كلية الصيدلة – جامعة دمشق

قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية

المـراقبـة الـدوائـيـة

الجزء النظري

المحاضرة الثالثة

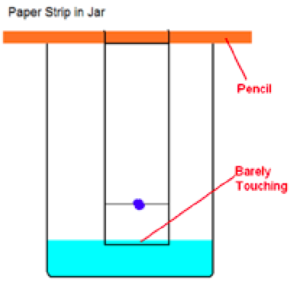
طرائق الفصل

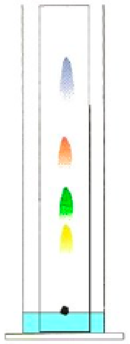
Separation Methods

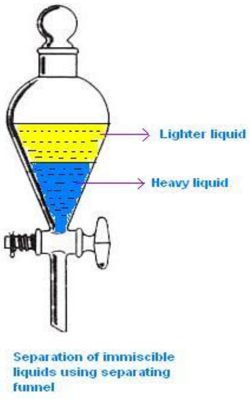
د. باسمة عروس

طرائق الفصل

Separation Methods







مقدمة:

- عملية فصل مزائج المواد الدوائية من أهم أعمال المحلل المشتغل بمراقبة الجودة.
- الأشكال الصيدلانية والمنتجات نصف المصنعة هي مزائج لمواد دوائية فعالة مع مواد مساعدة.
- الشرط الأساس لإجراء عملية فصل مزيج ما هو اختلاف الصفات الكيميائية والفيزيائية والفيزيوكيميائية لمكونات المزيج.
- قد تتطلب عملية الفصل عادة عملية تنقية Purification لاحقة.
- يمكن أن تجري مقايسة وتحليل المواد الدوائية ضمن الأشكال الصيدلانية مباشرة دون اللجوء إلى عمليات فصل معقدة.
- في بعض الأحيان يتطلب التحليل والمقايسة القيام بعملية فصل بسيطة للمواد الفعالة من الشكل الصيدلاني.
- في معظم الأحيان لا بد من إجراء عمليات فصل معقدة نسبياً .
- قد يحوي الشكل الصيدلاني مادة فعالة وحيدة أو عدة مواد فعالة مما يجعل عملية الفصل أكثر تعقيداً.

بعض التوجيهات العامة لفصل المواد الفعالة عن أشكالها الصيدلانية:

1- الأقراص Tablets

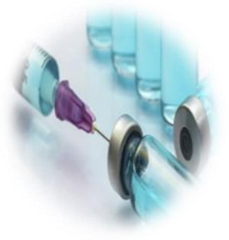
- تسحق الأقراص بشكل جيد ويجانس حجم الجسيمات.
- تؤخذ وزنة محددة بدقة.
- تجري عملية استخلاص المادة أو المواد الفعالة بأحد المذيبات المناسبة.
- يمكن استخدام مزيج مذيبات تبعاً للذوبانية الأفضل.
- يستخدم بشكل واسع الميتانول والإيتانول كمذيبين عامين لأغلب المواد الدوائية.
- تجري عملية ترشيح بسيطة.
- يمكن بعد ذلك إجراء المقايسة مباشرة على الرشاحة أو يبخر المذيب أو يقطر ثم يستبدل بمذيب أكثر ملاءمة للمادة أو لمزيج المواد المراد مقايستها.
- تطبق في أكثر الأحيان طرائق الاستشراب لفصل المواد الدوائية خاصة TLC وLC .

2- الأقراص الملبسة Coated Tablets

- إذا كانت مادة التلبيس تشوش المقايسة كتغيير اللون أو pH فلا بد من التخلص من هذه الطبقة بطريقة ملائمة وبعناية فائقة.
- مسح الطبقة الملبسة بقطعة قطن مرطبة بمذيب ملائم (ماء،حمض ممدد، هيدروكسيد الصوديوم الممدد).
- تقشير الطبقة باستخدام أداة مدببة.
- استخدام طرائق الاستشراب المختلفة بشكل واسع قلل من استخدام الطرائق الفيزيائية لإزالة مادة التلبيس.

3- المحاليل Solutions

- المحاليل قد تكون مائية أو كحولية.
- تشمل الأشكال السائلة كافة كالمحاليل الحقنية والقطورات العينية والأنفية، والأذنية وكذلك المحاليل السكرية كالأشربة.
- في أغلب الأحيان يجري التحليل أو المقايسة مباشرة على المحلول أو يجري الاستخلاص مباشرة باستخدام مذيبات مختلفة.
- إذا تأثر التحليل أو المقايسة بالمحتويات الأخرى للمحلول فالأمر يتطلب إجراء عملية فصل بسيطة تشمل التخلص من المذيب إما بالتجفيف أو التقطير أو الاستخلاص بمذيب لا يمتزج مع المحلول الأساسي.



- إذا كانت المواد الدوائية تتأثر بالحرارة فيمكن إجراء التقطير بالخلاء، ثم إذابة المادة بمذيب مناسب للمقايسة، أو بإجراء الاستخلاص.
- يستخدم بشكل واسع HPLC.

4- المراهم والتحاميل ذات القواعد الدسمة

Ointments and Suppositories “Fatty Bases”

- إذا كانت المواد الدوائية من طبيعة قطبية تذاب كمية موزونة بدقة من المرهم أو التحاميل بحجم ملائم من ايثر البترول أو أي مذيب آخر ملائم لخواص القواعد الدسمة. يمكن الاستعانة بالحرارة اللطيفة على حمام مائي بعدها يمكن إجراء استخلاص المواد الدوائية بالمذيبات القطبية.
- يمكن إضافة شمع البارافين Paraffin Wax إلى كمية موزونة بدقة من المرهم وتوضع في بوتقة بورسلانية، ثم يضاف حمض ضعيف أو قلوي ضعيف أو الماء بحسب طبيعة المواد الفعالة، ثم يسخن حتى الانصهار، يترك بعدها للتبريد فتتصلب القواعد الدسمة. تجري إبانة أي فصل للطبقة المائية أو ترشح ثم تعامل كالمحلول. تعاد العملية عدة مرات حتى تستخلص كامل كمية المادة أو المواد الفعالة.
- في حال المراهم الحاوية على مواد لا عضوية كمرهم أوكسيد الزنك يؤخذ كمية محددة من المرهم في بوتقة بورسلانية ويضاف إليها حمض النتريك الممدد ثم يسخن. يبرد بعد ذلك ثم يضاف مذيب عضوي لإذابة القواعد الدسمة التي تفصل بالإبانة لتبقى المواد اللاعضوية على شكل راسب.

5- المستحلبات والكريمات الاستحلابية Emulsions and Creams

❑ مستحلبات زيت/ماء:

- يجري تخريب المستحلب بتحميض الوسط والتسخين، ويمكن تسريع التخرب بإضافة بضع قطرات من الكحول الايتيلي فتنفصل طبقتان علوية زيتية وسفلية مائية.
- تفصل الطبقة الدسمة بالإبانة ويستعان أحياناً بالتثفيل.
- يمكن إجراء عملية استخلاص للطبقة الدسمة بايتر البترول.

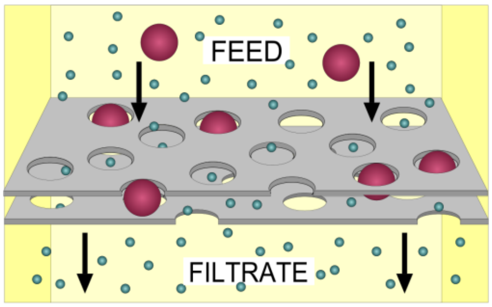
- الطور المائي يمكن تقطيره أو تبخيره كما في المحاليل.

❑ مستحلبات ماء/زيت:

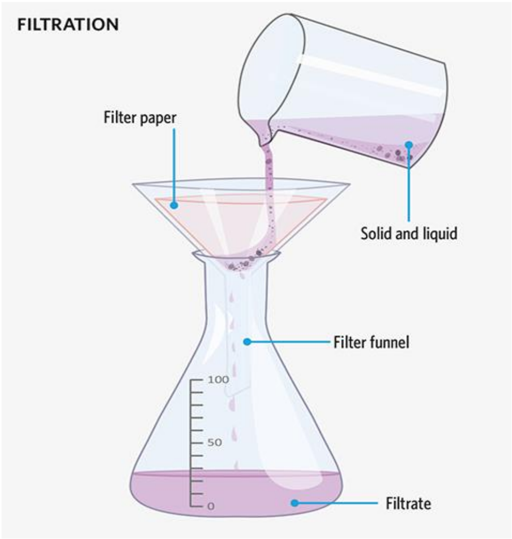
- تجرى عملية تخريب المستحلب بصبه على صفيحة ذات سطح واسع وتركه للجفاف ثم أخذ البقية الدسمة بمذيب مناسب.

العمليات الأساسية لفصل المواد

❖ الترشيح Filtration



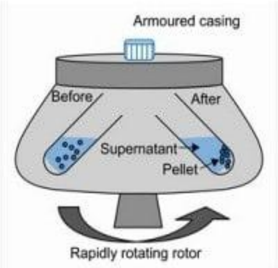
- هو عملية فصل للمواد السائلة عن المواد الصلبة.
- اختيار المرشحة الملائمة حسب أبعاد الجزيئات.
- إزالة أول جزء من الرشاحة، ترطيب المرشحة.
- استخدام الترشيح بالخلاء.
- أنواع المراشح:
  - المراشح الورقية
  - المراشح الغشائية.
  - المراشح القطنية.
  - مراشح الصوف الزجاجي.
- أجهزة الترشيح السريعة كالترشيح بالخلاء أو الترشيح باستخدام ضغط الماء السلبي.



❖ التثفيل Centrifugation

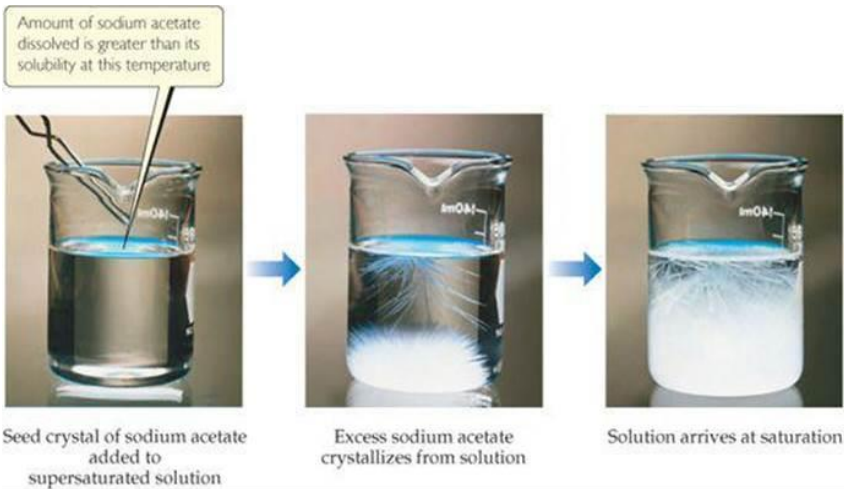
- فصل صلب عن سائل، سائل عن سائل مختلفي الكثافة أو القطبية.
- يستخدم في حالات حجم الجسيم أصغري، أو كميات المادة المراد فصلها زهيدة، أو الرواسب صعبة الترشيح (هلامية)، أو جسيماتها تسد مسامات المراشح.
- يعتمد التثفيل على اختلاف الكثافة بمساعدة القوة النابذة والجاذبية الأرضية.
- اختلاف السرعة حسب طبيعة المواد المراد فصلها (3000 د/د).
- الانتباه لتوازن الأقطار.
- أجهزة فوق التثفيل Ultra Centrifugation يستخدم في حالات حجم جسيمات دقيقة جداً، بسرعة تزيد على 100000 د/د، بالأبحاث الحيوية.

shutterstock.com • 742731163



❖ البلورة Crystallization وإعادة البلورة Recrystalization

- تعتمد البلورة على اختلاف ذوبانية المادة المراد فصلها عن المواد المشاركة في المزيج، أو لفصل المادة المذابة بشكلها الصلب عن مذيبها.
- تستعمل كعملية تنقية للمواد الصلبة من الشوائب عن طريق إعادة البلورة.
- تعتمد بشكل رئيس على ارتفاع ذوبانية المواد في المذيبات الساخنة عنها في المذيبات الباردة.
- تحفيز البلورة.



