحاليل المدروسة، حيث تم تغيير قيمة pH الوسط باستخدام NaOH و HCl بتركيز (1−0.1)mol/L بمقدار درجة واحدة، وقياس قيمة الكمون الموافق ثم رسم المنحني البياني لكل تركيز مدروس. يبين الشكل(3) أن الكمون يبقى ثابتاً ضمن مجال (7−4)=pH .



الشكل ٣:تأثير تغير pH الوسط على الاستجابة النرنستية للمسرى المقترح عند نسبة زوج أيوني 8٪، وملدن DBP وبدرجة حرارة الغرفة

تأثير درجة الحرارة

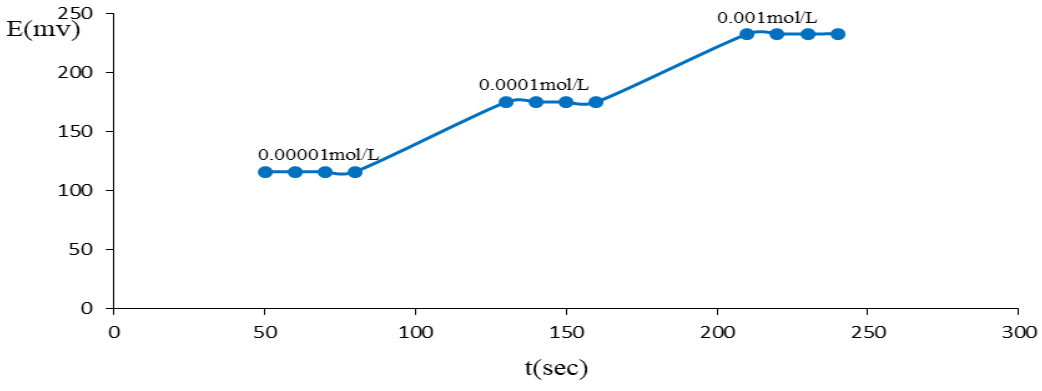
دُرس تأثير تغير درجة الحرارة على استجابة المسرى المقترح ضمن مجال حراري تراوح بين ^{0}C (15–45)على محاليل بتراكيز مختلفة من فيتامين B_{12} وهي mol/L (1×10^{-3}, 1×10^{-4} ,1×10^{-5}) وذلك بمراقبة التغير الحراري، ولوحظ من خلال الشكل (4) أن المسرى يُعطي استجابة جيدة ضمن مجال درجة حرارة^{0}C (25-35)، حيث لم يُلحظ تغير ملحوظ على قيمة الكمون ضمن هذا المجال.



الشكل٤:تأثير تغير درجة حرارة الوسط على الاستجابة النرنستية للمسرى المقترح عند نسبة زوج أيوني 8%، وملدن DBP

زمن الاستجابة وحياة المسرى

حُدد زمن استجابة المسرى المقترح بقياس الزمن اللازم لبلوغ الكمون قيمة ثابتة ضمن محاليل مختلفة التركيز لفيتامين B_{12} ($1\times10^{-}$ mol/L (1×10^{-5} ,1×10^{-4} ,^{3}، ولوحظ أن الكمون يصل لقيمة ثابتة بحوالي 50sec الشكل (5)، كما أن زمن الاستجابة لايتغير سواء تم نقل المسرى من تركيز مرتفع إلى تركيز منخفض أو العكس. كذلك تمت مراقبة تغيرات الخصائص التحليلية للمسرى المقترح حيث تم تحضير سلسلة عيارية بشكل يومي مع مراقبة تغيرات الكمون والميل النرنستي [26]، ولُحظ إمكانية استخدامه لمدة شهر من دون أن يحدث تغيير يذكر في خصائصه، حيث بقي زمن استجابته ثابتاً وكذلك حافظ على قيمة ثابتة للميل النرنستي.



