

دراسة تحليلية حول مقارنة الشروط المثلى لتحديد التتراسيكلين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 وفق تقانة HPLC-DAD

الدكتور عصام محمد*

الدكتور دارم طباع**

الدكتور تميم عليا***

لبينة الرجية****

(تاريخ الإيداع 9 / 2 / 2014. قُبل للنشر في 1 / 6 / 2014)

□ ملخص □

يهدف هذا البحث إلى تحديد الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين وتحديده باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 والمقارنة بينهما بغية تطوير طريقة سريعة وحساسة، يُمكن اعتمادها في قياس هذا المركب باستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وكاشف المصفوفة الديودية (High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector HPLC-DAD).

اعتمدت هذه الدراسة على تغيير أحد العوامل (نسب الطور المتحرك، درجة حرارة، سرعة تدفق الطور المتحرك، وطول موجة الامتصاص الأعظمي) وتثبيت العوامل الأخرى بغية الوصول إلى أفضل فصل مُمكن مترافقاً مع أفضل زمن احتفاظ ومساحة قمة للمركب المدروس. أظهرت الدراسة أفضلية عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 مقابل عمود C18 لجهة مساحة القمة المفصولة 6.080 وزمن الاحتفاظ 4.169 ونقاوة الطيف 1000 للتركيز نفسه لمركب التتراسيكلين. تميز منحنى المعايرة بخطية جيدة ومُعامل ارتباط $R^2=0.99971$ ممتاز ضمن مجال من التراكيز تراوح بين (1-100ppb).

الكلمات المفتاحية: تتراسيكلين، عمودي فصل كروماتوغرافيين C8، C18، تقانة كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وكاشف مصفوفة ديودية HPLC-DAD

* أستاذ - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

** أستاذ - كلية الطب البيطري - جامعة البعث - حمص - سورية.

*** أستاذ مساعد - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

**** طالبة دراسات عليا (دكتوراه) - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

Analytical Study on Comparison the Optimal Conditions for the Determination of Tetracycline using Chromatographic Columns C8 & C18 by HPLC-DAD

Dr. Issam Mohamad*
Dr. Darem Tabaa**
Dr. Tamem Alya***
Lobaina Alrhia****

(Received 9 / 2 / 2014. Accepted 1 / 6 / 2014)

□ ABSTRACT □

The aim of this research is to determine the optimal conditions for separation and determination of the Tetracycline compound using both chromatographic columns C8 & C18. The comparison between the above mention columns was made in order to develop a sensitive and rapid method which can be used to measuring this compound by High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector HPLC-DAD.

This study depends on changing one of the factors (Mobile phase ratio , Temperature, Flow- rate of the mobile phase, wavelength of the maximum absorption) and fixing the other factors in order to achieve the best possible separation conjugated with the best retention time (R_t) and the best peak area for the studied compound. The study showed that the area of the separated peak (6.080), the retention time (4.169) and the purity 1000 of the spectrum for the same concentration of Tetracycline were preferable by using chromatographic column C8. This result gives a preference for the chromatographic column C8 comparison to column C18. The calibration curve is found to have a good linearity and an excellent correlation coefficient $R^2= 0.99971$ within a range of concentrations between(1-100ppb).

Keywords: Tetracycline, Chromatographic Columns C8, C18, High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector HPLC-DAD.

*Professor, Department of Chemistry ,Faculty of Sciences ,Tishreen University, Lattakia, Syria.

** Professor, Faculty of Veterinary, Albalth University, Lattakia, Syria.

*** Associate Professor, High Institute of Environmental Researchs, Tishreen University, Lattakia, Syria.

**** postgraduate Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة:

تنوعت طرائق الكشف الكمي والكيفي عن مركب التتراسيكلين في المنتجات الغذائية المختلفة ذات المنشأ الحيواني، واستخدمت طرائق تحليلية عدة مثل التحليل الكيفي بكمياتوغرافيا الطبقات الرقيقة (Thin Layer Chromatography, TLC)، والتحليل الكيفي والكمي بالكمياتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High Performance - Liquid Chromatography, HPLC)، والكمياتوغرافيا الغازية (Gas Chromatographic, GC) وتقانة اختبار الإمتزاز المناعي المرتبط بالإنزيم (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) [1,2,3,4].

تنوعت الأعمدة والحشوات والطور المتحرك وقيمة pH العائد لمحلول الطور المتحرك، وكذلك المكشافات التي تتحسس لهذه المركبات، وطرائق الاستخلاص، والمذيبات العضوية المستخدمة، كما اختلفت هذه الطرائق أيضاً بحساسية الكشف وحدوده والاختلاف الواضح جداً في الانحراف المعياري [1,2,4,5].

تميزت تقانة HPLC باستخدام كاشف مطيافية الكتلة (Mass Spectrometric Detector, MS) بحدود كشف منخفضة جداً تصل إلى حدود (0.1-0.3µg/Kg) [5] بالمقارنة مع التقانات الأخرى المستخدمة في التحليل، لكنها تبقى تقانة باهظة التكاليف [6,7] وغير متوافرة في جميع المخابر الخدمية. تُستخدم تقانة HPLC-MS في الاختبارات التأكيذية وليست في الأعمال الروتينية مثل مراقبة الصادات في المنتجات الغذائية المتوافرة في الأسواق [2,8,9,10].

تُعد تقانة LC باستخدام كاشف مطيافية فوق البنفسجي (Ultra Violet Spectrometric Detector, UV) من الطرائق الأكثر استخداماً للكشف عن التتراسيكلين في المنتجات ذات المنشأ الحيواني بحدود كشف من مرتبة µg؛ إذ تتمتع تلك التقانة بحساسية كافية في جميع الحالات، وقد نُشرت دراسات عدة بين الأعوام 2010-2005. يُلاحظ عند استخدام تقانة LC-UV احتواء الكروماتوغرام على قمم متداخلة ناتجة عن تركيبة المادة، أو عن المراحل المتبعة في الاستخلاص والتنقية، مما يتطلب مقارنة طيف المركب المدروس مع طيف المركب العياري بهدف التأكد من هويته، تجدر الإشارة إلى أن هذه الميزة تتوافر عند استخدام تقانة HPLC باستخدام كاشف المصفوفة الديودية (Diode Array Detector, DAD) [5]، أو تقانة HPLC-MS في الاختبارات التأكيذية.

استخدمت تقانة HPLC-DAD التي تعمل وفق كاشف المصفوفة الديودية الضوئية (Photo Diode Array PDA)، وهي تقانة متطورة جداً. تُعد هذه التقانة من الطرائق التحليلية الحساسة والانتقائية والمناسبة لتحليل مركب التتراسيكلين. تسمح هذه التقانة بإجراء دراسة طيفية للمركب المدروس؛ إذ يُمكنها تزويد بمعلومات شاملة عن امتصاصية المركب المدروس عند أكثر من طول موجة في الوقت نفسه، وبالتالي التعرف على المركب من خلال طيفه المحفوظ في المكتبة الخاصة بالجهاز. تستطيع هذه التقانة إزالة الشك أو الارتباب المرافق، وتأكيد نتيجة تحليل ما لا على التعيين في حال كان الطيف الناتج محفوظ في المكتبة الطيفية الخاصة بالجهاز [7].

أهمية البحث وأهدافه:

يهدف البحث إلى تحديد الشروط المثلى (نسب مذيبات الطور المتحرك، سرعة تدفق الطور المتحرك، درجة حرارة العمود الكروماتوغرافي، طول الموجة الأعظمي الأمثل λ_{max}) التي يمكن اعتمادها في تحديد مركب التتراسيكلين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 وفق تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء باستخدام كاشف

المصفوفة الديودية، إضافة إلى مقارنة حساسية الأداء التحليلي لكل من هذين العمودين لجهة مقدرة كلٍّ منهما على تحديد التركيز المعتمد لمركب التتراسيكلين بقمة واضحة ونقاوة عالية وزمن احتفاظ جيد. تكمن أهمية البحث في إمكانية التوصل إلى مساحة قمة جيدة بنقاوة عالية وزمن احتفاظ جيد يساعد في توفير الجهد والزمن اللازمين في المرافق الخدمية عند تحليل عدد من العينات التي تحتوي على مركب التتراسيكلين في الساعة باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

طرائق البحث ومواده:

المواد والمحاليل المستخدمة

- مركب تتراسيكلين هيدروكلوريد (Tetracycline hydrochloride) (92.6%)، إنتاج شركة (Sigma USA).
 - ميثانول (HPLC-grad) (Methanol, CH₃OH) (99.8%)، إنتاج شركة (Merck-Germany).
 - أسيتونتريل (HPLC-grad) (Acetonitrile, CH₃CN) (99.8%)، إنتاج شركة Merck-Germany.
 - ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (de-ionized).
- تتمتع جميع المركبات والمحاليل المستخدمة بدرجة عالية من النقاوة.