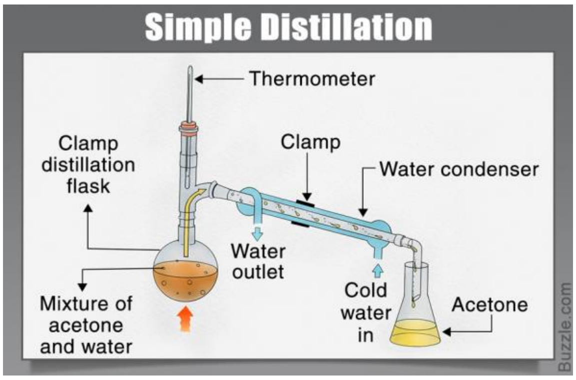
❖ التصعد Sublimation

- يعني تبخير المادة من حالتها الصلبة ثم تكثيف البخار الناتج على شكل مادة صلبة دون المرور بالحالة السائلة.
- تستعمل كعملية تنقية للمواد الصلبة من الشوائب.

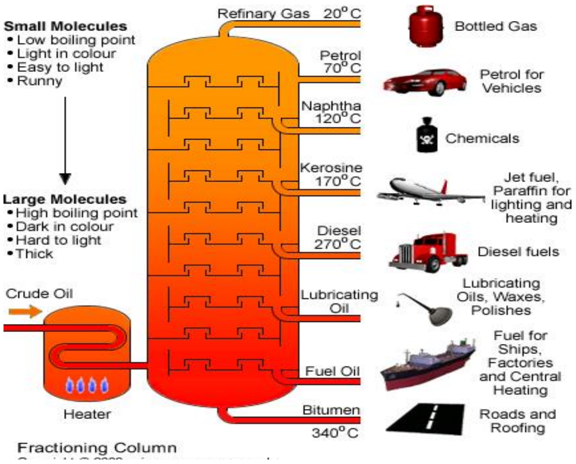
❖ التقطير Distillation

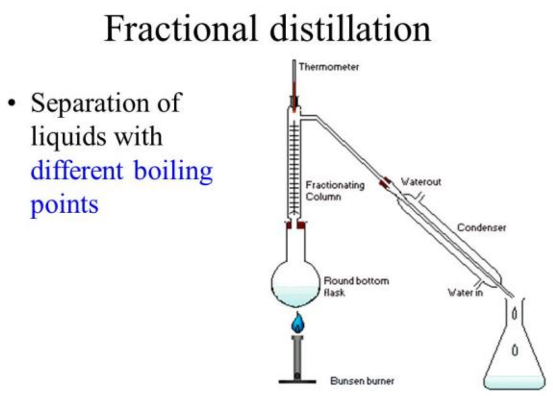
- فصل سائل – سائل
- **أنواع التقطير:**

- **بشروط الضغط الجوي العادي**: /فرق واسع في درجات الغليان/ تقطير الماء، تنقية المذيبات...



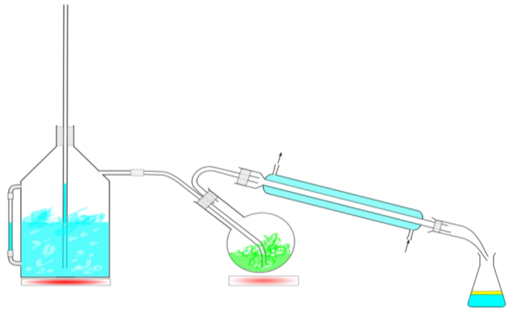
- **التقطير المجزأ Fractional Distillation:** يستخدم لفصل المزائج أوعندما تكون المواد الشائبة مواد طيارة.





- **التقطير بالخلاء Vacuum Distillation:** خفض الضغط يخفض درجة الحرارة، محاليل مواد تتخرب بدرجة الحرارة العالية.
- **التقطير بالجرف ببخار الماء:**

• جزء المادة الموجودة بحالة بخارية ينجرف مع بخار الماء بدرجة الحرارة التي يتساوى فيها مجموع ضغطي بخار المادة وبخار الماء المتساويان بالضغط الجوي العادي
• الشرط الأساسي ألا تكون المادة المراد جرفها ذوابة أو ممزوجة بالماء.



- **التقطير باستخدام المبخر الدوار Rotary Evaporator:** تسمح بالتقطير باستخدام الخلاء دون تطبيق حرارة عالية.

❖ الاستخلاص Extraction

- عملية فصل وتنقية مهمة جداً على صعيد التحليل الدوائي.
- لا تخلو عملية تحليل أو مقايسة خاصة الأشكال الصيدلانية من عملية الاستخلاص.
- تتميز بالدقة والسرعة في الفصل والمردود العالي وعدم اللجوء للحرارة خاصة للمواد الحساسة للحرارة.
- **أنواع الاستخلاص:**

- الاستخلاص صلب: سائل

/ظاهرة الذوبانية Solubility / استخلاص انتقائي لمادة أو عدة مواد من مزيجها بمذيب ملائم.

- الاستخلاص سائل: سائل

/ظاهرة التوزع Partition/ استخلاص انتقائي لمادة أو عدة مواد ذائبة في سائل بواسطة سائل آخر تذوب فيه المادة بشكل أكبر ولا يمتزج بالسائل الأصلي.

- **أنواع السوائل الاستخلاصية:**

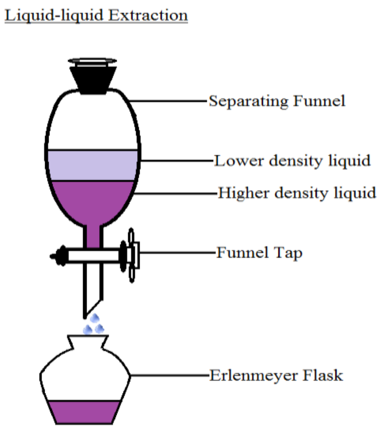
- **سوائل فعالة كيميائياً :** حموض – أسس
  - تلعب قدرة المذيب الكيميائية دوراً في عملية الذوبانية (التشرد).
  - تطبيقاتها في العمليات التحضيرية قبل الاستخلاص النهائي.
- **الكحولات :** ميتانول، إيتانول، إيزوبروبانول
  - ذات استعمالات شائعة وبشكل خاص الميتانول والإيتانول.
  - مذيبات عامة مزوجة مع السوائل القطبية واللاقطبية.
  - يستفاد منها في الاستخلاص صلب سائل حيث إن أكثر المواد الدوائية تذوب فيها في حين لا تذوب فيها المواد المساعدة كالسكاكر والبروتينات..
  - من مشاكلها حدوث الاستحلاب مع بعض المواد المساعدة المعيقة للاستخلاص (العقاقير النباتية).
- **الاستخلاص بالمذيبات العضوية:** الإيتر والكلوروفورم
  - من أكثر عمليات الاستخلاص شيوعاً في دساتير الأدوية.
  - قدرة الذوبان بشكل عام لها علاقة بالشكل اللامتشرد بينما أكثر الأشكال المتشردة للأدوية تنحل بالمذيبات القطبية.
  - هناك علاقة لـ pH بعملية الاستخلاص.

- **يتم اختيار السوائل الاستخلاصية المناسبة بحسب المعطيات التالية:**
  - امتزاج ضعيف بين الطورين.
  - اختلاف واضح في كثافة كل من الطورين.
  - عدم تشكل استحلاب بين الطورين.
  - معامل فصل كبير للمادة المراد استخلاصها.
  - لا تفاعل يذكر للسائل الاستخلاصي مع المواد المراد استخلاصها.
  - إمكانية إعادة الحصول على المادة المستخلصة من السائل الاستخلاصي، أو إمكانية تحليلها ضمنه كمياً وكيفياً.

- **تعتمد الأسس النظرية للفصل بآلية توازن التوزع على قانون التوزع للعالم نرنست Nernst :**

عندما تتوزع مادة واحدة بين مذيبين لا يمتزجان ببعضهما وتتواجد فيهما بصيغة كيميائية واحدة فإن: التوزع يخضع (عند ثبات درجة الحرارة والضغط) لقانون التوزع:

$$K_A = \frac{C_{A}, OP}{C_{A}, UP}$$



حيث : A المادة
C تركيزها
OP الطور العلوي
UP الطور السفلي

- **قانون التوزع للعالم نرنست Nernst :**

$$K_A = \frac{C_{A}, OP}{C_{A}, UP}$$

- في الحالات المثالية:

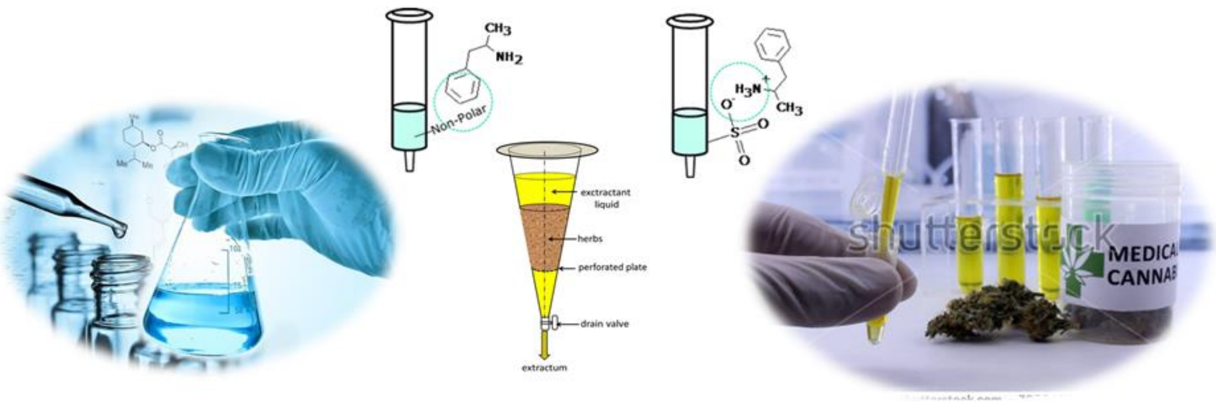
- كما في حالة المحاليل الممددة جداً فإن K لا تتعلق بالتراكيز، لكنها تتعلق بالحرارة والضغط.
- المادة A في الطورين العلوي والسفلي بالحالة الجزيئية ولا تتغير بين الطورين.