الشكل٥:تأثير الزمن على استجابة المسرى المقترح عند نسبة زوج أيوني 8%، وملدن DBP وبدرجة حرارة الغرفة

الجدول (3): قيم معاملات الانتقائية الكمونية للمسرى المقترح المقاسة بطريقة الكمون الموافق

الأيون المعيق	معامل الانتقائية
B_6	1.25×10^{-3}
B_1	1.67×10^{-3}
Cu^{2+}	1.18×10^{-3}
K^{+}	1.25×10^{-4}
Na^{+}	2.5×10^{-4}
Zn^{2+}	8.89×10^{-4}
Mg^{2+}	5.71×10^{-4}

ويتضح من خلال الجدول (3) أن قيم معاملات الانتقائية الكمونية صغيرة، وبالتالي فإن المسرى المقترح يبدي انتقائية عالية لفيتامين B_{12} بوجود عدد من الأيونات المعيقة.

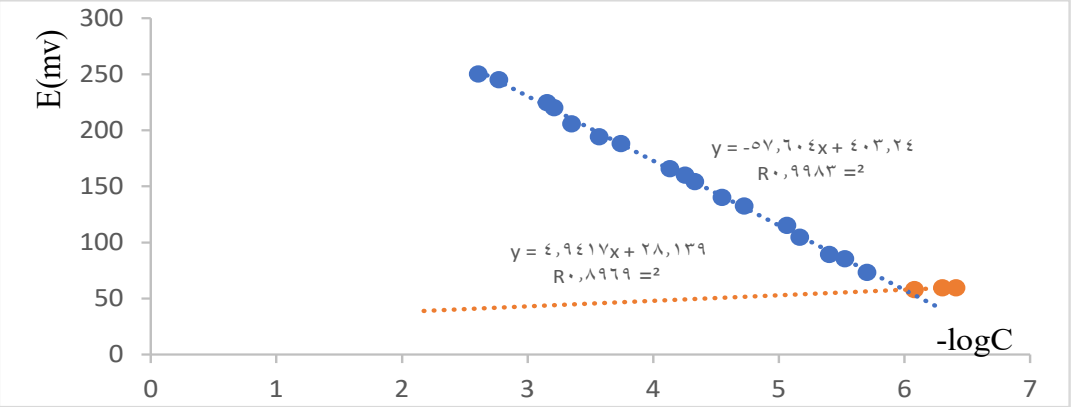
انتقائية المسرى

تُعد معاملات الانتقائية لكل مسرى جديد أحد أهم الخصائص التحليلية، لذلك حُسبت معاملات الانتقائية الكمونية للمسرى المقترح باستخدام طريقة الكمون الموافق، إذتمت إضافة 0.5 ml من الأيون المدروس إلى المحلول العياري للأيون A معلوم الفعالية $a_A=1\times10^{-2}$mol/L ذي الفعالية الثابتة 1×10^{-5}A المدروس خمس مرات a_A= 1×10⁻⁵ mol/L وقياس فرق الكمون في كل مرة حيث تم تسجيل التغير الكموني ΔE الموافق المعلوم B، ثم تمت إضافة حجوم من الأيون المعيق ذي الفعالية A إلى المحلول العياري للأيون المدروس B الفعالية a_B حتى تم تسجيل التغير الكموني نفسه، علماً أنه تم تحضير a_A المحاليل العيارية الأم للأيونات المعيقة بتركيز 1×10^{-2} mol/L ثم حساب معامل الانتقائية من خلال العلاقة التالية(31)

$$K_{AB}^{pot}=\frac{(a_A^{`}-a_A)}{a_B}$$

التطبيقات العملية

تم استخدام المسرى المقترح بنجاح لتحديد تركيز فيتامين B_{12} في العينات العيارية والعينات الواقعية بالاعتماد على الجزء الخطي المفيد تحليلياً من المنحني العياري للمسرى المقترح وتحديد حد الكشف التحليلي الشكل (6). تم إجراء القياسات ثلاث مرات (n=3)، تم بعد ذلك التأكد من صحة ودقة الطريقة عن طريق القيام بالدراسة الإحصائية للنتائج.