الأجهزة والأدوات المستخدمة

- فلاتر غشائية 0.45µm (Milliporemembrane-filters)، إنتاج شركة Goettingen-Germany .Albet
- حمام مائي يعمل بالأموح فوق الصوتية (Ultrasonic water – bath).
- جهاز ترشيح.
- أعمدة فصل كروماتوغرافي: NH₂، (C18-250 x 4.6 mm id., 5µm)، (C8-250 x 4.6 mm id., 5µm).
- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المزود بكاشف المصفوفة الديودية الضوئية ماركة (Agilent-USA)، وتراوح درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي بين 10-80°C، ومجال تدفق الطور المتحرك بين 0.001 - 10ml/min، بحساسية تصل إلى 0.001m/min.
- محاليل الطور المتحرك Mobile-phase: مزيج حمض الأوكساليك (0.01M)، وأسيونتريل وميثانول.

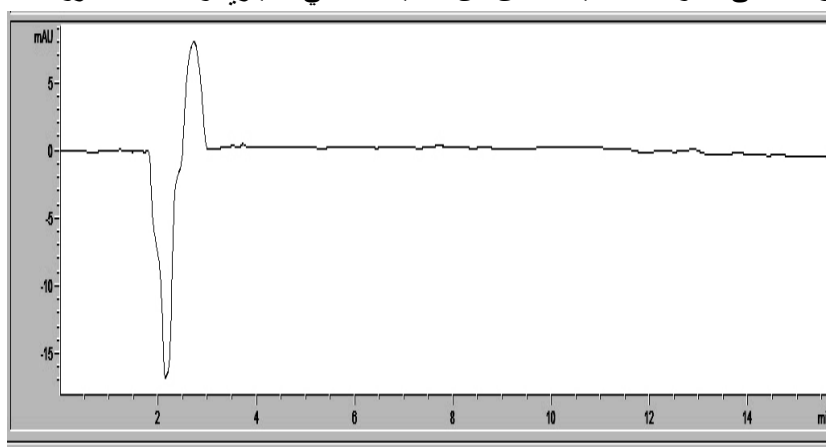
النتائج والمناقشة:

تعتمد أغلب طرائق التحليل المتبعة لفصل مركبات التتراسيكلين في الدراسات المرجعية على الأعمدة الكروماتوغرافية بالطور العكوس C8, C18، وذلك باستخدام طور متحرك من حمض الأوكزاليك والأسيتونتريل والميثانول بنسب مختلفة [11,12,13,14].

أستخدمت لهذه الغاية مجموعة من الأعمدة الكروماتوغرافية C8, C18, NH₂، ولُحظ من خلال الدراسة المخبرية عدم ظهور قمة كروماتوغرافية أو استجابة للعمود الكروماتوغرافي NH₂ لمركب التتراسيكلين كما هو موضح في الشكل (1) مما دفع إلى استبعاده من الدراسة، كون العمود الكروماتوغرافي NH₂ يتمتع بقطبية متوسطة مقارنةً

بقطبية الطور المتحرك العالية، بينما ظهرت قمة مفصولة فصلاً جيداً باستخدام العمودين C8, C18 عند الأطوال الموجية $\lambda=265, 269, 270, 365, 350\text{nm}$.

أُجريت الدراسة التجريبية باستخدام عمودين C8, C18 اعتماداً على تركيزين 0.1, 1ppm لمركب التتراسيكلين على التوالي بغية تحديد شروط الفصل المثلى وزمن الاحتفاظ الأمثل للفصل وفقاً لتقانة HPLC-DAD. طُبقت الشروط التجريبية التي تمّ التوصل إليها على سلسلة محاليل عيارية لمركب التتراسيكلين تراوحت تراكيزها بين 0.001-1ppm وذلك على عمود C8 بغية التحقق من خطية المنحني العياري وفقاً لهذه الشروط.



شكل (1): كروماتوغرام فصل مركب التتراسيكلين باستخدام عمود الفصل NH_2 .

تحديد الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C18)

The Optimal Ratio for Mobile Phase Solvents النسبة المثلى لمذيبات الطور المتحرك

يُعد حمض الأوكزاليك وفقاً للدراسات العلمية والأبحاث المنشورة الأكثر استخداماً في الطور المتحرك لفصل مركبات التتراسيكلين على تقانة HPLC-DAD [9]، وبناءً عليه أُجريت هذه الدراسة المخبرية عبر حقن 1ppm من مركب التتراسيكلين العياري واختيار طول موجة 270nm [4] بهدف تحديد تأثير نسب حمض الأوكزاليك (0.01M) المستخدمة في الطور المتحرك مع نسب مجموعة من المذيبات العضوية في قمة مركب التتراسيكلين المفصولة كما هو موضح في الجدول (1).

جدول (1): تأثير نسب حمض الأوكزاليك والمذيبات العضوية الأخرى للطور المتحرك في قمة مركب التتراسيكلين 1ppm

الطور المتحرك (Mobile phase)	زمن الاحتفاظ (min) \bar{R}_t	مساحة القمة			** حد الثقة $\bar{X} \pm$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
		* \pm Area	RSD%		
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (30:30:40)%	-	-	-		-
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (15:15:70)%	-	-	-		-
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (40:10:50)%	8.31	0.2	0.22	0.2	0.21±0.029
		0.21±5.5			
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M)	6.61	0.7	0.7	0.7	0.703±0.014

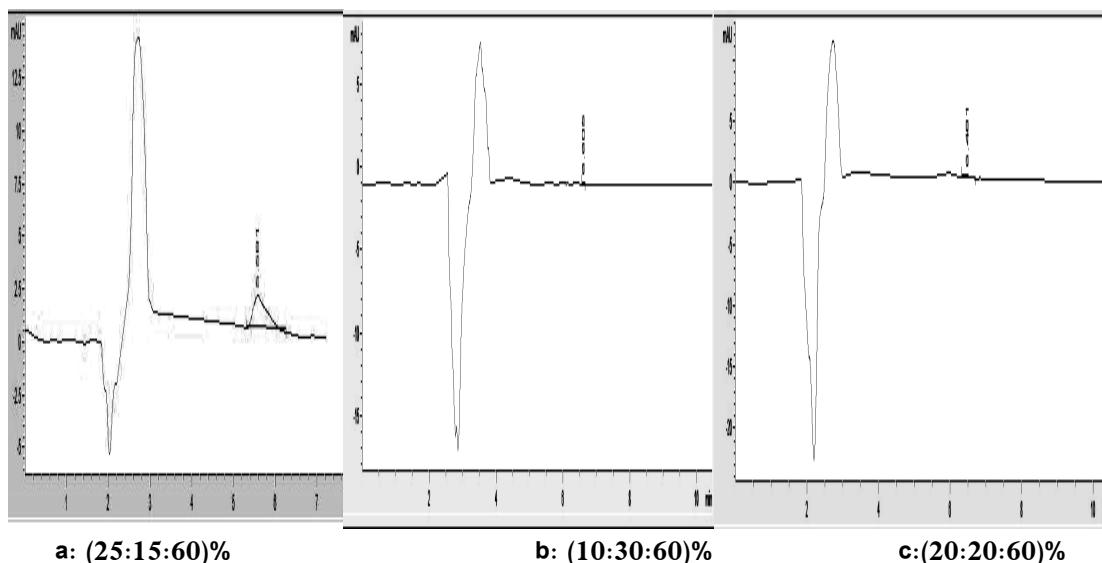
(10:30:60)%		1			
		0.703±0.82			
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (20:20:60)%	6.48	1.1	1.1	1.1	1.1±0.0
		1.1±0			
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%	5.58	6.6	6.65	6.6	6.63±0.66
		6.63±0.4			
T:25°C, Column (C18), λ=270nm, Flow:0.8ml/min					

*n=3 تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركب التتراسيكلين **: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