- عندما تتغير الحالة الجزيئية للمادة A (تشرد، تشكل معقد، تفاعلات حمض-أساس..) فإن هذا المعامل تتغير قيمته.
- في الأغراض العملية يستعاض عن معامل التوزع بمعامل الاستخلاص D وهو: نسبة مجموع التراكيز لمختلف حالات المادة A في الطور العلوي إلى الطور السفلي سواء كانت متشردة أم غير متشردة، على شكل معقد، متأثرة بقيم pH أو غير متأثرة.

$$D_A = \frac{\sum C_{A}, OP}{\sum C_{A}, UP}$$

- لا تتعلق ثابتة التوزع بالكمية المطلقة للمادة المستخلصة وحجوم الأطوار، ولا تتأثر بوجود مواد أخرى.
- تتوقف الكمية المستخلصة من المادة على ثابتة التوزع،أما فيما يتعلق بحجم السائل الاستخلاصي المستخدم فمن الممكن زيادة الكمية المراد استخلاصها بتكرار عملية الاستخلاص وليس بتكبير الحجم.
- تنتقل المواد ضعيفة التشرد إلى الطور العضوي وهي تشكل القسم الأعظم من المواد الدوائية مع مراعاة درجة الذوبانية.

- المركبات ذات التفاعل الحمضي أو القلوي الضعيف يمكن فصلها بدرجات حموضة مناسبة اعتماداً على مبدأ طرد الحمض القوي للحمض الضعيف من أملاحه وطرد القلوي القوي للضعيف من أملاحه أي تحويل الشكل المتشرد إلى اللامتشرد عبر التحميض أو القلونة.
- من المعروف أن الأشكال اللامتشردة ضعيفة الذوبانية بالماء أو عديمة الذوبانية، بينما الأشكال المتشردة جيدة الذوبانية غالباً والأمر معاكس تماماً في حالة المذيبات العضوية.
- المركبات المعتدلة ذات الذوبانية شبه المتساوية في الطورين المائي والعضوي يصعب فصلها بهذه الطريقة.



❖ التجفيف Drying

- هو عملية فصل لآثار الرطوبة أو آثار المذيبات من المادة المراد تجفيفها.
- يجري إما باستخدام الحرارة، أو طرائق فيزيائية كالتقطير أو التجفيد أو الاستخلاص، أو باستخدام المواد المجففة.

- المواد الصلبة توضع بالمجففة Desiccator مع استخدام المواد المجففة.
- يمكن استخدام الأفران الكهربائية المختلفة.
- تجفف السوائل من آثار الرطوبة بإضافة المواد المجففة.
- المواد المجففة المستخدمة:

- يجب أن تكون غير فعالة كيميائياً، غير ذوابة، كمية قليلة منها، قابلية التنشيط، فصلها سهل، رخيصة.
- كلوريد الكالسيوم، سلفات المغنزيوم اللامائية، سلفات الصوديوم اللامائية، سلفات الكالسيوم اللامائية، خامس أكسيد الفوسفور، أكسيد الألمنيوم، السيليكاجيل، معدن الصوديوم (تجفيف الميتانول)، حمض السلفوريك الكثيف (تجفيف البروم)، بلا ماءات القلويات.

العمليات التحليلية لفصل المواد

الاستشراب Chromatography

هي عملية تحليلية يجري من خلالها تفريق لمزيج مواد مذابة ضمن جملة مؤلفة من طورين أو أكثر.

أنواع الاستشراب حسب تقنيات تحليله:

- ❑ **الاستشراب على الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography**
- ❑ **الاستشراب الغازي Gas Chromatography**
- ❑ **الاستشراب السائل Liquid Chromatography**

تصنف وفقاً لثلاثة أشكال مختلفة:

❑ التصنيف المعتمد على طبيعة الطور:

يكون الطور الساكن في الكروماتوغرافية السائلة إما جسماً صلباً يمتاز بخواص مازة أو أن يكون سائلاً مشرباً على جسم صلب حامل مطعماً بجزيئات تحمل زمراً وظيفية مختلفة.

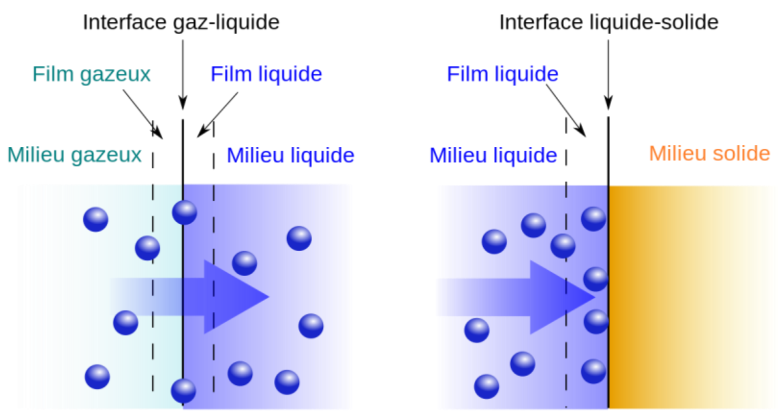
الكروماتوغرافيا السائلة–الصلبة	Liquid-Solid Chromatography
الكروماتوغرافيا السائلة–السائلة	Liquid-Liquid Chromatography
الكروماتوغرافيا السائلة–هلام	Liquid-Gel Chromatography
كروماتوغرافيا الأطوار المطعمة	Bonded Phase chromatography

❑ التصنيف المعتمد على ظواهر وآليات الفصل:

تعتمد عملية الفصل على ظاهرة أو مجموعة من الظواهر التي تتحقق من خلالها عملية الفصل وهي كما يلي:

- **كروماتوغرافيا الامتزاز أو الادمصاص Adsorption**

إن الآلية المعتمدة في عملية الفصل هي الامتزاز حيث إن مصدر الاحتفاظ بالعينة هو الارتباطات بين مجموعات وظيفية معينة في العينة مع المواقع الفعالة على السطح الماز الذي هو السيليس SiO_2 وتكون الارتباطات من النوع تجاذبية وروابط هيدروجينية.



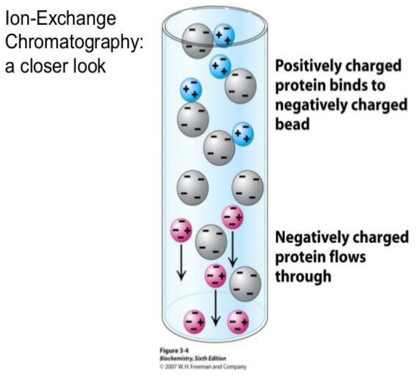
Absorption Adsorption

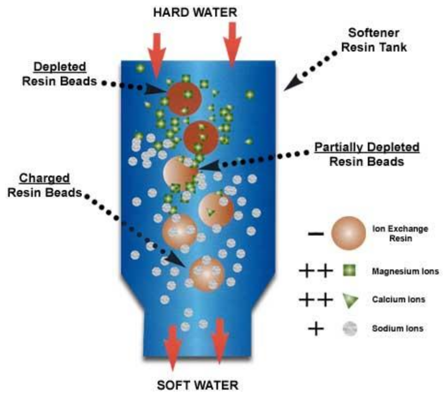
- **التوزيع أو التجزئة Partition**

- إن آلية الذوبانية في الطور الساكن السائل تتوافق مع ما يدعى بالكروماتوغرافيا التوزيعية السائلة – السائلة.
- يعتمد الفصل بالتوزيع اختلاف ذوبانية العينة في الطورين المتحرك والساكن (السائل المشرب على مادة حاملة مسامية، تكون في معظم الحالات هي السيليس الذي لا يلعب سوى دوراً حاملاً للطور الساكن السائل).
- هذا الطور الساكن يمكن أن يكون متشرباً أو مرتبطاً كيميائياً على سطح السيليس.

- **التبادل الشاردي Ion Exchange:**

- تعتمد الآلية في هذا النوع من الكروماتوغرافيا على التبادل الشاردي الذي يتحقق على طور ساكن يتميز بخواص نوعية إذ يتضمن مبادلات شاردية وهي عبارة عن مجموعات وظيفية ثابتة على الطور الساكن متشردة أو قابلة للتشرد.
- إن تثبيت العينة على المواقع المتشردة (الفعالة) من الطور الساكن توافق ما يدعى بكروماتوغرافيا التبادل الشاردي.





- **كروماتوغرافيا تبادل المرتبطات Legend Exchange**

يحوي الحامل في هذه الحالة على مجموعة من المواقع القادرة على تشكيل معقدات مع المركبات المراد فصلها وذلك بتشكيل روابط تساندية.

- **كروماتوغرافيا الإلفة Affinity:**

تعنى هذه الآلية بشكل خاص بالكيمياء الحيوية والتي تكون فيها العينة مؤلفة من جزيئات كبيرة.
يتم الفصل بهذه الآلية على مرحلتين:

- التثبيت النوعي للمركب المراد فصله في العمود.
- تغير شروط وتركيب الطور المتحرك وذلك بهدف إخراج المركب المثبت ونزعه من العمود.

- **الفصل بالاستبعاد Exclusion:**

- يكون الطور الساكن عبارة عن جسم صلب مسامي يمتاز بأقطار مسامية قريبة من أبعاد الجزيئات المراد فصلها. الجزيئات ذات الأبعاد الكبيرة لا تستطيع الدخول خلال مسامات الطور الساكن وتكون مستبعدة منه لذا تخرج أولاً، وبالمقابل فالجزيئات ذات الأبعاد الصغيرة تستطيع الدخول عبر معظم المسامات فتحتفظ في العمود لمدة أطول وتخرج متأخرة.
- الفصل في هذه الطريقة يتم عن طريق الفرق ما بين ضخامة جزيئات العينة.

❑ **التصنيف المعتمد على نوعية الأعمدة:**

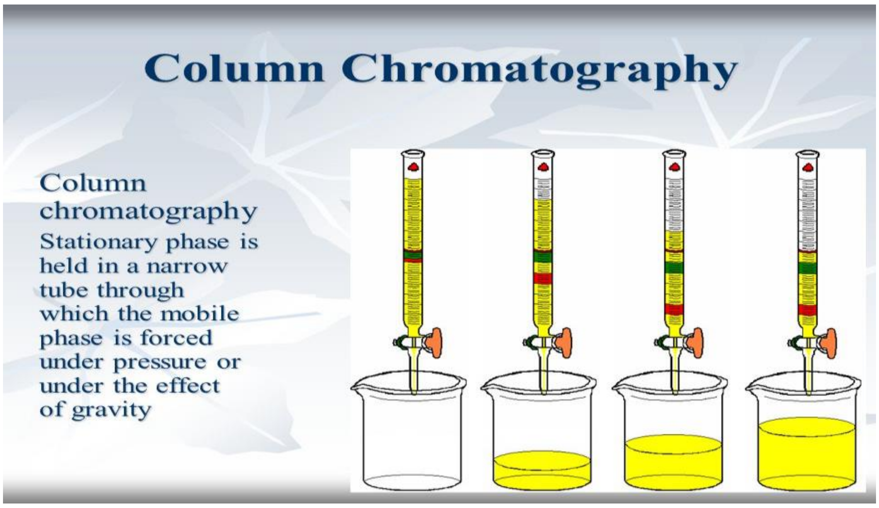
- **كروماتوغرافيا الأعمدة Column Chromatography وتقسم إلى نوعين:**

النوع الأول:

الأعمدة المملوءة Packed Column وهي عبارة عن أعمدة من الفولاذ غير قابلة للصدأ وفي بعض الحالات من الزجاج ذات أقطار داخلية تتراوح ما بين 4.6 – 2.1مم وأطوال تتراوح ما بين 5سم إلى1م.