الشكل٦ :الخط البياني المتبع لتحديد حد الكشف التحليلي

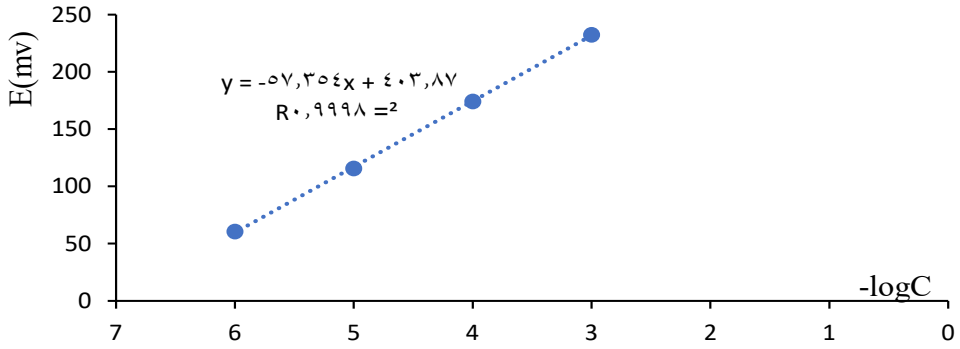
الجدول (4): تحديد تركيز فيتامين B_{12} في محاليله المائية النقية بوساطة خلية المسرى المقترح:

القيمة المأخوذة mol/L	القيمة المتوسطة المقاسة mol/L	الاسترجاعية %	الانحراف المعياري SD mol/L	الانحراف المعياري المئوي RSD%	حد الكشف التحليلي mol/L
1×10^{-6}	1.056×10^{-6}	105.6	2.887×10^{-9}	0.237	1×10^{-6}
1×10^{-5}	9.58×10^{-6}	95.8	2.05×10^{-8}	0.214	
1×10^{-4}	9.937×10^{-5}	99.37	1.247×10^{-7}	0.126	
1×10^{-3}	1.017×10^{-3}	101.7	2.494×10^{-6}	0.245	

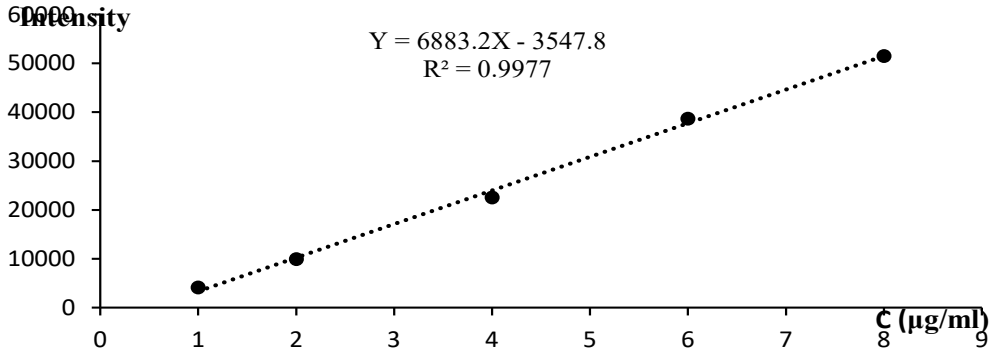
يُبين الجدول (4) دقة الطريقة المتمثلة بالقيم المنخفضة للانحراف المعياري والمعياري المئوي، وصحتها متمثلة بالاسترجاعية التي لا تتجاوز الحد المسموح

التطبيق على عينات واقعية

تم تحضير سلسلة عيارية من الفيتامين ضمن مجال تراكيز mol/L (1×10^{-3}–1×10^{-6}) ورسم الخط البياني الذي يمثل العلاقة بين الكمون واللوغاريتم السالب للتركيز.