يُلاحظ من الجدول (1) تباين واضح في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة الكروماتوغرافية لمركب التتراسيكلين، ويعود السبب الرئيس في هذا التباين إلى تغيير نسب المذيبات العضوية وحمض الأوكزاليك الداخلة في تكوين الطور المتحرك؛ إذ تؤثر نسب المذيبات في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة العائدين لمركب التتراسيكلين. من ناحية ثانية، أهملت نتائج تجارب كثيرة لم تظهر فيها قمة واضحة مفصولة لمركب التتراسيكلين، كما هو واضح عند استخدام طور متحرك وفقاً لنسب المزج الموضحة في العمليتين (1,2) في الجدول (1)، حيث لم تظهر قمة واضحة لمركب التتراسيكلين عند استخدام نسب (40,50,70%) من مركب التتراسيكلين، بينما ظهرت قمة لمركب التتراسيكلين عند استخدام نسبة 60% من حمض الأوكزاليك في الطور المتحرك وأصبحت أكثر وضوحاً بتغيير نسب المذيبات الأخرى. يُلاحظ من الجدول (1) أنه يرافق ارتفاع نسبة الميثانول في الطور المتحرك ظهور قمة لمركب التتراسيكلين بمساحة صغيرة غير واضحة وضوحاً جيداً كما هو مبين في الشكل (2-b,c) بالمقارنة مع انخفاض نسبة الميثانول وارتفاع نسبة الأسيتونتريل وثبات نسبة حمض الأوكزاليك في الطور المتحرك وفقاً لنسب المزج الموضحة في الجدول (1) والشكل (2-a)؛ إذ ظهرت قمة لمركب التتراسيكلين عند استخدام الطور المتحرك وفقاً للنسب الآتية (25:15:60%) Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) بزمن احتفاظ مقبول ومساحة قمة أفضل بالمقارنة مع النسب السابقة. تجدر الإشارة إلى أنه تم الحصول على أفضل مساحة قمة لمركب التتراسيكلين بمتوسط 6.63 عند متوسط زمن احتفاظ قدره 5.58min وبانحراف معياري نسبي مؤي 0.4%، ومن الواضح أن تم فصل تلك القمة فصلاً جيداً دون حدوث تداخلات ناجمة عن المركبات العائدة للطور المتحرك.

أستخدم التمليص متساوي القوة Isocratic في دراسة مركب التتراسيكلين باستخدام مزيج متجانس مؤلف من مذيبات عضوية عدة، علماً أنه لم يتم التوصل إلى نتيجة ذات قيمة علمية باستخدام طور متحرك من مذيب عضوي واحد أو عند إجراء التمليص المتدرج Gradient لمذيبات عضوية عدة. لُحظ أيضاً زيادة في قوة تمليص مركب التتراسيكلين من العمود الكروماتوغرافي عند زيادة نسبة المذيب العضوي الاسيتونتريل الأقل قطبية مقارنةً مع نسبة الميثانول الأقوى قطبية بين مكونات الطور المتحرك.

استخدمت في هذه الدراسة تقانة كروماتوغرافيا الطور العكوس Reverse-phase liquid chromatography التي يتمتع طورها الساكن في العمود الكروماتوغرافي (C18-250x 4.6 mm I d., 5µm) بأنه غير قطبي أو ضعيف القطبية مقارنةً بالطور المتحرك الأكثر قطبية.



شكل (2): كروماتوغرامات تأثير نسب ACN: MeOH: oxalic acid (0.01M) في طور المتحرك على قمة مركب التتراسيكلين 1ppm

The Optimal Flow Rate for Mobile Phase

سرعة التدفق المثلى للطور المتحرك

تم في هذه المرحلة من دراسة تحديد الشروط التحليلية المثلى لفصل مركب التتراسيكلين على تقانة HPLC-DAD حقن محلول عياري لمركب التتراسيكلين تركيزه 1ppm مترافقاً مع تغيير في تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي ضمن مجال تراوح بين 0.5-1ml/min وثبتت مذيبات الطور المتحرك (0.01M) Acetonitrile: methanol: oxalic acid عند النسب (25:15:60)% التي توصلت إليها الدراسة التجريبية.

جدول (2): علاقة تدفق الطور المتحرك بمتوسط زمن الاحتفاظ العائد لمركب التتراسيكلين.

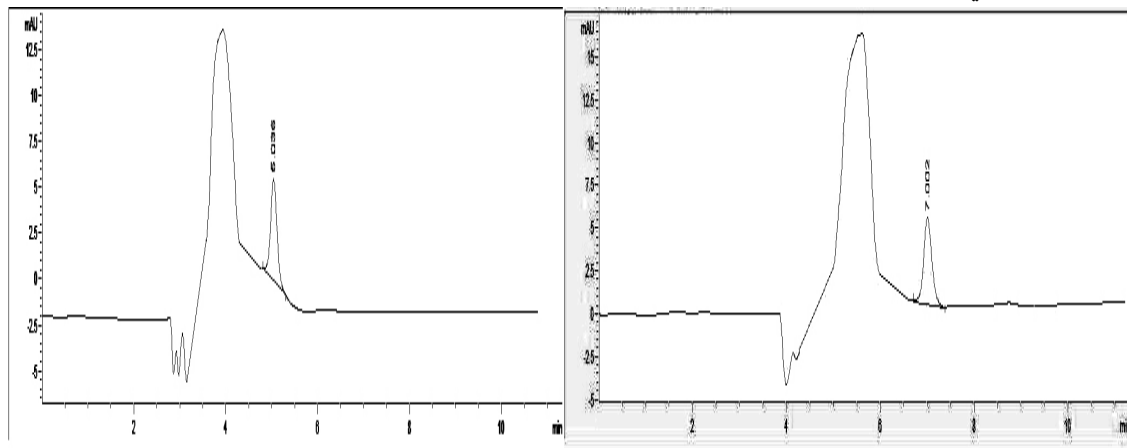
تدفق الطور المتحرك (ml/min)	مساحة القمة * ± RSD% Area			** حد الثقة $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	زمن الاحتفاظ (min) * ± RSD% Rt			** حد الثقة $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
	0.5	6.38	6.39	6.4	6.390±0.025	7.007	7.004	7.002
6.390±0.156			7.004±0.036					
0.6	6.37	6.39	6.41	6.390±0.050	6.801	6.805	6.8	6.802±0.009
	6.390±0.313				6.802±0.039			
0.7	6.42	6.4	6.4	6.407±0.029	5.872	5.87	5.872	5.871±0.003
	6.407±0.191				5.871±0.021			
0.8	6.3	6.3	6.36	6.320±0.086	5.573	5.58	5.58	5.578±0.01
	6.320±0.548				5.578±0.074			
0.9	6.3	6.3	6.33	6.310±0.043	5.39	5.37	5.38	5.380±0.025
	6.310±0.274				5.380±0.186			
1	6.21	6.2	6.26	6.223±0.080	5.036	5.036	5.036	5.036±0.0
	6.223±0.469				5.036±0			

T:25°C, Column (C18), λ=270nm, Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%

** : حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

* n=3 تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركب التتراسيكلين

يوضح الجدول (2) متوسط النتائج المخبرية التي تم الحصول عليها من الدراسة التجريبية بغية الوصول إلى أفضل شروط فصل لمركب النتراسيكلين. أظهرت النتائج المخبرية عدم تأثر مساحة قمة مركب النتراسيكلين بتغير تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي، وبالتالي عدم ظهور تغير ملحوظ في المساحات العائدة لقمم مركب النتراسيكلين. تراوح متوسط مساحات قمم مركب النتراسيكلين بين (6.22-6.41) بانحراف معياري نسبي مئوي تراوح بين (0.156-0.548%)، مع ضرورة الإشارة إلى الفصل الجيد للقمة العائدة لمركب النتراسيكلين كما هو موضح في الشكل (3). يجب التنويه إلى أن زيادة تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي أثار تأثيراً إيجابياً في زمن تمليص مركب النتراسيكلين في العمود الكروماتوغرافي؛ إذ سُجل أقل متوسط زمن احتفاظ 5.036min لمركب النتراسيكلين عند تدفق 1m/min للطور المتحرك بقمة مفصولة فصلاً جيداً الشكل (3-b)، وأعلى متوسط زمن احتفاظ 7.0043min عند تدفق 0.5m/min للطور المتحرك ضمن العمود الكروماتوغرافي الشكل (3-a)، وهذا ما يوفر الجهد والزمن اللازمين في تحليل عدد من العينات التي تحتوي على مركب النتراسيكلين في الساعة باستخدام تقانة HPLC-DAD في المرافق الخدمية.



شكل (3-b): تدفق 1m/min للطور المتحرك

شكل (3-a): تدفق 0.5m/min للطور المتحرك

شكل (3): كروماتوغرامات تأثير تدفق الطور المتحرك في قمة مركب النتراسيكلين 1ppm.