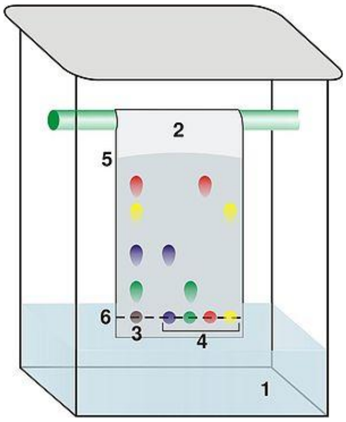
النوع الثاني:

الأعمدة الفارغة: وهي عبارة عن أعمدة من الزجاج أو السيليس المذاب أو الفولاذ ذات قطر داخلي صغير.



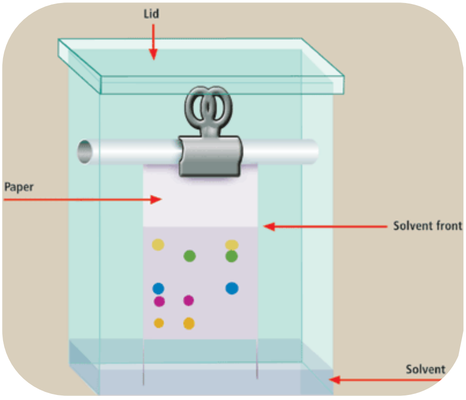
- **الكروماتوغرافيا المستوية Planar Chromatography**

وتتمثل بكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة Thin Layer Chromatography والكروماتوغرافيا الورقية Paper Chromatography



❖ الكروماتوغرافيا الورقية
Paper Chromatography (PC)

- توزع المادة المراد فصلها بين معقد سللوز – ماء ومذيب عديم الامتزاج أو ضعيف الامتزاج مع الماء.
- الماء طور ثابت في معظم الحالات.
- طور متحرك المذيبات العضوية المختلفة.
- الورق سللوز القطن دون إضافات وبثخانة محددة واتجاه موحد للألياف.
- تقانات الفصل:
  - الطريق الصاعد Ascending
  - الطريق النازل Descending
  - الطريق الأفقي الدائري.
  - و Two Dimentional



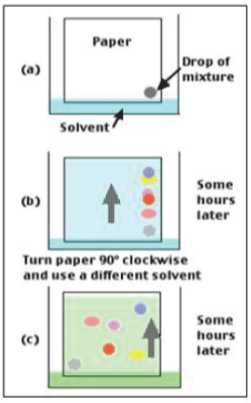
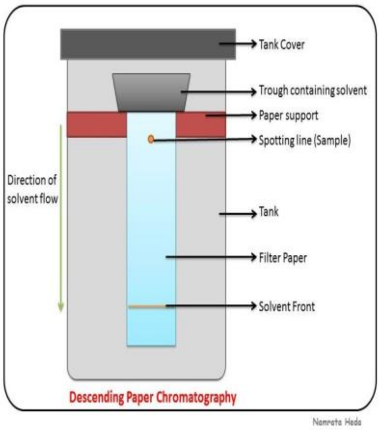
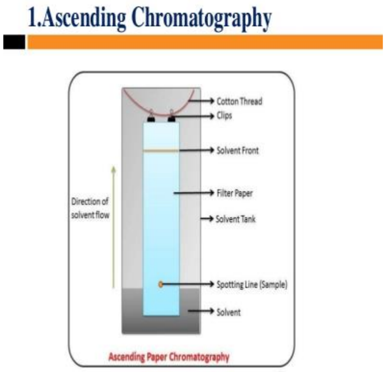
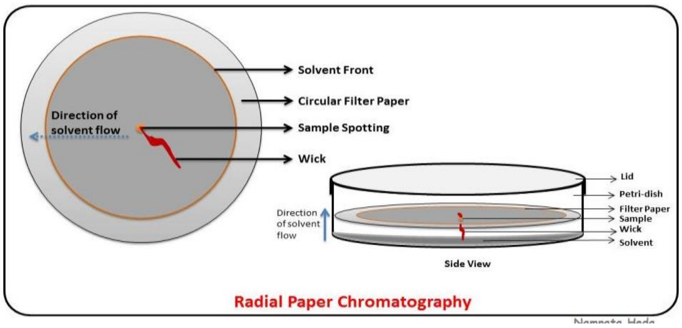


Figure 1: Illustration of two dimensional ascending paper chromatography.



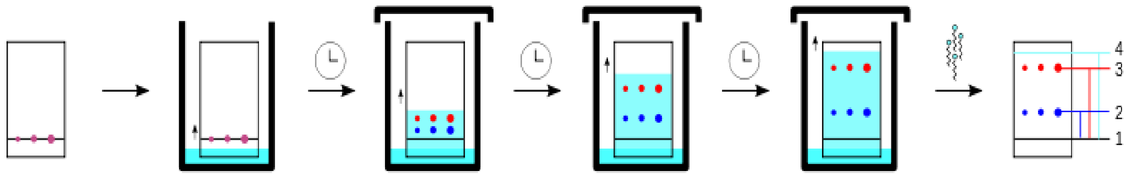


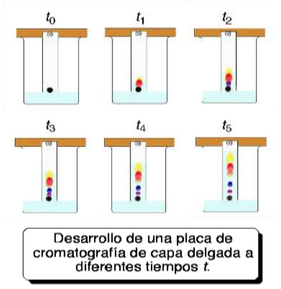


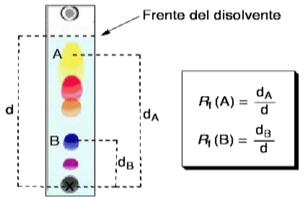
❖ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Thin Layer Chromatography (TLC)

- تقانة يستخدم فيها طبقة رقيقة نسبياً من مادة جافة فائقة النعومة تفرش على طبقة أو صفيحة زجاجية أو بلاستيكية أو معدنية.
- تقوم الطبقة بالفعل الماز Adsorbant.
- يحصل الفصل نتيجة لفعل الامتزاز Adsorption أو التجزئة Partition أو بمشاركة الفعلين معاً بحسب نموذج المادة المازة وطريقة تحضيرها والمذيبات المستخدمة.
- تهاجر المواد المراد اختبارها أو تقطع مسافة على طبقة الطور الثابت تحت تأثير طور متحرك يتحرك على الطور الثابت بالفعل الشعري Capillary Action.
- البعد الذي تقطعه المادة هو محصلة للألفة النسبية Relative Affinity بين الطورين الثابت والمتحرك.







الطريقة:

- تحضير الأحواض
- تحضير الصفائح
- وضع العينات
- الترحيل
- التظهير بكواشف خاصة (أزرق الموليبدينوم، اليود...)
- حساب الـ Rf : نسبة المسافة التي قطعتها البقعة من خط البداية إلى المسافة التي قطعها الطور المتحرك من خط البداية إلى النهاية.

وهناك ما يعرف باستشراب ثنائي البعد على الطبقة الرقيقة Two-Dimensional

❑ التطبيقات:

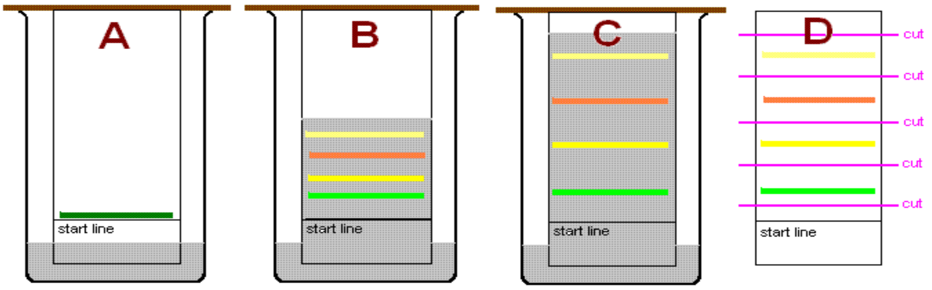
- كشف الشوائب.
- طريقة لتعيين هوية العديد من المواد الدوائية.
- اختبار مصدوقية التنظيف Cleaning Validation.
- مقايسة مركبات من خلال معامل الاحتباس "Rf" Retention Factor.
- مقايسة المواد باستخدام قارئ بقع Scanner له مبدأ قياس الكثافة الضوئية Densitometry أو الفلورة Fluorescence إما مباشرة على الصفيحة أو بتجريف البقع.

❑ المزايا :

- تطبيق عدة عينات دفعة واحدة ما يسرع من عملية التحليل.
- إمكانية الأتمتة.
- متينة Robust ومرنة Flexible بإمكانية تطبيق كواشف كيميائية مختلفة على الصفيحة ما يضفي على الطريقة مزية إضافية من خلال المجال الواسع من خصائص الطور الثابت.
- رخيصة الثمن نسبياً.

❑ المساوئ:

- عدد السطوح أو الصفائح النظرية Theoretical Plates المتوافرة للفصل محدود نسبياً في طريقة TLC ، بالرغم من أن HPTLC يمكن أن توفر عدد سطوح نظرية يشبه ما هو متاح في أعمدة HPLC القصيرة.
- حساسية محدودة نوعا ما.
- ليست مناسبة للمركبات الطيارة.
- تتطلب مهارة خاصة بالمحلل.



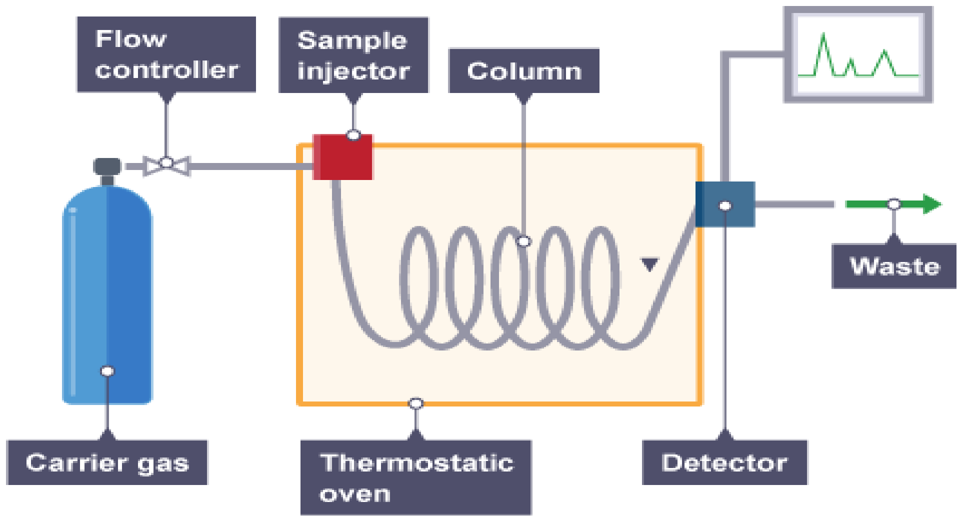
❖ الاستشراب الغازي "Gas Chromatography "GC

- يتدفق طور متحرك غازي بضغط ما خلال أنبوب أو عمود مسخن ملبس Coated داخلياً بطور ثابت سائل أو محشو بطور ثابت على شكل سائل ملبس على حامل صلب.
- تحقن المادة المراد تحليلها في العمود المسخن من خلال قناة حقن مسخنة أيضا تقوم بتبخير المادة.
- يتكاثف بخار المادة عند رأس العمود ذي الحرارة الأخفض نسبياً.
- حرارة الفرن Oven تبقى ثابتة أو تبرمج لتتغير تدريجياً.
- يحصل في العمود انفصال للمزائج تبعاً لطول الزمن المستغرق لبقاء كل مادة في الطور الثابت.
- يراقب خروج المواد من العمود من خلال استخدام Detectors مختلفة.