الشكل٧:المنحني العياري لتحديد تركيز فيتامين B12 باستخدام المسرى المقترح



الشكل٨:المنحني العياري لتحديد تركيز فيتامين B12 بتقانة HPLC

الجدول (5): تحديد تركيز فيتامين B_{12} في العينات الدوائية بوساطة خلية المسرى المقترح عند درجة حرارة 25°C و (n=3):

تركيز الفيتامين في العينة µg	التركيز المقاس بالطريقة المقترحة µg	الاسترجاعية%	الانحراف المعياري SD (µg)	الانحراف المعياري المئوي RSD
مضغوطة 200 µgتحتوي سيانوكوبالامين	205.2	102.6	0.0035	0.342
أمبولة تحتوي 1000µg سيانوكوبالامين	969	96.9	0.0026	0.273

ثم تم قياس العينات باستخدام المسرى المقترح وتحديد تركيز الفيتامين الجدول(5) . تم بعد ذلك تحديد تركيز الفيتامين لنفس العينات المختارة بطريقة مرجعية [27]، حيث تعتمد الطريقة المرجعية على تقانة HPLC عند طول موجة 360nm، تم استخدام ميتانول: ماء بنسبة % (40:60) كطور متحرك، وسرعة تدفق 1ml/min. تم تحضير محلول أم من الفيتامين بتركيز 100µg/ ml عن طريق إذابة 10mg من الفيتامين في 100ml ماء مقطر. ثم تم تحضير سلسلة عيارية بتراكيز تراوحت بين µg/ml (8-1)، والترشيح بمراشح µm 0.45، ثم القياس ورسم لخط البياني الناتج. ثم تم بعد ذلك ترشيح العينات الدوائية المحضرة بمرشح µm 0.45 وحقنها وتحديد تركيزها، ثم مقارنة نتائج الطريقتين عن طريق حساب معاملي فيشر وستودنت كما هو موضح في الجدول (6).

الجدول (6): مقارنة النتائج بين الطريقتين المقترحة والمرجعية بتقانة HPLC:

العينة	تركيز B_{12} بالطريقة المرجعية µg			تركيز B بالطريقة المقترحة µg	معامل فيشر	معامل ستودنت
	التركيز	t_R	Area			
محلول عينة المضغوطات 200 µgتحتوي سيانوكوبالامين	205.2	2.060	29268	206.6	1.947	2.223
أمبولة تحتوي 1000 µgسيانوكوبالامين	969	2.053	23131	972	2.286	0.918
عند سوية ثقة 95% وعدد درجات حرية=f=22قيمة معامل فيشر الجدولية عند					19.00	
عند سوية ثقة 95% وعدد درجات حرية=f=22قيمة معامل ستودنت الجدولية عند						4.303

لوحظ من خلال الجدول (6) توافقاً جيداً بين النتائج التي تم الحصول عليها بالطريقة المقترحة ونتائج الطريقة المرجعية بتقانة HPLC، حيث أن قيمة معاملي "فيشر" و"ستودنت" للعينات لم تتجاوز القيمة النظرية المجدولة في المراجع عند درجتي حرية، مما يدل على عدم وجود فروق معنوية بين الطرائق المذكورة عند سوية الثقة المذكورة، ويُعتبر هذا مؤشراً على إمكانية اعتماد الطريقة المقترحة كطريقة تحليلية لتحديد تركيز فيتامين B_{12} في مركباته وأشكاله الدوائية.

المقارنة مع الدراسات السابقة

تمت مقارنة النتائج مع الدراسات السابقة كما هو موضح في الجدول (7).