درجة الحرارة المثلى لفرن العمود الكروماتوغرافي

Optimal Temperature for Chromatographic Column oven

دُرس تجريبياً تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمة مركب النتراسيكلين، حيث جرى حقن محلول عياري من مركب النتراسيكلين بتركيز 1ppm في عمود كروماتوغرافي (C18)، طوره المتحرك مكون من مزيج (0.01M) Acetonitrile: methanol: oxalic acid بنسب (25:15:60)% ويتدفق 1 m/min عند طول موجة 270nm.

جرى وفقاً لتقانة HPLC-DAD تغيير درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي (C18) بدءاً من درجة حرارة الغرفة 25°C إلى الدرجة 40°C، ولُحظ بعد إجراء اختبارات تجريبية عدة لدرجات الحرارة عدم ظهور تغير ملحوظ في مساحة القمة الكروماتوغرافية لمركب النتراسيكلين مع تغير درجة حرارة فرن العمود، بينما طرأ تغير طفيف على زمن الاحتفاظ العائد لهذه القمة، حيث انخفض زمن الاحتفاظ من 5.037min في درجة حرارة 25°C إلى

4.795min في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي مثوي تراوح بين 0-0.0465% كما هو موضح في الجدول(3).

لُحظ من الدراسة السابقة أن درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي تؤدي دوراً ضعيفاً في سهولة تمليص مركب التتراسيكلين ومذيبات الطور المتحرك من العمود الكروماتوغرافي.

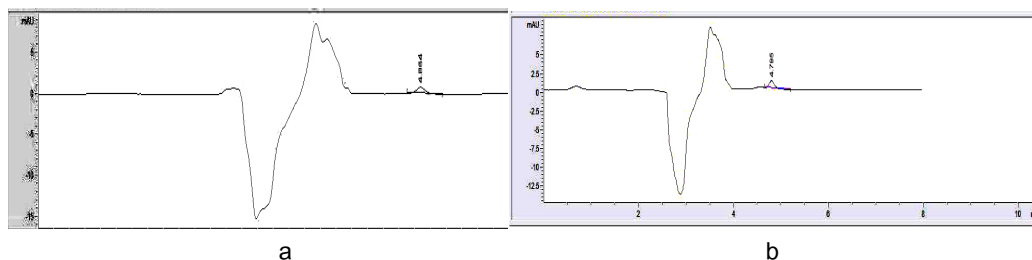
تُستخدم الأعمدة الكروماتوغرافية عموماً في تقانة HPLC في درجات حرارة أعلى من درجة الحرارة العادية بهدف تخفيض لزوجة المذيبات العضوية في الطور المتحرك. يُرافق ارتفاع درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي تدفق أكبر للطور المتحرك عبر العمود عبر تخفيض الضغط المطلوب لعبور الطور المتحرك خلال الطور الساكن في العمود. يُمكن أيضاً من خلال رفع درجة حرارة فرن العمود خفض زمن الاحتفاظ بغية تحسين التفريق عن طريق زيادة سرعة انتشار المركبات. يوضح الشكل (4) قمة كروماتوغرافية متناظرة لمركب التتراسيكلين في درجتى حرارة 40°C و 35°C.

جدول(3): تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمة مركب التتراسيكلين 1ppm.

درجة حرارة فرن العمود T(°C)	مساحة القمة * ± RSD% Area			** حد الثقة ± $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	زمن الاحتفاظ (min) Rt			** حد الثقة ± $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
	25	6.7	6.7	6.7	6.7±0	5.036	5.036	5.04
	6.7±0				5.037±0.0465			
30	6.6	6.61	6.64	6.617±0.052	4.909	4.909	4.909	4.909±0
	6.617±0.315				4.909±0			
35	6.6	6.58	6.58	6.87±0.029	4.864	4.864	4.864	4.864±0
	6.587±0.186				4.864±0			
40	6.6	6.62	6.61	6.610±0.025	4.796	4.795	4.794	4.795±0.002
	6.610±0.15				4.795±0.021			

Flow: 1m/min, Column: (C18), λ=270nm, Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M)
(25:15:60)%

** حد الثقة عند مستوى ثقة 95%. n=3: تكرارية حقن المحلول العياري لمركب التتراسيكلين.



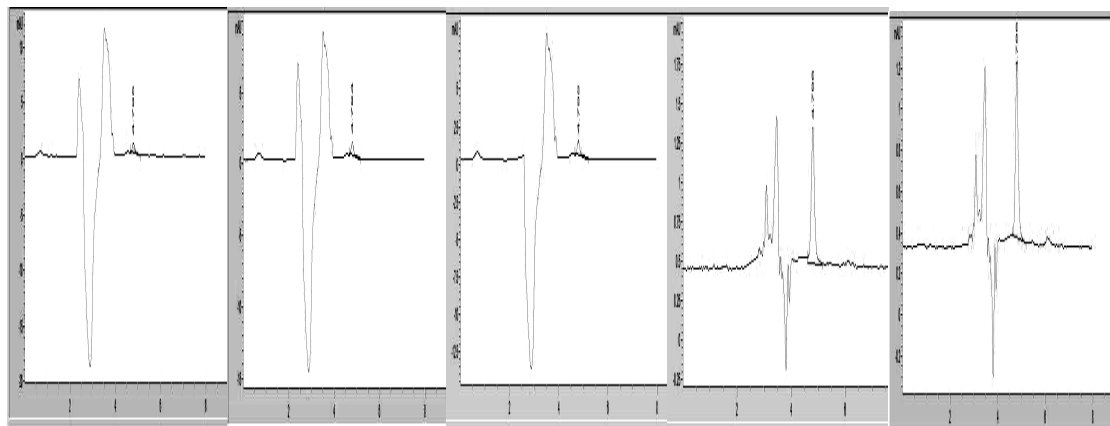
شكل(4): كروماتوغرام مركب التتراسيكلين 1ppm، عند درجتى حرارة 35°C، a: و 40°C، b:

Optimal Maximum Wavelength λ_{max}

طول الموجة الأعظمي λ_{max} الأمثل

تسمح تقانة جهاز HPLC-DAD المستخدمة في هذه الدراسة باختيار مجموعة من الأطوال الموجية ضمن مجال طيفي عريض لكاشف الـDAD. اختير المسح الطيفي لمركب النتراسيكلين ضمن مجال تراوح بين 200-400nm عند الأطوال الموجية $\lambda=265, 269, 270, 350, 365\text{nm}$. يوفر الكاشف إمكانية تحديد امتصاصية مركب النتراسيكلين عند الأطوال الموجية المختارة في وقت واحد.

طبقت من أجل تحديد طول الموجة الأعظمي لمركب النتراسيكلين أفضل الشروط التحليلية التي تمّ التوصل إليها سابقاً على تقانة HPLC-DAD من ناحية سرعة تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي (C18) $1\text{m}/\text{min}$ (Acetonitrile:methanol:oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%، ودرجة حرارة فرن العمود 40°C .



a: $\lambda=265\text{nm}$ b: $\lambda=269\text{nm}$ c: $\lambda=270\text{nm}$ d: $\lambda=350\text{nm}$ g: $\lambda=365\text{nm}$

شكل (5): كروماتوغرامات مركب النتراسيكلين 1ppm عند أطوال موجية مختارة ضمن المجال الطيفي 200-400nm.

جدول (4): نتائج متوسط مساحة قمم مركب النتراسيكلين بتركيز 1ppm على عمود (C18) عند الأطوال الموجية المختارة.

تركيز Concentration	طول الموجة $\lambda(\text{nm})$	زمن الاحتفاظ (min) R_t	مساحة القمة * $\pm \text{RSD}\% \text{ Area}$			** حد الثقة \pm $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
1ppm	265	4.795	7.210	7.20	7.20	7.203±0.014
			7.203±0.08			
	269	4.794	7.10	7.10	7.10	7.10±0
			7.1±0			
	270	4.795	6.601	6.60	6.60	6.60±0.001
6.60±0.011						
350	4.796	7.60	7.60	7.60	7.60±0	
		7.60±0				
365	4.796	6.790	6.80	6.80	6.797 ±0.014	
		6.797 ±0.085				
Average RT: 4.795min, RSD%:0.016						
T:40°C, Column (C18), Acetonitrile:methanol:oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%, Flow:1ml/min						

** : حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

* n=3 تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركب النتراسيكلين.