❑ الجهاز:

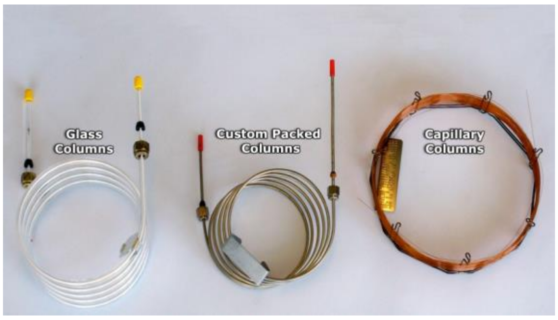
يتضمن الجهاز: مصدر غازي، قناة حقن، عمود، Detector، Recording Device.

- غاز الهليوم أو النتروجين أو الهيدروجين بحسب نوع العمود ونوع المكشاف المستخدم.
- يحقن المزيج في قناة الحقن المسخنة لدرجة حرارة التبخر، بينما يكون الغاز الخامل مستعداً لحمل بخار المادة إلى العمود الموجود ضمن Temperature Programmable Oven Column بحيث يحافظ بخار المادة على مواصفاته ضمن العمود مما يؤمن فصلاً مناسباً للمركبات التي لها ضغوط بخارية متباينة.
- يعتمد انتقاء المكشاف على طبيعة المركب المراد تحليله، الذي يجب أن يكون أيضاً مسخناً لمنع تكاثف المركبات المشطوفة ضمنه.
- يجري تسجيل Detector Output بالعلاقة مع الزمن، مما يؤدي إلى كروماتوغرام مؤلف من سلسلة Peaks على محور الزمن.
- تستخدم Peak Area أو Peak Height في الحسابات الكمية للمادة المفصولة.
- Retention Time معلم مهم لاستعراف المركبات.
- واحدة سرعة انسياب الغاز مل/ د.



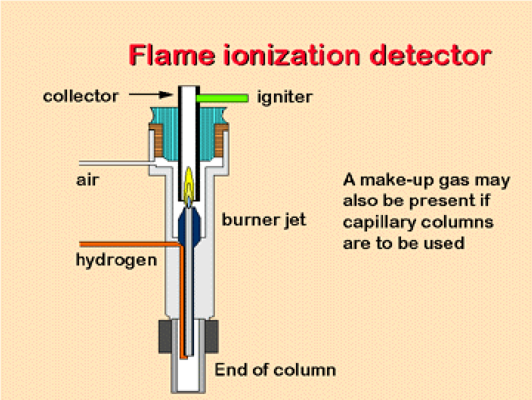
الأعمدة:

- Packed Columns الأعمدة المحشوة
- Capillary Columns الأعمدة الشعرية

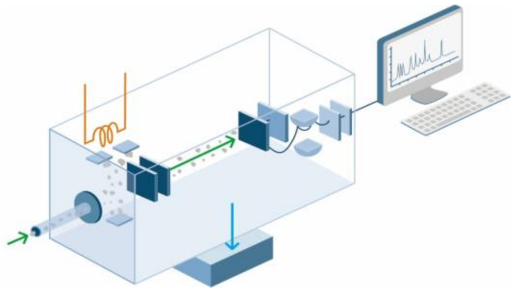


المكشاف Detector :

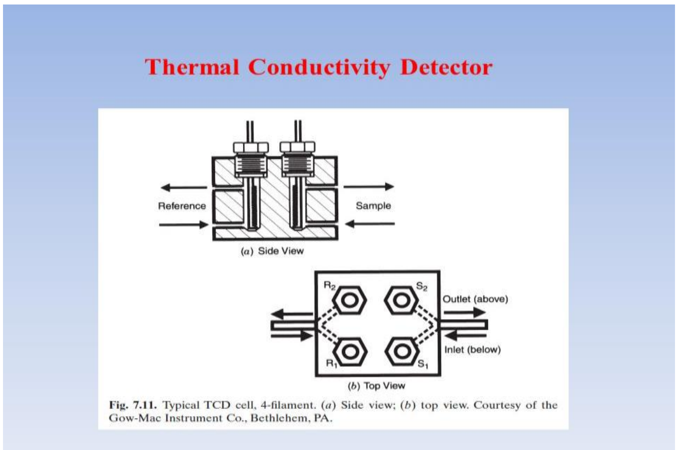
- مكشاف تأين اللهب "FID" Flame Ionization Detector



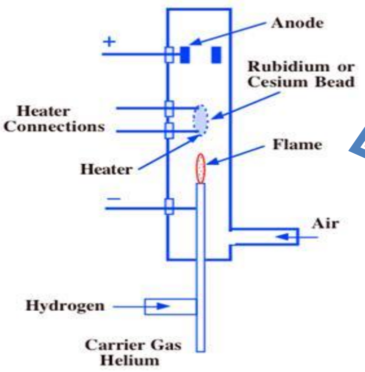
- مكشاف طيف الكتلة Mass Spectroscopy Detector



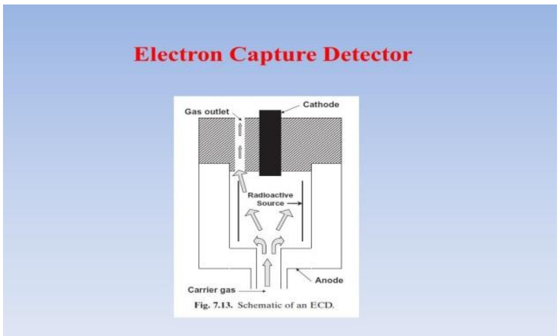
- مكشاف الموصولية الحرارية Thermal Conductivity Detector "TCD



- مكشاف النتروجين - الفوسفور NP- Detector



- مكشاف قبط الالكترون Electron Capture Detector



❑ **التطبيقات:**

- دراسة خصائص المواد الدوائية ولا سيما كشف الشوائب الناتجة عن تخليقها.
- Limit Tests لبقايا المذيبات Residual Solvents .
- مقايسة بعض المواد الدوائية ضمن مستحضراتها الصيدلانية، ولا سيما مقايسة واستعراف الأدوية غير الحاوية على عصابات لون Chromophors.
- دراسة خصائص بعض المواد الأولية المستخدمة في تخليق المواد الدوائية.
- طريقة مناسبة جدا لدراسة خصائص الزيوت العطرية.
- مقايسة الأدوية ومستقلباتها في السوائل البيولوجية.

❑ **المزايا:**

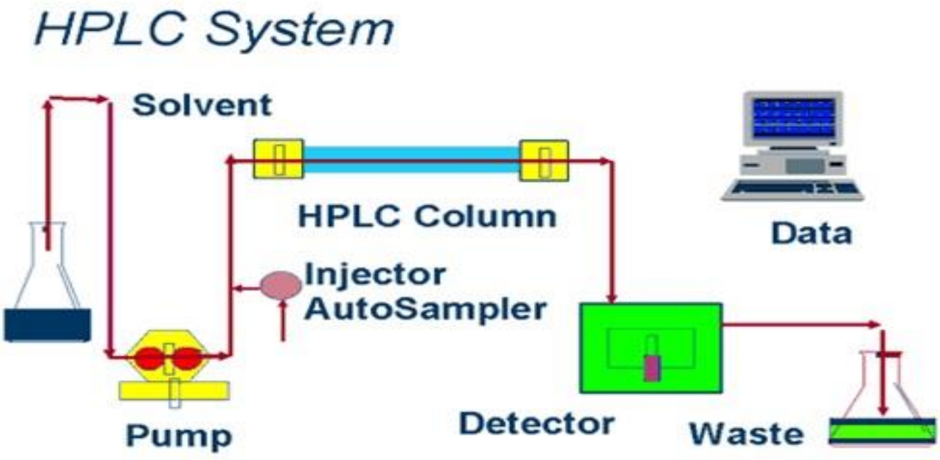
- مضبوطية ودقة في المقايسات الكمية تشابه كثيرا طريقة HPLC .
- قدرة فصل عالية وأعلى من HPLC إذا استخدمت فيها الأعمدة الشعرية.
- لا يوجد تعدد في الأطوار المتحركة وليس له مخلفات.

❑ **المساوئ:**

- لا تستخدم إلا للمواد الثابتة حرارياً والمتبخرة أو المتطايرة.
- إذا كانت المادة غير متطايرة فتتطلب اشتقاقاً Derivation لتحويلها لشكل متطاير مما يتطلب مرحلة إضافية في زمن التحليل وربما يحصل تداخل.
- يلاقي التحليل الكمي صعوبات نظراً للحجوم الصغيرة من العينة المطلوب حقنها.
- المحاليل المائية والأملاح لا يمكن حقنها.

❖ الاستشراب السائل رفيع الإنجاز
HighPerformanceLiquidChromatography
"HPLC"

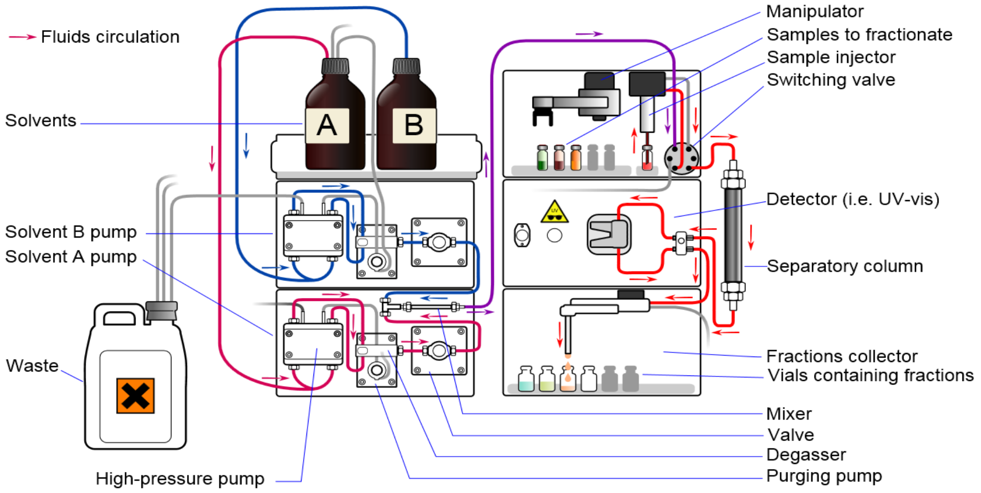
- يضخ طور متحرك سائل بضغط ما ضمن عمود من Stainless Steel الحاوي على جسيمات الطور الثابت بأبعاد 3-10 مكم.
- تحقن المادة عند رأس العمود من خلال عروة حقن.
- يحصل فصل المزيج تبعاً للأزمان النسبية المصروفة للمركبات في الطور الثابت.
- يراقب دفق العمود من الطور المتحرك الحامل للمواد المفصولة من خلال استخدام مكاشف مختلفة.
- تعتمد آليات الفصل على التوزع أو الامتزاز أو التبادل الأيوني، وذلك تبعاً لنوع الطور الثابت المستخدم.
- تعتمد أغلب التحاليل الدوائية على آلية التوزع وتجرى خلال 30 دقيقة على الأكثر.