الجدول (7): مقارنة الطريقة المقترحة مع الدراسات السابقة

الرقم	المادة الفعالة	تقنية المسرى	المجال الخطي mol/L	الميل mv/decade	زمن الاستجابة sec	حد الكشف mol/L	مجال pH	رقم المرجع
1	B_{12}-phosphotungestate	PVC	1×10^{-5}- 1×10^{-2}	54	30	5×10^{-6}	3-8	16
2	B_{12}-phosphomolybdate	PVC	5×10^{-6}–1×10^{-2}	55.4	30	2.5×10^{-6}	3-8	16
3	B12-Ammonium reineckate	PVC	1×10^{-7}- 1×10^{-4}	58.2	10	2×10^{-8}	1-3	17
4	B12-phosphomolybdate	عجينة الكربون	1.99×10^{-6}-2.47×10^{-3}	57.664	50	1×10^{-6}	4-7	هذا البحث

المناقشة

تم تحضير مسرى عجينة الكربون من مسحوق الغرافيت مع ملدن، إذ يوفر هذا النوع من المساري سطحاً قابلاً للتجديد بسهولة، كما تتمتع هذه المساري بسهولة التحضير بسبب سهولة الحصول على معاجين كربون بأقل التكاليف. تبين من خلال دراسة نسبة المادة الفعالة المثلى أن المسرى يُبدي أفضل استجابة عند نسبة مادة فعالة 8% بوجود ملدن DBP حيث أعطى المسرى قيمة ميل نرنستي الأقرب وهي 57.664) mV/decade)، ضمن مجال تراكيز يتراوح بين 1.99×10^{-6}-2.47×10^{-3})mol/L). تم بعد ذلك اختبار الملدن الأمثل إذ يلعب الملدن دوراً هاماً في تحسين خصائص المسرى الانتقائي لما له من دور في مرونة عجينة الكربون، ويساعد في توزيع المكونات بشكل متجانس وبالتالي يساعد في حركة الأيونات ضمن العجينة. وعند اختبار الملدن الأمثل لوحظ أن المسرى المعتمد على ملدن DBP أعطى أفضل استجابة وأقرب ميل للميل النرنستي وذلك لأنه يتمتع بقطبية أعلى ولزوجة أقل مقارنة بالملدنات المستخدمة بالبحث (الجدول (2)) وهذا ما أكده تناقص قيم الميل النرنستي (الشكل (2)) حيث كانت أعلى مايمكن لدي استخدام الملدن DBP وأقل ما يمكن للزيت البارافيني، علماً أن DBP يتمتع بقطبية متوسطة ولزوجة منخفضة نسبياً مقارنة بملدنات مرجعية أخرى، مما يوفر وسطاً عضوياً متوافقاً مع الزوج الأيوني بالمقارنة مع باقي الملدنات كما يوفر حركة حرة للزوج الأيوني داخل العجينة [25–23]، أما بالنسبة لدراسة تأثير درجة الـpH لوحظ أن مجال الـpH الأمثل يتراوح بين (7–4) حيث لوحظ انخفاض في قيمة الكمون قبل الـ4 وذلك بسبب أيونات الهيدروجين التي تلعب دور أيون معيق، ذلك نظراً لصغر الحجم الأيوني الفائق للهيدروجين وارتفاع حركيته الكهروكيميائية، حيث يتنافس بشكل مباشر مع جزيئات فيتامين B12 الكبيرة على مراكز التبادل الأيوني في غشاء المسرى، مما يسبب حياداً عن السلوك النيرنستي وقصوراً في جهد الاستجابة الفعّال. بينما بقيت قيم الكمون ثابتة ضمن مجال (7–4) لتعود وتنخفض قيمة الكمون بعد الـ7 بسبب تحلل مجموعات الأميد في فيتامين B12 وتحول الفيتامين من الشكل الأيوني إلى الشكل غير الأيوني مما يخفض الكمون، إضافة إلى أنّه عندما تهاجم أيونات OH^- أيونات الموليبيدات على سطح المسرى تؤدي إلى تفككها وتحللها وتحولها إلى أيونات فوسفات وموليبيدات بسيطة [28]. وبدراسة تأثير درجة الحرارة لوحظ أن المجال الأمثل (35–25^{0}C) حيث بقيت قيمة الكمون ثابتة ضمن هذا المجال. أما عند درجات حرارة أقل تزداد لزوجة الملدن وهذا يقلل حركة الأيونات داخل العجينة، وبرفع درجة الحرارة فوق المجال يبدأ الملدن بالتسرب من داخل العجينة إلى المحلول مما يؤدي إلى تخرب المسرى، إذ تبين الدراسات أن قيم لزوجة DBP بتغير درجة الحرارة هي كالتالي: [ŋ=12.9 mpa.s] ,30°C [ŋ=20mpa.s] (20°C 50°C[ŋ=6.9mpa.s]) [26,29,30]. بالنسبة لزمن الاستجابة، لوحظ من خلال الدراسة أن زمن الاستجابة حوالي 50sec ولم يتغير الزمن عند الانتقال بين التراكيز سواء المنخفضة أو المرتفعة، كما حُدد عمر المسرى بشهر إذ لم يُلحظ تغير في خصائص المسرى والميل النرنستي خلال هذه المدة. ولوحظ بحساب معامل الانتقائية بطريقة الكمون الموافق، أن المسرى المقترح يبدي انتقائية عالية لفيتامين B_{12} بوجود عدد من الأيونات المعيقة، إذ كانت قيم معاملات الانتقائية منخفضة إذ يجب أن يكون معامل الانتقائية أقل من 1 [31]. تم تطبيق المسرى المقترح على عينات عيارية وحساب المعاملات الإحصائية، فلوحظ من خلال القيم المنخفضة للانحراف المعياري والمعياري المئوي دقة الطريقة، ومن خلال قيم الاسترجاعية التي لم تتجاوز الحد المسموح صحة الطريقة. كما تم حساب حد الكشف وكان1×10^{-6} mol/L تمت مقارنة النتائج التي تم التوصل إليها بالطريقة المقترحة للعينات الدوائية مع نتائج طريقة مرجعية [27] تعتمد على تقنية HPLC ولوحظ من خلال حساب معاملي فيشر وستودنت عدم وجود فروق معنوية بين الطريقتين وبالتالي إمكانية