يوضح الشكل (5) الكروماتوغرامات العائدة لمركب التتراسيكلين بتركيز 1ppm على عمود الفصل (C18) باستخدام تقانة HPLC-DAD. جمعت النتائج المترتبة عن هذه الدراسة في الجدول (4). يُلاحظ من الجدول (4) أن متوسط زمن احتفاظ مركب التتراسيكلين عند الأطوال الموجية المختارة بلغ 4.795min بفارق زمني قدره 0.002min بين أدنى وأعلى زمن احتفاظ لمركب التتراسيكلين عند الأطوال الموجية المختارة وبانحراف معياري نسبي مؤي بلغ 0.016%. لُحظ أيضاً اختلاف استجابة الكاشف لمركب التتراسيكلين عند الأطوال الموجية المختارة سواءً لقمة مركب التتراسيكلين أو للقمة العائدة للطور المتحرك.

اختلفت مساحة قمة مركب التتراسيكلين باختلاف طول الموجة المُعتمد؛ إذ تراوح متوسط مساحات القمم بين 6.6-7.6 بانحراف معياري نسبي مؤي أقل بمُجمله من 0.1%. سُجلت امتصاصيات أعظمية لمركب التتراسيكلين عند الأطوال الموجية 265, 269, 350nm كما هو واضح في الجدول (4)، وكانت امتصاصيته الأعلى عند طول الموجة 350nm: λ .

Purity Factor of Chromatographic Peak

عامل نقاوة القمة الكروماتوغرافية

تمَّ في هذا البحث اعتماد مفهوم عامل النقاوة بغية التأكد من نقاوة طيف مركب التتراسيكلين الذي تمَّ فصله باستخدام عمود C18 ولاحقاً عمود C8. يُعبَّر عن قيمة النقاوة المتوسطة للطيف المنتقاة من بين الطيوف المسجلة والتي تتجاوز حد العتبة Threshold المحسوب؛ إذ تُعبَّر العتبة عن متوسط قيمة العتبة لـ32 طيفاً متماثلاً تجاوزوا حد العتبة المحسوب من قبل الجهاز. تعتمد قيمة العتبة على ارتفاع امتصاصية كل طيف ومجموعة طيوف الضجيج في بداية تفعيل ملف المعلومات. تحسب قيمة النقاوة بين كل طيف والطيف المتوسط لطيوف أربعة قمم منتقاة. تُعدَّ قيم نقاوة طيف مركب التتراسيكلين باستخدام عمود C18 منخفضة ولم يتجاوز أي منها حد العتبة المحسوب في الجهاز نفسه؛ إذ تراوحت بين 360.85-390 كما هو موضح في الجدول (5)، يظهر في الشكل (6) نقاوة قمة مركب التتراسيكلين، وتُعدَّ نقاوة طيف المركب مثالياً كلما اقتربت قيمة نقاوته من حد العتبة أو تجاوزه؛ إذ يُمكن لعامل النقاوة أن يصل أحياناً إلى 1000.

جدول (5): قيم نقاوة طيف مركب التتراسيكلين بتركيز 1ppm.

$\lambda_{max}(nm)$	265	269	270	350	365
نقاوة القمة (purity of peak)	390	380.5	360.85	383.39	388.93
العتبة (Threshold)	939.51	939.407	939.296	939.207	939.131



شكل (6): نوافذ عامل نقاوة طيف مركب التتراسيكلين عند طول الموجة 265nm.

جُمعت الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C18) التي توصلت إليها النتائج المخبرية في هذه الدراسة في الجدول (6).

جدول(6): الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C18).

الشروط المثلى		مساحة القمة ± RSD% Area	\bar{R}_t (min)		
الطور المتحرك	Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M)(25:15:60)%	6.630±0.40	5.580		
تدفق الطور المتحرك	1m/min	6.223±0.469	5.036		
درجة حرارة فرن العمود	40°C	6.610±0.15	4.795		
طول الموجة الأمثل	نقاوة الطيف	265nm	390	7.203±0.08	4.750
		269nm	380.5	7.10±0.0	4.940

تحديد الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C8)

النسبة المثلى لمذيبات الطور المتحرك The Optimal Ratio for Mobile Phase Solvents

أُجريت هذه الدراسة المخبرية عبر حقن مركب التتراسيكلين العياري بتركيز 0.1ppm بهدف تحديد تأثير نسب حمض الأوكزاليك (0.01M) المستخدمة في الطور المتحرك مع نسب مجموعة من المذيبات العضوية في زمن احتفاظ ومساحة قمة مركب التتراسيكلين المفصولة على العمود الكروماتوغرافي C8. طُبقت الشروط الأولية نفسها المُستخدمة في العمود الكروماتوغرافي (C18-250x4.6mm id., 5µm) على العمود الكروماتوغرافي (C8-250x4.6mm id., 5µm) لجهة تدفق الطور المتحرك 0.8m/min، ودرجة حرارة فرن العمود 25°C، وطول موجة 270nm.

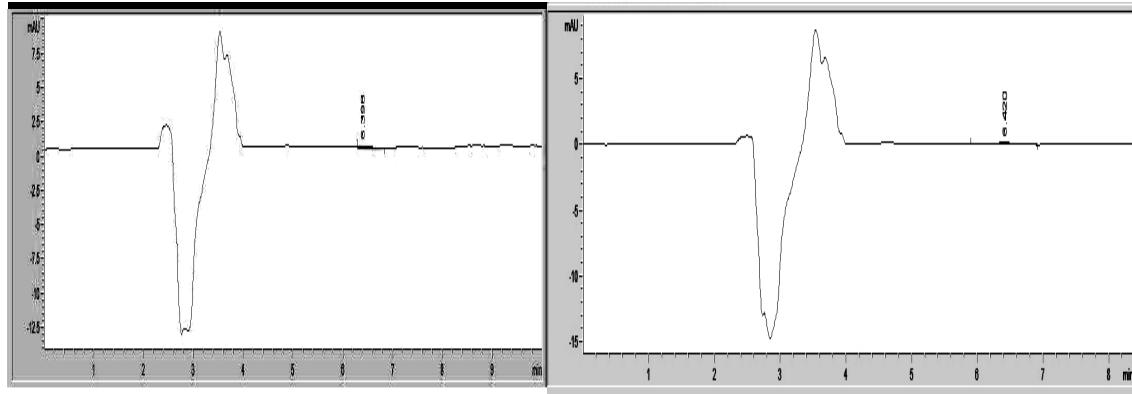
يُلاحظ تباين واضح في نتائج الجدول (7)؛ إذ أثرت نسب المذيبات في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة العائدين لمركب التتراسيكلين. لُحظ عدم ظهور قمة واضحة مفصولة لمركب التتراسيكلين عند استخدام طور متحرك وفقاً لنسب المزج % (15:15:70) (Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M)، بينما ظهرت قمة لمركب

جدول(7): تأثير نسب حمض الأوكزاليك والمذيبات العضوية الأخرى للطور المتحرك في قمة مركب التتراسيكلين 0.1ppm.

الطور المتحرك (Mobile phase)	زمن الاحتفاظ (min) \bar{R}_t	مساحة القمة * \pm RSD% \bar{Area}			** حد الثقة $\pm \bar{X}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (15:15:70)%	-	-			-
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (40:10:50)%	7.872	0.03	0.02	0.02	0.023±0.014
		0.023±24.477			
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (15:25:60)%	6.32	1.1	1.1	1.1	1.1±0
		1.1±0			
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (20:20:60)%	6.398	3.2	3.2	3.2	3.2±0
		3.2±0			
Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%	6.42	4	4	4	4±0
		4±0			
Flow: 0.8 ml/min, T:25°C, (C8-250x 4.6 mm, i.d. 5µm), λ=270nm					

*n=3: تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركب التتراسيكلين. ** حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

التتراسيكلين عند استخدام حمض الأوكزاليك بنسبة 60% في الطور المتحرك. يُلاحظ من الجدول (7) ظهور قمة لمركب التتراسيكلين بمساحة مترافقة مع ارتفاع نسبة الأسيتو نتريل في الطور المتحرك كما هو مبين في الشكل (7-a,b). ظهرت قمة لمركب التتراسيكلين عند استخدام الطور المتحرك وفقاً للنسب الآتية (25:15:60) (Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) بزمن احتفاظ مقبول وأعلى مساحة قمة بالمقارنة مع النسب السابقة. تجدر الإشارة أنه تم الحصول على أفضل متوسط مساحة قمة لمركب التتراسيكلين قيمتها 4 عند متوسط زمن احتفاظ قدره 6.42min وبانحراف معياري نسبي 0%، ومن الواضح أنه تم فصل تلك القمة فصلاً جيداً من دون حدوث تداخلات ناجمة عن المركبات العائدة للطور المتحرك .