- **الجهاز:**

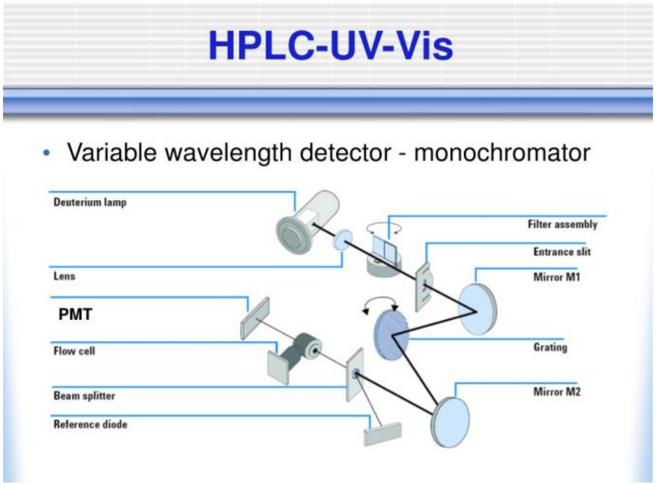
- مخزن يحوي الطور المتحرك.
- مضخة تدفع الطور المتحرك خلال جملة فصل بضغط عالي (Isocratic : Gradient).
- حاقن يقدم العينة إلى الطور المتحرك.

- عمود.
- مكشاف.
- مجموعة جمع المعطيات:
  - Computer
  - Recorder مسجل
  - Integrator مكامل

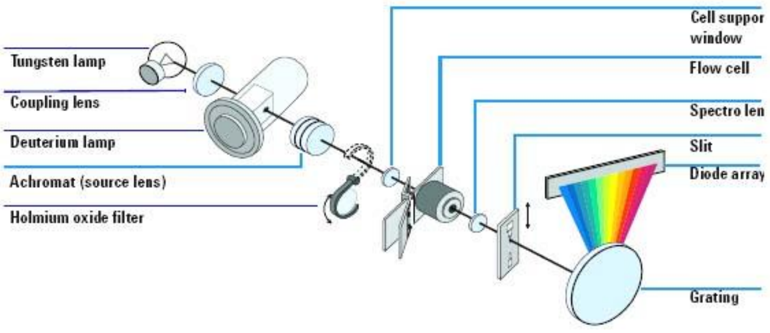


- **:Detector المكشاف**

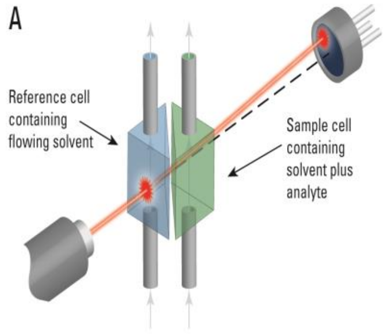
- مكشاف الأشعة المرئية والأشعة فوق البنفسجية UV/ VIS ذو طول موجة ثابت Fixed أو متغير Variable أو متعدد الموجة Multi-Wavelength.

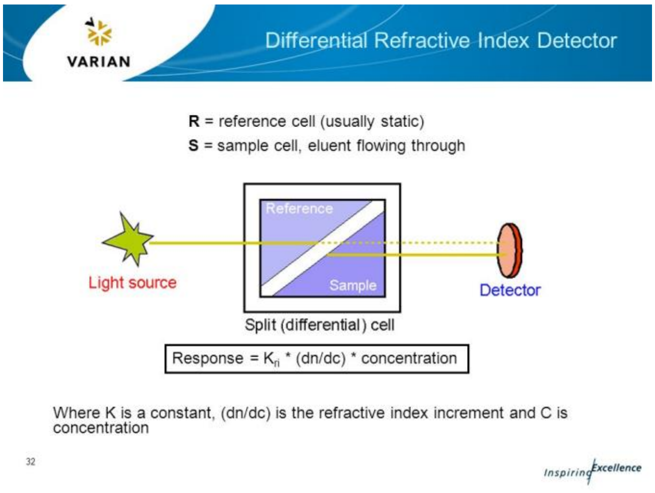


- مكشاف نظام مصفوف الديودات Photo Diode Array "PDA".

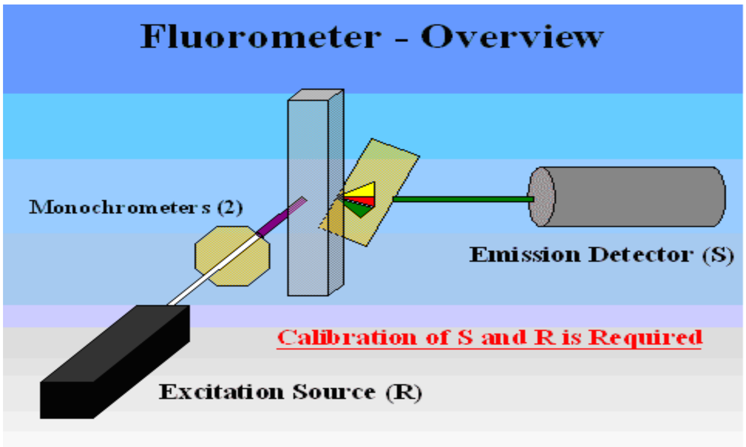


- مكشاف قرينة الانكسار التفاضلي Differential Refractometer Detector.

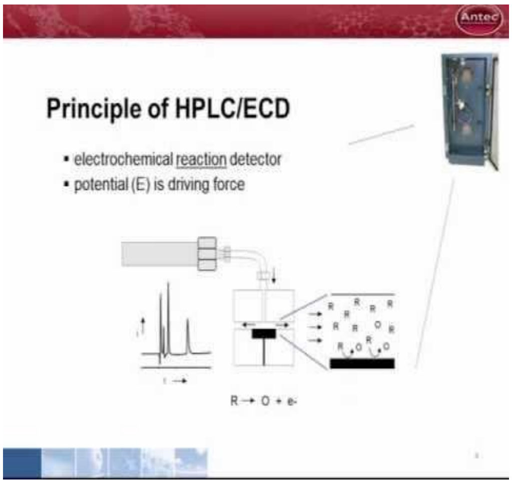


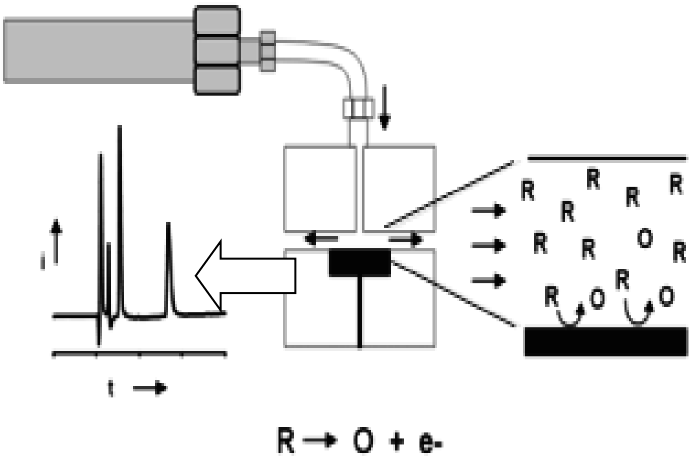


- مكشاف الفلورة Fluorometric Detector.

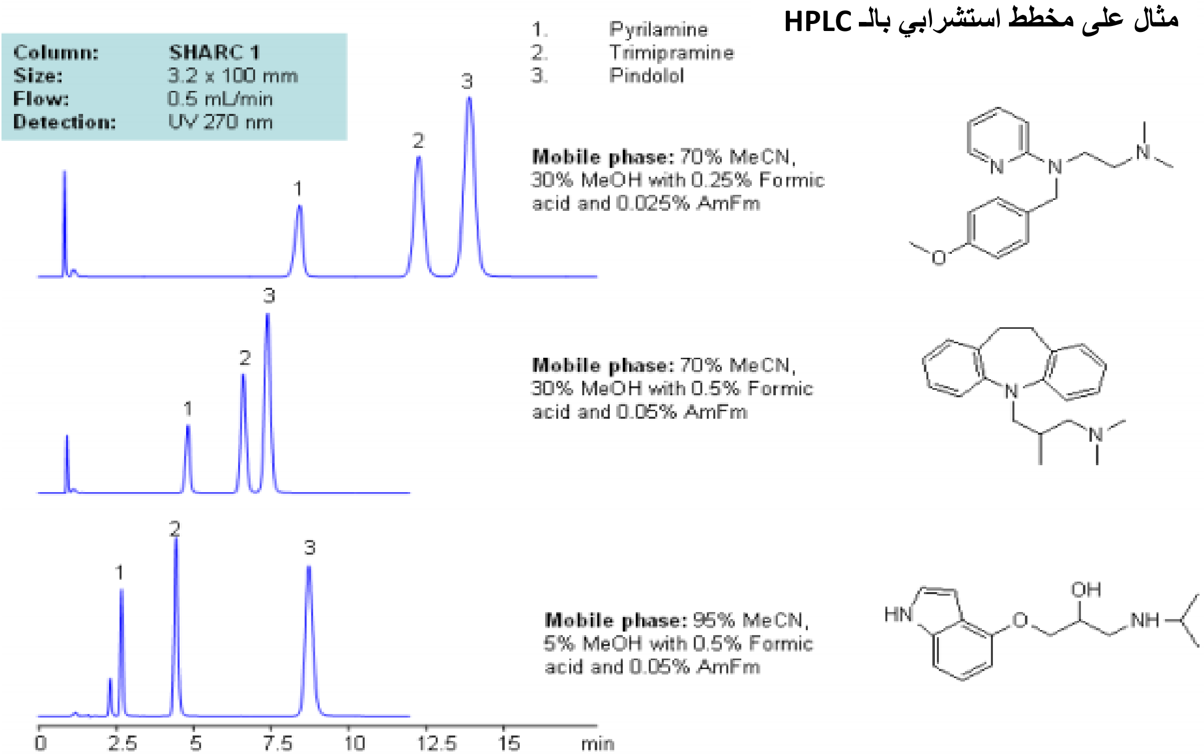


- مكاشف الكهركيميائية Electrochemical Detectors.