CC BY

استخدام الطريقة المقترحة لتحديد تركيز فيتامين B_{12} في العينات النقية والدوائية. تمت مقارنة النتائج مع الدراسات السابقة ولوحظ أن المسرى المقترح يوازي ويضاهي في بعض الشروط باقي الدراسات.

الاستنتاجات والتوصيات

تم تصنيع مسرى انتقائي جديد لفيتامين B_{12} ودراسة شروطه التحليلية والتقنية. تتمتع الطريقة المتبعة في تصنيع المسرى بصحة ودقة وموثوقية من خلال حساب المعاملات الاحصائية. تم التطبيق على عينات واقعية صيدلانية. تم تقييم المسرى المقترح من خلال مقارنة نتائجه بنتائج طريقة مرجعية وحساب معاملي فيشر وستودنت، فكانت ضمن الحدود المعتمدة. أظهرت النتائج أن المسرى المقترح يضاهي الدراسات المرجعية وأفضل منها في بعض الشروط. اعتماد المسرى الجديد المصنع كطريقة تحليلية دقيقة في مخابر الدراسات الاولى والعليا. اعتماد هذا المسرى في مخابر المراقبة الدوائية. توسيع نطاق البحث في تقدير باقي فيتامينات B–complex.

المراجع

1.Barker T. Vitamins and human health: systematic reviews and original research. Nutrients. 2023; 15.13: 2888.
2.Hanna M, Jaqua E, Nguyen V,Clay J. B Vitamins: functions and uses in medicine. Perm J.2022; 26.2: 89-97
3.Mantareva V, Iliev I, Sulikovska I. Cyanocobalamin (vitamin B12) as insensitive porphyrinoid to solar LED irradiation. Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing. 2023; p. 012023.
4.Azzini E, Raguzzini A, Polito A. A brief review on vitamin B12 deficiency looking at some case study reports in adults. International Journal Of Molecular Sciences. 2021; 22.18: 9694.
5.El Hasbaoui B, Mebrouk N, Saghir S, El Yajouri A, Abilkassem R, Agadr A. Vitamin B12 deficiency: case report and review of literature. The Pan African Medical Journal. 2021; 38: 237.
6.Ibrahim L. Isocratic liquid chromatography technique for the analysis of cyanocobalamin from beef liver and heart muscle extracts. Turkish Journal of Analytical Chemistry. 2024;6.2:102-107.
7.Ibrahim L, Aminu U. A simple and rapid RP-HPLC method for the assessment of cobalamin (vitamin B12) in tilapia and snoek fishes. Turkish Journal of Chemistry. 2022; 46.2: 320-329.
8.Lee W, Lee Y, Haeng Huh M, Kwon Choi J. Determination of the Chemical Stability of Cyanocobalamin in Medical Food by a Validated Immunoaffinity Column-Linked HPLC Method. Journal of Food Quality. 2022; 2022.1: 1619936.
9.Lohrdy M, Sohrabi M, Davallo M. A simple UV spectrophotometric method based on continuous wavelet transform and multivariate calibration model for the concurrent analysis of three water-soluble vitamins in fertility supplements. Journal of AOAC International. 2024; 107.1: 164-176.
10.Altunay N, Elik A, Aydin D. Feasibility of supramolecular nanosized solvent based microsyringe-assisted liquid-phase microextraction for preconcentration and separation of Vitamin B12 from infant formula, food supplement, and dairy products: Spectrophotometric analysis and chemometric optimization. Microchemical Journal. 2021; 165: 106105.
11.Huang L, Tian S, Zhao W, Liu K, Guo J. Electrochemical vitamin sensors: A critical review. Talanta. 2021; 222: 121645.
12.Parvin M H, Azizia E, Arjomandia J, Lee J Y. Highly sensitive and selective electrochemical sensor for detection of vitamin B12 using an Au/PPy/FMNPs@ TD-modified electrode. Sensors and Actuators B: Chemical. 2018; 261: 335-344.
13.Michopoulos A, Florou A B, Prodromidis M I. Ultra-sensitive determination of vitamin B12 using disposable graphite screen-printed electrodes and anodic adsorptive voltammetry. Electroanalysis. 2015; 27.8: 1876-1882.