a: Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (20:20:60)%

b: Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%

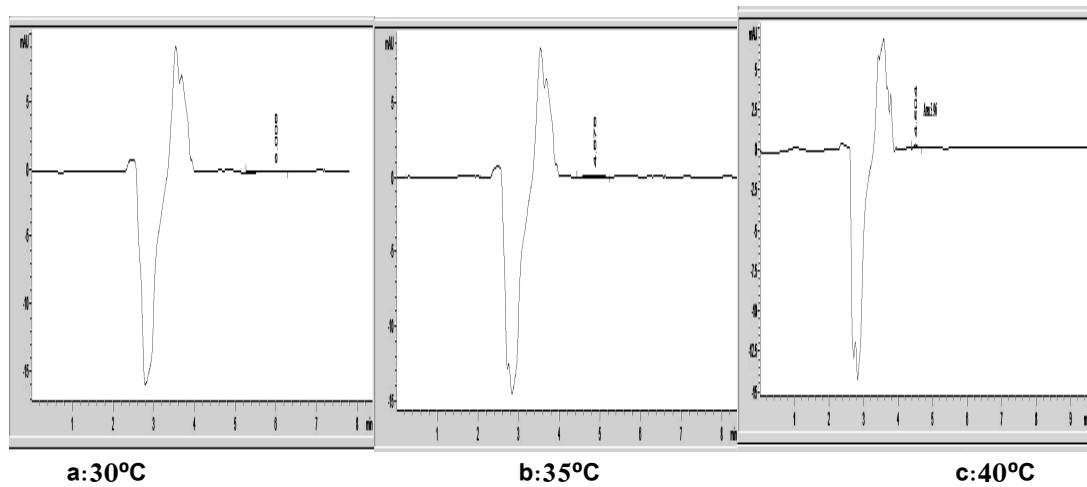
شكل(7): كروماتوغرامات تأثير نسب مكونات الطور المتحرك في قمة مركب النتراسيكلين 0.1ppm.

درجة الحرارة المثلى لفرن العمود الكروماتوغرافي

Optimal Temperature for Chromatographic Column oven

جرى حقن محلول عياري من مركب النتراسيكلين بتركيز 0.1ppm في العمود الكروماتوغرافي (C8)، طوره المتحرك مكون من مزيج % Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (25:15:60) بتدفق 0.8 m/min عند طول موجة 270nm.

جرى وفقاً لتقانة HPLC-DAD تغيير درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي C8 بدءاً من درجة حرارة الغرفة 25°C إلى الدرجة 40°C، وقد لُحظ عدم ظهور تغيير ملحوظ في مساحة القمة الكروماتوغرافية العائدة لمركب النتراسيكلين مع تغيير درجة حرارة فرن العمود، بينما طرأ تغيير طفيف على زمن الاحتفاظ لهذه القمة، حيث انخفض متوسط زمن الاحتفاظ من $R_t:6.423\text{min}$ في درجة حرارة 25°C إلى 4.504min في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي متوي تراوح بين 0-0.09% كما هو موضح في الجدول (8) والشكل (8).



شكل(8): كروماتوغرامات موافقة لمركب النتراسيكلين 0.1ppm مع تغيير درجات الحرارة.

جدول(8): دراسة تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمة مركب التتراسيكلين 0.1ppm.

درجة حرارة فرن العمود T(°C)	مساحة القمة * ± RSD% Area			** حد الثقة ± \bar{X} $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	زمن الاحتفاظ (min) \bar{Rt}			** حد الثقة ± \bar{X} $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
	25	4.02	4.0	4.0	4.007±0.029	6.43	6.42	6.42
	4.007±0.288			6.423±0.09				
30	3.90	3.92	3.94	3.920±0.05	6.008	6.0	6.005	6.004±0.010
	3.920±0.51				6.004±0.067			
35	4.10	4.09	4.09	6.093±0.014	4.878	4.878	4.878	4.878±0
	6.093±0.186				4.878±0			
40	3.96	3.961	3.959	3.96±0.002	4.504	4.503	4.504	4.504±0.001
	3.96±0.025				4.504±0.013			

Flow: 0.8 ml/min, Column: (C8), $\lambda=270\text{nm}$, Acetonitrile:methanol:oxalic acid (0.01M) (25:15: 60)%

n=3*: تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركب التتراسيكلين. **: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

Optimal Maximum Wavelength λ_{max}

طول الموجة الأعظمي λ_{max} الأمثل

تم في هذه المرحلة من تحديد الشروط التحليلية المثلى لفصل مركب التتراسيكلين على تقانة HPLC-DAD حقن محلول عياري لهذا المركب بتركيزي 0.1, 1ppm في العمود (C8) باستخدام الطور المتحرك Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M)(25:15:60)% بتدفق 0.8ml/min عند درجة حرارة فرن العمود 40°C، بغية تحديد مساحة القمة وزمن ظهور مركب التتراسيكلين المفصول على العمود الكروماتوغرافي (C8) عند الأطوال الموجية المحددة 265, 269, 270, 350, 365nm. جمعت نتائج متوسط مساحات قمم مركب التتراسيكلين عند الأطوال الموجية المختارة في الجدول (9).

جدول(9): نتائج متوسط مساحة قمم مركب التتراسيكلين المفصول على عمود (C8) عند الأطوال الموجية المختارة.

طول الموجة $\lambda(\text{nm})$	زمن الاحتفاظ (min) \bar{Rt}	مساحة القمة * ± RSD% Area			** حد الثقة ± \bar{X} $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	زمن الاحتفاظ \bar{Rt} (min)	مساحة القمة * ± RSD% Area			** حد الثقة ± \bar{X} $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
		0.1ppm					1ppm			
265	4.771	6.07	6.10	6.10	6.090±0.043	4.770	62.30	62.31	62.31	62.307±0.014
		6.090±0.284				62.307±0.009				
269	4.768	6.8	6.8	6.8	6.80±0.0	4.767	64.41	64.4	64.4	64.403±0.014
		6.80±0				64.403±0.009				
270	4.768	3.80	3.801	3.804	3.802±0.005	4.765	37.60	37.61	37.60	37.603±0.014
		3.802±0.055				37.603±0.015				
350	4.770	4.70	4.702	4.709	4.704±0.012	4.767	47.21	47.26	47.22	47.230±0.066
		4.704±0.10				47.230±0.056				
365	4.771	4.90	4.90	4.92	4.907±0.029	4.768	49.702	49.71	49.7	49.704±0.013
		4.907±0.235				49.704±0.011				
$\bar{Rt} : 4.7696\text{min}$, RSD%:0.03					$\bar{Rt} : 4.7674\text{min}$, RSD%:0.0381					

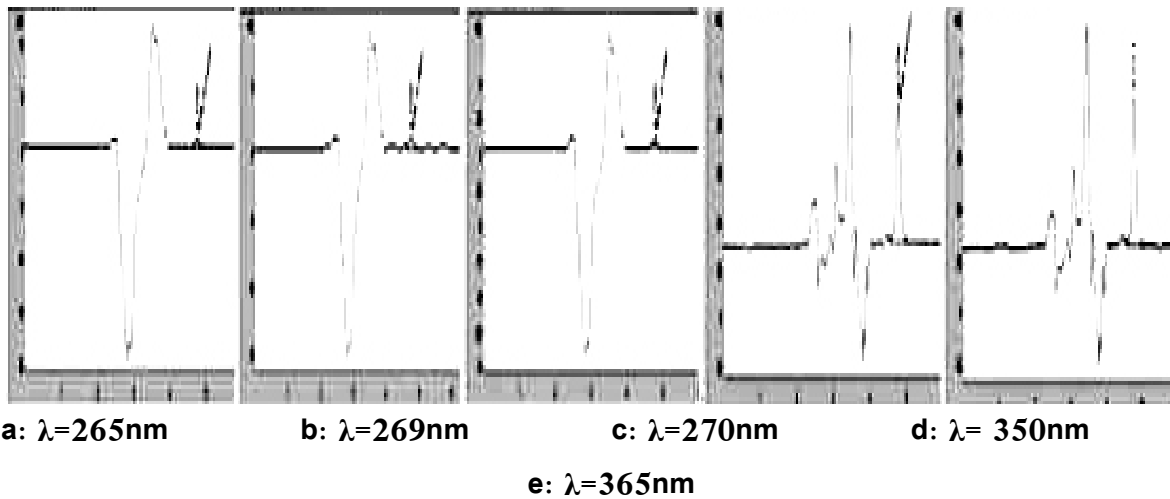
Flow:0.8ml/min, T:40°C, Column (C8), Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M) (25:15:60)%

n=3*: تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركب التتراسيكلين. **: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

يُلاحظ من الجدول (9) أن متوسط زمن احتفاظ مركب التتراسيكلين 0.1ppm بلغ $R_t:4.7696\text{min}$ بفارق زمني أعظمي وصل إلى 0.003min فقط بين القيم الكروماتوغرافية بانحراف معياري نسبي مئوي %0.03 للحقنة نفسها عند الأطوال الموجية المختارة، بينما كان متوسط زمن الاحتفاظ العائد لمركب التتراسيكلين 1ppm $R_t:4.7674\text{min}$ بفارق زمني أعظمي وصل إلى 0.005min فقط بين القيم الكروماتوغرافية بانحراف معياري نسبي مئوي %0.0381 للحقنة نفسها عند الأطوال الموجية المختارة. لُحظ أيضاً اختلاف في استجابة الكاشف لناحية ظهور قمة مركب التتراسيكلين والقيم العائدة للطور المتحرك عند الأطوال الموجية المختارة.