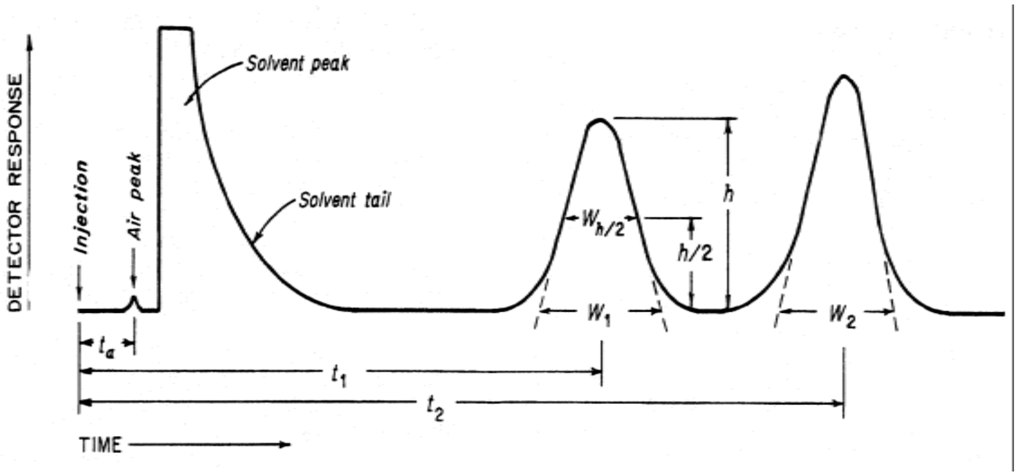




مثال على مخطط استشرابي بالـ HPLC



تفسير المخططات الاستشرابية



t_1 و t_2 : أزمان الاحتباس الخاصة بالمادتين

h : ارتفاع القمة

h/2 : نصف الارتفاع

Wh/2 : العرض عند نصف القمة

W_1 و W_2 : عرض القمة الأولى والثانية

- إن توافق **أزمنة الاحتباس** الاستشرابية للمادة المراد اختبارها مع المادة المعيارية يمكن أن يكون معلماً مهماً في تعيين هوية المركبات.

- **السطوح أو الصفائح النظرية Theoretical Plates "N":**

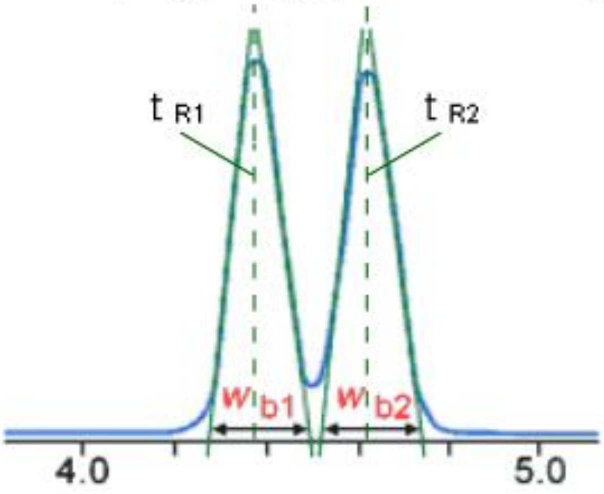
هو مستوى نظري داخل عمود الفصل يحصل من خلاله توازن بين الطور المتحرك والطور الثابت. وهو مقياس لكفاءة العمود Efficiency ومقياس لقدرة الفصل (الميز).

- **معامل الميز Resolution:**

هو مقياس لجودة انفصال مركبين، يراعى الميز بشكل خاص عند ذرى القمم وعند عرض القمم، وتعد المركبات التي لها معامل ميز = 1.5 مركبات منفصلة عن خط القاعدة.

- **يجرى اعتماد الجملة الاستشرابية للتحليل عندما تسمح بالوصول إلى:**
  - عدد من الذرى مساو لعدد المركبات في المزيج المراد تحليله.
  - امتلاك المركبات المؤلفة للمزيج لاحتباسات مختلفة (انتقائية العمود).
  - الذرى مفصولة بشكل كاف (ميز جيد).
  - الذرى حادة (كفاءة جيدة للعمود).
- تتناسب مساحات الذرى وارتفاعاتها عادة مع كمية المركبات المتفرقة.

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})/2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$



ملاءمة النظام System Suitability

- تعد اختبارات ملاءمة النظام جزءاً مكملاً لطرائق GC وHPLC. وتستخدم للتأكد من أن الميز Resolution وتناتجية (قابلية الإعادة) Reproducibility نظام الفصل ملائماً للاختبار أو القياس المراد إجراؤه. تقوم هذه الاختبارات على مفهوم واحد هو أن الجهاز والعمليات الإلكترونية والتحليلية وكذلك العينات المراد تحليلها تشكل نظاماً متكاملاً يجب تقويمه كجملة واحدة متكاملة.
- **الميز Resolution:**

هو أحد دلالات كفاءة العمود، يعطي فكرة عن قدرة النظام على القيام بالفصل وأن المعياريات الداخلية هي أيضاً منفصلة عن المادة الدوائية نفسها.

- **كفاءة العمود Column Efficiency:**

تحدد كمتطلب لملاءمة النظام، ولا سيما إذا كان هناك ذروة واحدة فقط موجودة على المخطط الاستشرابي وهي التي تهم المحلل.

- تجرى حقنات متكررة من مستحضر المعياري قبل البدء بإجراء المقايسة، وتلاحظ إذا كانت المعطيات السابقة متوافقة وخاصة فيما يتعلق بالدقة Precision.
- إذا لم يذكر خلاف ذلك بالأفرودة يحسب الانحراف المعياري النسبي RSD% لخمس حقنات متكررة من المادة فيما لو كان المتطلب الدستوري 2% أو أقل. أما إذا كان المطلوب أكثر من 2% يجرى ست حقنات متكررة.
- **معامل التذييل "T" Tailing Factor:**

هو مقياس لتناظر الذروة Peak Symmetry، وعندما تزداد قيمته يصبح على شكل ذيل Tail .

- **معامل السعة "K′" Capacity Factor:**

يعبر عن تفاعل مواد العينة المحقونة مع حشوة العمود ومع الطور المتحرك.

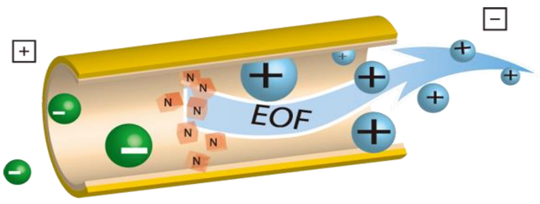
- يطلب عادة إجراء حقنات متكررة من مستحضر المعياري للحكم على أن النظام ذو دقة ملائمة قبل القيام بحقن عينات الفحص.

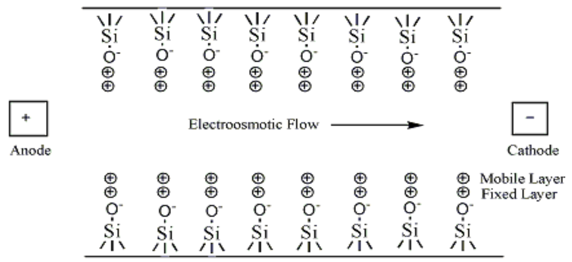
❖ الرحلان الكهربائي الشعري Capillary Electrophoresis

الرحلان الكهربائي الشعري رفيع الإنجاز
High Performance Capillary Electrophoresis

- **المبدأ:**

عند تطبيق حقل كهربي على عمود شعري معبأ بدارئة يحصل تدفق للمذيب داخل هذا العمود يعرف بالتدفق الكهربي الأوسمولي Electro-Osmotic Flow، أما المكونات المذابة فتهاجر بتأثير الحقل الكهربي بسرعات مختلفة تبعاً لشحناتها وأنصاف أقطارها وشكلها. كما تؤدي قيمة pH الوسط ولزوجته والمضافات الموجودة ونوع الدارئة المستخدمة كطور متحرك دوراً أساسياً في عملية الفصل.



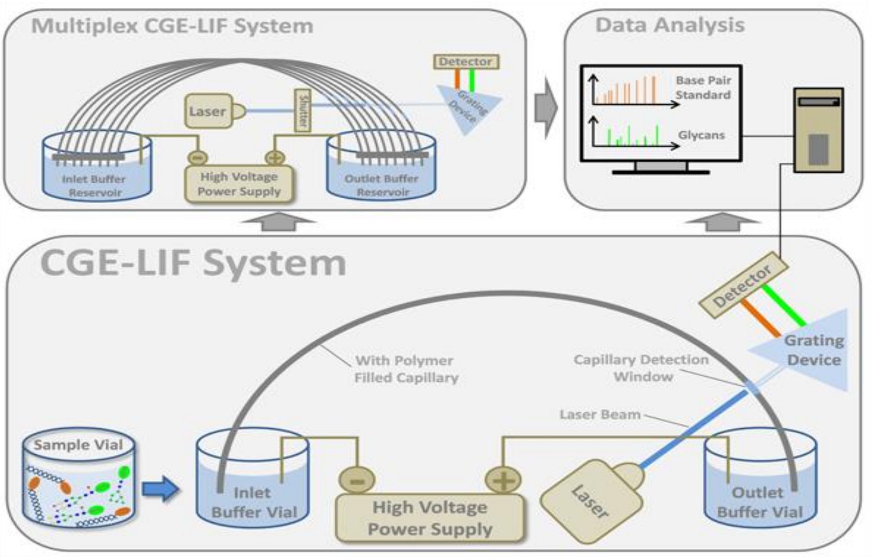


- **المكاشف Detectors:**

- مكشاف الأشعة فوق البنفسجية UV.
- مكشاف الأشعة المرئية Visible.
- مكشاف الموصولية Conductivity.
- مكشاف الأمبيرومتري Amperometry.
- مكشاف طيف الكتلة Mass Spectrometry.

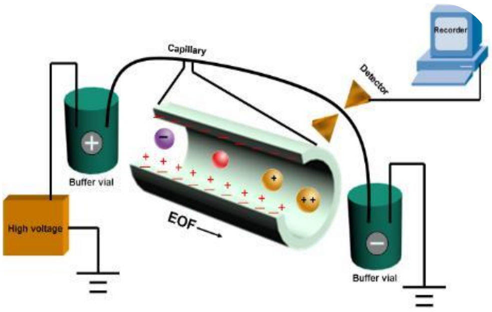
- **العمود الشعري:**

مصنوع من الكوارتز غالباً، يمكن أن يعبأ بمواد هلامية Gel تسمى حينها هذه التقانة بالرحلان الكهربائي الشعري الهلامي.



- **التطبيقات:**

- طريقة مقايسة ذات مضبوطية ودقة عالية لمقايسة العديد من الأدوية في المستحضرات الصيدلانية.
- فصل مزيج للسكاكر المرجعة.
- مراقبة جودة الأدوية الببتيدية.
- تحليل المركبات ذات الجزيئات الكبيرة كالبروتينات وشذرات الـ DNA.
- انتقائية عالية في فصل المصاوغات المرآتية.
- تحديد مرتسم الشوائب.
- تحليل الأدوية ومستقلباتها في السوائل البيولوجية.



- **الميزات:**

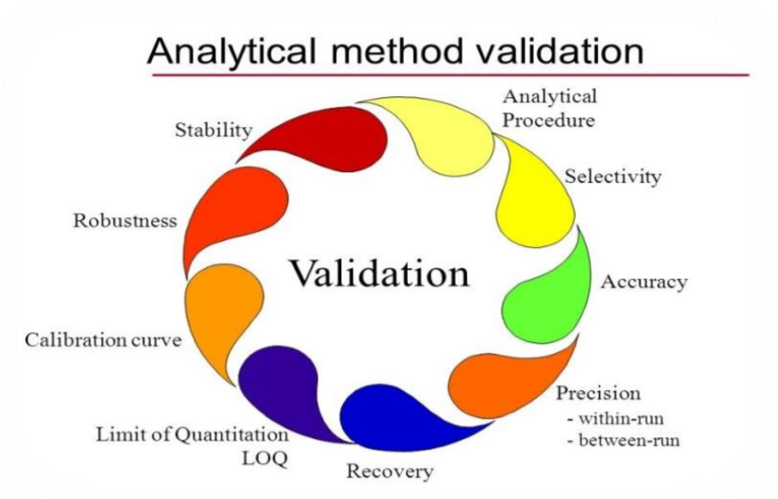
أعلى كفاءة من HPLC بمرات عديدة في:

- قدرة الفصل
- زمن التحليل الأقصر
- رخص الأعمدة
- استهلاكها للمذيبات لا يذكر.