14.Tian CH, Zhao N, Jiang X, Wan D , Xie Y. Facile detection of vitamin B12 with copper oxide nanocrystal graphenic composite electrode. Water. 2021; 13.13: 1790.
15.Pereira D F, Santana E R, Piovesan J, Spinelli A. A novel electrochemical strategy for determination of vitamin B12 by Co (I/II) redox pair monitoring with boron-doped diamond electrode. Diamond and Related Materials. 2020; 105: 107793.
16.Abdoon F M, Khaleel A I, El-Tohamy M F. Electrochemical sensors for direct determination of cyanocobalamin using separated and mixed electroactive materials. International Journal of Medicinal Chemistry & Analysis. 2015; 5: 50-7.
17.Ramadan N K, Marianne N, El Zanfaly E S. Membrane electrodes for the simultaneous determination of vitamins B. 2010; 2(2): 78-87.
18.Jalali M R, Hajiaghababaei L, Najafpour J, Suzangarzadeh S. 1-(6-cholorquinoxaline-2-yl) Hydrazine as an excellent ionophore for preparation of a cobalt selective electrode and potentiometric measuring of vitamin B12 in pharmaceutical samples. Analytical & Bioanalytical Electrochemistry. 2018; 10(6): 675-698 .
19.Singh R, Gupta R, Bansal D, Bhateria R, Sharma M. A review on recent trends and future developments in electrochemical sensing. ACS Omega.2024; 9(7): 7336-7356.
20.Baranwal J, Barse B, Gatto G, Broncova G, Kumar A. Electrochemical sensors and their applications: A review. Chemosensors. (2022); 10(9): 363.
21.Vytřas K, Švancara I, Metelka R. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. Journal of the Serbian Chemical society.(2009); 74(10): 1021-1033.
22.Gao L, Tian Y, Gao W, Guobao X. Recent developments and challenges in solid-contact ion-selective electrodes. Sensors. 2024; 24.13: 4289.
23.Abu-Dalo M A, Al-Rawashdeh NAF, Al-Mheidat IR, NS Nassory. Construction of uranyl selective electrode based on complex of uranyl ion with new ligand carboxybenzotriazole in PVC matrix membrane. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP publishing. 2025;96;012023.
24.Freitas F, Cabrita MJ, da Silva M G. A Critical Review of Analytical Methods for the Quantification of Phthalates Esters in Two Important European Food Products. Molecules. (2023); 28(22):7628.
25.Issa Y M, Khalil M M, Zayed S I M, Mustafa N. Potentiometric determination of oxymetazoline hydrochloride using modified carbon paste electrodes. Port Electrochim Acta. 2021; 39: 381-392.
26.Shawish H M A, Saadeh S M, Al-kahlout S T. PVC membrane, coated-wire, and carbon-paste electrodes for potentiometric determination of vardenafil hydrochloride in tablet formulations and urine samples. Sensors International. (2022); 3: 100175.
27.Singh R, Popli H, Suryawanshi M. Development and validation of an HPLC analytical method for the simultaneous estimation of vitamin B12 and folic acid. Essential Chem.2025; 2.1: 1-9.
28.Ahmad I, Hafeez A, Akhter N, Vaid F H M, Qadeer K. Effect of riboflavin on the photolysis of cyanocobalamin in aqueous solution. Open Anal Chem J. 2012; 6.1: 22-27.
29.Cook R L, King Jr H E, Herbst C A, Herschbach D R. Pressure and temperature dependent viscosity of two glass forming liquids: glycerol and dibutyl phthalate. The Journal of chemical physics. 1994; 100(7): 5178-5189.
30.Chervonenkis A A, Chalykh A E. Correlation of mo-