تباينت مساحات القيم العائدة لمركب التتراسيكلين باختلاف طول الموجة؛ إذ تراوح متوسط مساحات القيم ضمن المجال (3.8–6.8) بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من %0.3 بالنسبة للتركيز 0.1ppm، بينما تراوح متوسط مساحات القيم ضمن المجال (37.6–64.4) بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من %0.02 بالنسبة للتركيز 1ppm. سُجلت امتصاصيتان أعظمتان متقاربتان لمركب التتراسيكلين عند طولي الموجة 265, 269nm λ كما هو موضح في الجدول (9)، وكانت الامتصاصية عند طول الموجة 269nm λ أفضلهما.

يوضح الشكل (9) كروماتوغرامات مركب التتراسيكلين 0.1ppm على عمود الفصل (C8) باستخدام تقانة جهاز HPLC–DAD.



شكل(9): كروماتوغرامات مركب التتراسيكلين 0.1ppm عند أطوال موجية ضمن مختارة المجال 200–400nm.

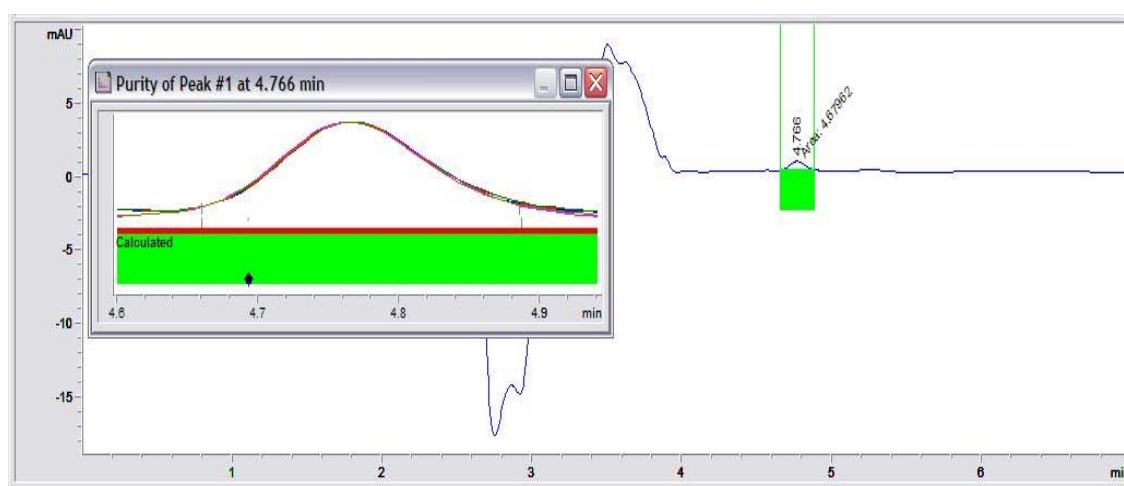
طُبقت الشروط التحليلية المثلى التي تمّ التوصل إليها سابقاً على دراسة المسح الطيفي لمركب التتراسيكلين باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي (C8) وكاشف DAD ضمن المجال $\lambda=220-400\text{nm}$ ، وبينت النتائج ظهور أفضل امتصاصيتين لمركب التتراسيكلين عند طولي الموجة 265,269nm فقط كما هو موضح في الجدول(9). تميز طيف القمة المفصولة عند طولي الموجة 265,269nm بمساحة أفضل بالمقارنة مع مساحات القيم العائدة لمركب التتراسيكلين عند الأطوال الموجية الأخرى.

يُلاحظ أيضاً من الشكل (10) ظهور امتصاصية جيدة وقمة مفصولة فصلاً جيداً ومميزاً لمركب التتراسيكلين 0.1ppm عند طول الموجة $\lambda=265\text{nm}$ وفق الطيف المُعتبر، وبمساحة قريبة جداً من مساحة القمة المفصولة لمركب التتراسيكلين عند $\lambda=269\text{nm}$ ، وقد تميزت قمة مركب التتراسيكلين المفصولة عند $\lambda=265\text{nm}$ بطيف ذي نقاوة عالية

مقارنةً بنقاوة الطيف عند الأطوال الموجية الأخرى؛ إذ بلغ عامل نقاوة الطيف العائد لمركب التتراسيكلين قيمته المثلى (1000) عند طول الموجة $\lambda=265\text{nm}$ كما هو وارد في الجدول (10) وموضح في الشكل (10).

جدول(10): نقاوة طيف التتراسيكلين 0.1ppm عند الأطوال الموجية المنتقاة باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8.

$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	265	269	270	350	365
نقاوة القمة (purity of peak)	1000	981.6	978.21	986.99	443.85
العتبة (Threshold)	871.81	873.61	880.43	966.46	963.28



شكل(10): مخطط نقاوة قمة مركب التتراسيكلين 0.1ppm عند طولي الموجة $\lambda_{\text{max}}=265\text{nm}$.

تُعدّ نقاوة طيف أي مركب مثالية كلما اقتربت نقاوته من القيمة 1000، لذلك تكون النتيجة التي توصلت إليها هذه الدراسة مثالية لمركب التتراسيكلين عند طول الموجة $\lambda_{\text{max}}=265\text{nm}$ مع ضرورة التنويه أنه تمّ أيضاً الحصول على قمم متناظرة وحادة من دون أي تداخلات مع القمم العائدة للطور المتحرك المستخدم وبنقاوة مقبولة عند الأطوال الموجية المختارة وفقاً للجدول (10).

The Optimal Flow for Mobile Phase

التدفق الأمثل للطور المتحرك

في هذه الدراسة اعتماد طول الموجة 265nm الذي سُجلت عنده مساحة قمة جيدة ونقاوة مثالية لمركب التتراسيكلين بالمقارنة مع الأطوال الموجية الأخرى كما هو موضح في الجدولين (9, 10).

جرى بادئ ذي بدء حقن محلول عياري لمركب التتراسيكلين بتركيزين 0.1, 10ppm بغية تحديد الشروط التحليلية المثلى لفصل هذا المركب على تقانة HPLC-DAD مترافقاً مع تغيير في تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي وثبيت الشروط المثلى الأخرى التي توصلت إليها الدراسة التجريبية السابقة عند طول الموجة 265nm. تراوحت تدفقات الطور المتحرك ضمن المجال 0.5-1ml/min. يوضح الجدول(11) النتائج التي تمّ الحصول عليها وفقاً للدراسة التجريبية للوصول إلى أفضل شروط فصل لمركب التتراسيكلين.

سُجلت مساحات مقاربة لقمة مركب التتراسيكلين تراوحت بين 635.43-638.6 بانحراف معياري نسبي مؤوي أقل من 0.06% للتركيز 10ppm، وضمن المجال 6.08-6.11 للتركيز 0.1ppm بانحراف معياري نسبي مؤوي أقل من 0.3%. انعكس ارتفاع تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي ايجابياً على زمن تمليص مركب

التتراسيكلين في العمود الكروماتوغرافي حيث ظهرت قمة المركب عند زمن احتفاظ $R_t: 4.169 \text{min}$ عند تدفق $1 \text{m}/\text{min}$ بانحراف معياري نسبي مثوي أقل من 0.3% مع ضرورة الإشارة إلى الفصل الجيد لقمة التتراسيكلين وفقاً لما هو موضح في الشكل (11). ينعكس هذا الانخفاض في الزمن انعكاساً إيجابياً في المرافق الخدمية وذلك من ناحية عدد العينات التي يتم تحديد مركب التتراسيكلين فيها في الساعة باستخدام تقانة HPLC-DAD. ساهم اختيار العمود الكروماتوغرافي (C8) مع مجموعة الشروط التحليلية المثلى السابقة في فصل مركب التتراسيكلين عند متوسط زمن احتفاظ $R_t = 4.17 \text{min}$ وهو زمن جيد للتحاليل الروتينية في المراكز الخدمية، التي تقوم بتحليلات خدمية لطيف واسع من المنتجات الغذائية فضلاً عن توفير في استهلاك المحاليل والمذيبات العضوية اللازمة.