- **المساوئ:**

- ضعف متانتها مقارنة بطريقة HPLC
- حساسيتها أقل
- تتطلب ضبطاً للعديد من المتثابتات بشكل أكبر مما هو عليه في HPLC.

Analytical Methods Validation   مصدوقية الطريقة التحليلية



مصدوقية طريقة تحليلية هي مجموعة من الإجراءات والدراسات المختبرية يجري من خلال تنفيذها التأكد من أن أداء هذه الطريقة سيتوافق دائماً مع المتطلبات التحليلية.

يعبر عن أداء هذه الطريقة بمجموعة من المتثابتات التحليلية.

تصنف الطرائق التحليلية في إحدى المجموعات التالية:

I. المجموعة الأولى : طرائق تحليلية للتعيين الكمي(مقايسة).
II. المجموعة الثانية : طرائق تحليلية لتعيين الشوائب.
III. المجموعة الثالثة: طرائق تحليلية لبيان خاصيات أداء شكل صيدلاني ما، مثل اختبار الذوبان.
IV. المجموعة الرابعة: اختبارات تعيين الهوية.

المتثابتات Parameter	فئة I	فئة II		فئة III	فئة IV
		مقايسة	فحص حدي		
المضبوطية Accuracy	نعم	نعم	-	-	لا
الدقة Precision	نعم	نعم	لا	نعم	لا
الانتقائية/ النوعية Selectivity/ Specificity	نعم	نعم	نعم	-	نعم
حد الكشف Detection Limit	لا	لا	نعم	-	لا
حد القياس الكمي Quantitation Limit	لا	نعم	لا	-	لا
الخطية Linearity	نعم	نعم	لا	-	لا
المجال Range	نعم	نعم	-	-	لا

❑ المضبوطية Accuracy

هي مدى تقارب نتائج اختبار الطريقة المدروسة من القيم الحقيقية.

إذا كانت الدراسة تشمل المادة الفعالة تطبق الطريقة على المعياري المرجعي، أما إذا كانت الدراسة تشمل المادة الفعالة ضمن الشكل الصيدلاني فيجري تطبيق الطريقة على مزائج محضرة مختبرياً مؤلفة من مكونات الشكل الصيدلاني مضافاً إليها مقادير مقيسة من المادة الفعالة.

تحسب المضبوطية على شكل نسبة مئوية للاستعادة Recovery.

❑ الدقة Precision

هي تعبير عن مدى توافق وتناغم نتائج الاختبارات الإفرادية فيما بينها عند تطبيق الطريقة التحليلية عدد من المرات على المادة باعتيان متكرر لعينة متجانسة.

يعبر عن الدقة بالانحراف المعياري النسبي Relative Standard Deviation

يميز في تعيين الدقة ثلاثة مفاهيم:

- **التكرارية Repeatability أو قابلية تكرار النتائج:** وتعني مدى تكرار النتائج نفسها ضمن المختبر نفسه بعد فترة زمنية قصيرة لكن مع المحلل نفسه وبالأجهزة نفسها.
- **الدقة الوسطى Intermediate Precision:** وتعني مدى الاختلاف في النتائج لدى تطبيق الطريقة نفسها في المختبر نفسه في أيام مختلفة (عدة أسابيع) أو من قبل محللين مختلفين أو أجهزة مختلفة.
- **التناتج Reproducibility أو قابلية إعادة النتائج:** ويعني مقدار استعادة النتائج نفسها في مختبرات مختلفة (دراسات مقارنة مشتركة).

❑ الإنتقائية Selectivity / النوعية Specificity

هي قابلية الطريقة التحليلية لمقايسة المادة المراد تحليلها بدقة ومضبوطية مناسبتين بالرغم من وجود مركبات محتملة كالشوائب أو منتجات التخرب أو السواغات.

يمكن اختبار **النوعية** من خلال معرفة ما يلي:

- صلاحية الطريقة لاختبارات الاستعراف أو تعيين هوية المادة المراد تحليلها.
- صلاحية الطريقة لاختبارات النقاوة.
- صلاحية الطريقة للمقايسة.

فالنوعية هو أن الطريقة التحليلية تعطي استجابة خاصة بالمادة المختبرة بمفردها فقط.

بينما تعني **الانتقائية** أن الطريقة قد تعطي استجابات مختلفة لعدد من المكونات الكيميائية التي يمكن أن تتميز من بعضها أو لا تتميز، لكن إذا كانت الاستجابة للمكون المطلوب متميزة عن جميع الاستجابات الأخرى قيل عن الطريقة أنها انتقائية.

❑ حد الكشف Detection Limit

هو الكمية الأقل التي يمكن كشفها من المادة المراد تحليلها في العينة، إنما ليس من الضروري تعيينها كمياً.

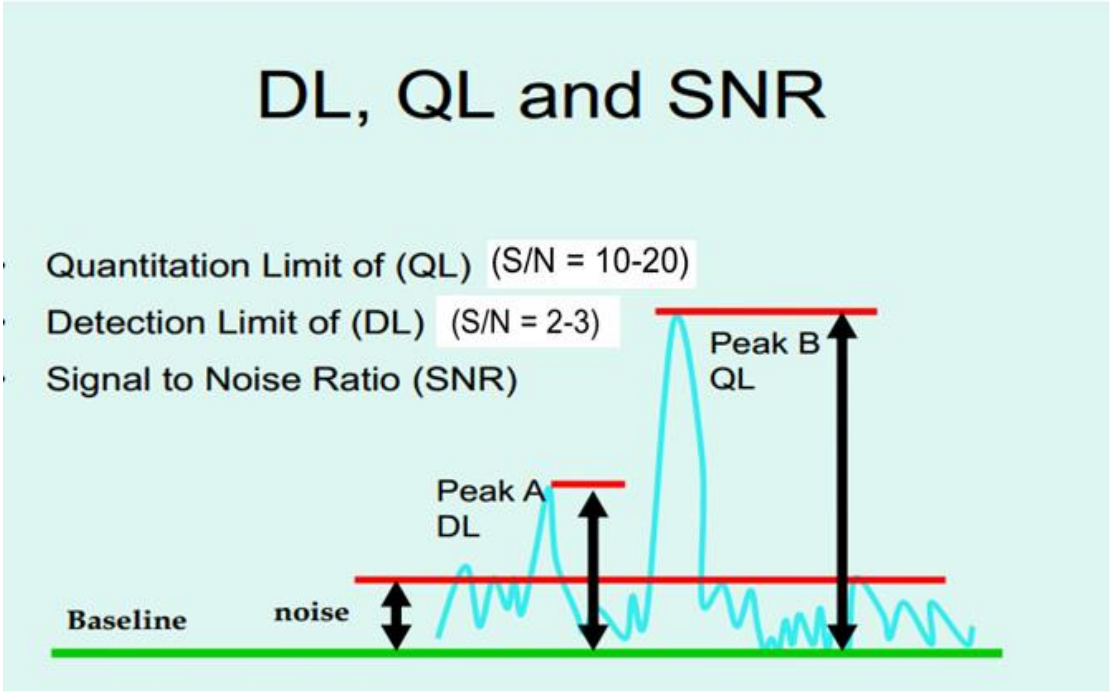
يمكن القول بأنه:

- أصغر تركيز يمكن كشفه وتحديده بأكثر الأجهزة حساسية وبحدود ثقة 95%
- لا تجري معايرة صحيحة باستخدام هذا التركيز.

❑ حد القياس الكمي Quantition Limit

هو الكمية الأقل من المادة المراد تحليلها في العينة والتي يمكن قياسها بدقة ومضبوطية مقبولتين وبالشروط التجريبية المبينة.

أو بعبارة أخرى أصغر تركيز يمكن معايرته كمياً بحدود ثقة 95%.



❑ الخطية Linearity والمجال Range

الخطية هي إمكانية الحصول على قياسات متناسبة طرداً مع تركيز المادة المراد تحليلها ضمن المجال (50-150)% من التركيز المراد العمل به.

(ويشمل هذا المجال كل العمليات الأساسية: معايرة، فحوص ثبات، دراسة تخرب.)

يعبر عن الخطية بيانياً بالانحرافات حول خط الارتداد Regression Line

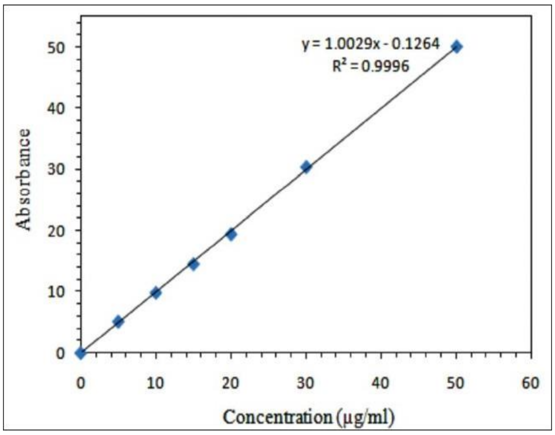
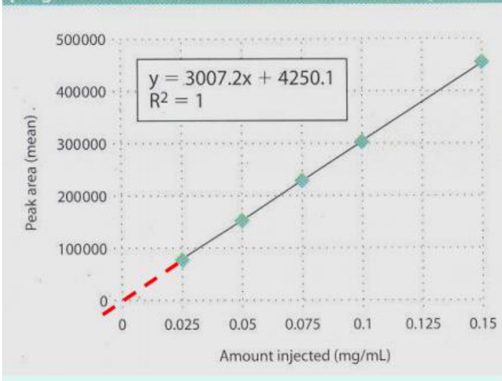


Figure 3 Amount injected versus peak area of progesterone standard to demonstrate linearity.



المجال Range

مجال طريقة تحليلية هو المدى بين الحدين الأعلى والأقل لتركيز المادة المراد تحليلها الذي تجري مقايسته بحد مقبول من الدقة والمضبوطية والخطية فيما لو استخدمت الطريقة كما هو منصوص إليها.

يعبر عنه بالواحدات نفسها لنتائج التحليل (نسبة مئوية، ppm).

❑ القوة Ruggedness

قوة طريقة تحليلية هي تعبير عن درجة التناتج Reproducibility، أو الحصول على نتائج الاختبارات نفسها المأخوذة من العينات نفسها بشروط مختلفة من العمل مثل مختبرات مختلفة، محللين مختلفين، أجهزة مختلفة، وجبات مختلفة من الكواشف، أزمان بين العمل مختلفة، درجات حرارة مختلفة، أيام مختلفة..

❑ المتانة Robustness

متانة طريقة تحليلية هي مقياس لمقدرة الطريقة على بقائها غير متأثرة بالمتغيرات الصغيرة الموضوعة بشكل متعمد في معايير هذه الطريقة، وبيان ما يثبت أن الطريقة التحليلية مصدوقة النتائج خلال الاستخدام العادي الروتيني، مثل تغيير pH، سرعة التدفق، درجة الحرارة، طول الموجة، تركيب الطور المتحرك.

Thank you