lecular shape and structure with kinetic and physical-chemical properties of complex phthalate liquids. Journal of Molecular Liquids. 2001;93(1-3): 43-46. 31.Radić J, Perovi´c D, Gri˘car E, Kolar M. Potentiometric determination of maprotiline hydrochloride in pharmaceutical and biological matrices using a novel modified carbon paste electrode. Sensors. 2022; 22.23: 9201. 32.Mylona S K, Assael M J, Antoniadis K D, Polymatidou S K, Karagiannidis L. Measurements of the viscosity of bis (2-ethylhexyl) sebacate, squalane, and bis (2-ethylhexyl) phthalate between (283 and 363) K at 0.1 MPa. Journal of Chemical & Engineering Data.2013; 58(10), 2805-2808

التمويل: جامعة اللاذقية

مساهمات المؤلفين:هبة ناصر: الإطار المفاهيمي:المنهجية الرياضيةإنجاز التجارب المخبرية العملية، معالجة الرسوم البيانية، استخراج العلاقات الرياضية والاحصائية، اعتماد أسلوب البحث العلمي التطبيقي القائم على تصنيع مسرى انتقائي جديد لفيتامين B12 ودراسة معاييره التحليلية (نسبة المادة الفعالة، تأثير الملدن، تأثير pH الوسط، تأثير درجة الحرارة، الانتقائية) وتقييم خصائصه التشغيلية(زمن الاستجابة، عمر المسرى) وتطبيق المسرى على المادة النقية والدوائية ، التحقيقات والدراسة المرجعية: اجراء المسح المرجعي الشامل ومقارنة الأداء التحليلي للمسرى المقترح مع الدراسات والتقانات المرجعية السابقة. الكتابة –المسودة الأصلية. الكتابة –المراجعة والتحرير.

هاجر ناصر: الإشراف العلمي، المراجعة والتحرير ،إدارة المشروع، الكتابة –المسودة الأصلية.

تضارب المصالح:»يعلن المؤلفون أنه ليس لديهم أي مصالح متضاربة».

توافر البيانات والمواد:»جميع البيانات متوفرة في النص الرئيس أو في المواد التكميلية»