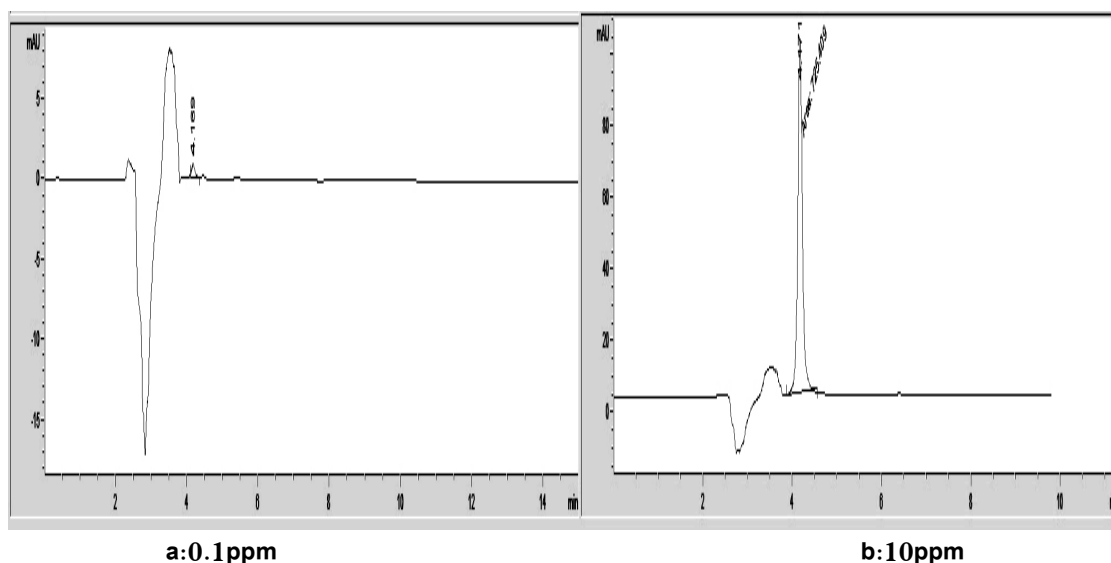
جدول(11): تغير متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمة مركب التتراسيكلين 10ppm , 0.1 مع تغير تدفق الطور المتحرك عند طول الموجة 265nm .

Flow (ml/min)	زمن الاحتفاظ (min) * $\pm \text{RSD}\%$ Rt $\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{**}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			مساحة القمة * $\pm \text{RSD}\%$ Area $\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{**}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			زمن الاحتفاظ (min) * $\pm \text{RSD}\%$ Rt $\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{**}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			مساحة القمة * $\pm \text{RSD}\%$ Area $\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{**}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		
	0.1ppm						10ppm					
0.5	8.372	8.371	8.371	6.09	6.11	6.10	8.371	8.371	8.371	638.10	638.14	638.08
	8.371 \pm 0.001			6.10 \pm 0.164			8.371 \pm 0			638.107 \pm 0.005		
	8.371 \pm 0.007			6.10 \pm 0.025			8.371 \pm 0			638.107 \pm 0.076		
0.6	7.801	7.803	7.801	6.12	6.10	6.11	7.801	7.805	7.8	635.49	635.63	635.6
	7.802 \pm 0.015			6.11 \pm 0.164			7.802 \pm 0.007			635.573 \pm 0.012		
	7.802 \pm 0.003			6.11 \pm 0.025			7.802 \pm 0.034			635.573 \pm 0.183		
0.7	6.02	6.04	6.02	6.09	6.12	6.11	6.02	6.02	6.02	635.42	635.48	635.4
	6.027 \pm 0.192			6.107 \pm 0.250			6.02 \pm 0			635.433 \pm 0.007		
	6.027 \pm 0.029			6.107 \pm 0.038			6.02 \pm 0			635.433 \pm 0.104		
0.8	4.783	4.784	4.782	6.11	6.11	6.11	4.783	4.78	4.78	635.8	635.91	635.6
	4.783 \pm 0.021			6.11 \pm 0			4.781 \pm 0.036			635.77 \pm 0.025		
	4.783 \pm 0.002			6.11 \pm 0			4.781 \pm 0.004			635.77 \pm 0.391		
0.9	4.590	4.572	4.584	6.12	6.11	6.10	4.59	4.57	4.58	638.32	638.9	638.59
	4.582 \pm 0.2			6.11 \pm 0.164			4.58 \pm 0.218			638.603 \pm 0.045		
	4.582 \pm 0.023			6.11 \pm 0.025			4.58 \pm 0.025			638.603 \pm 0.722		
1	4.168	4.169	4.169	6.07	6.07	6.10	4.170	4.167	4.167	635.82	635.76	635.21
	4.169 \pm 0.014			6.08 \pm 0.285			4.168 \pm 0.042			635.597 \pm 0.053		
	4.169 \pm 0.001			6.08 \pm 0.043			4.168 \pm 0.004			635.597 \pm 0.836		

T:40°C, column: (C8), $\lambda=265 \text{nm}$, Acetonitrile: methanol: oxalic acid (0.01M)(25:15:60)%

** حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

*n=3: تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركب التتراسيكلين



شكل(11): كروماتوغرام مركب التتراسيكلين عند التدفق 1m/min.

جُمعت الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C8) التي توصلت إليها النتائج المخبرية في هذه الدراسة في الجدول(12).

جدول(12) الشروط المثلى لفصل مركب التتراسيكلين 0.1ppm باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C8).

الشروط المثلى		مساحة القمة ± RSD% Area	\bar{R}_t (min)
الطور المتحرك	Acetonitrile: methanol : oxalic acid (0.01M)(25:15:60)%	4.0±0.0	6.420
درجة حرارة فرن العمود	40°C	3.960±0.025	4.504
طول الموجة الأمثل	نفاوة 265nm	6.090±0.284	4.771
	الطيّف 269nm	6.80±0.0	4.768
تدفق الطور المتحرك	1m//min	6.080±0.285	4.169

تكرارية فصل مركب التتراسيكلين باستخدام عمود C8 وفق تقانة HPLC-DAD

يوضح الجدول (13) تكرارية فصل مركب التتراسيكلين بتركيز 0.1ppm وفقاً للشروط التحليلية المثلى التي تمّ التوصل إليها وفقاً لتقانة HPLC-DAD. تميزت طريقة تحديد مركب التتراسيكلين 0.1ppm وفقاً لتقانة HPLC-DAD وتطبيق الشروط المثلى المترتبة عن هذه الدراسة عند طول الموجة $\lambda_{max}=265nm$ بتكرارية جيدة لعشرين مكرراً؛ إذ سجل متوسط زمن الاحتفاظ $R_t = 4.169min$ بانحراف معياري نسبي مؤني 0.019%، في حين سجل متوسط مساحة القمة ومتوسط ارتفاعها ومتوسط عرضها 6.09 و 0.78 و 0.13 على التوالي بانحراف معياري نسبي مؤني 0.87% و 1.55% و 5.63% على التوالي أيضاً.

جدول (13) : تكرارية تحديد مركب التتراسيكلين 0.1ppm باستخدام عمود كروماتوغرافي C8 وفقاً لتقانة HPLC-DAD باعتماد الشروط المثلى المترتبة عن هذه الدراسة.

Peak	mean ± RSD%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
RT(min)	4.169±0.019	4.170	4.168	4.169	4.170	4.170	4.168	4.169	4.170	4.168	4.170	4.168	4.170	4.168	4.169	4.169	4.169	4.170	4.168	4.170	4.160
Area	6.09±0.87	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.10	6.0	6.10	6.10	6.10	6.10	5.90	6.10	6.10	6.10
height	0.78±1.555	0.78	0.77	0.79	0.79	0.77	0.77	0.78	0.8	0.79	0.76	0.79	0.78	0.79	0.79	0.78	0.77	0.76	0.77	0.8	0.79
Width	0.13±5.63	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13	0.11	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.13	0.13	0.14	0.12	0.13

*n=20 تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركب التتراسيكلين.

the Calibration Curve

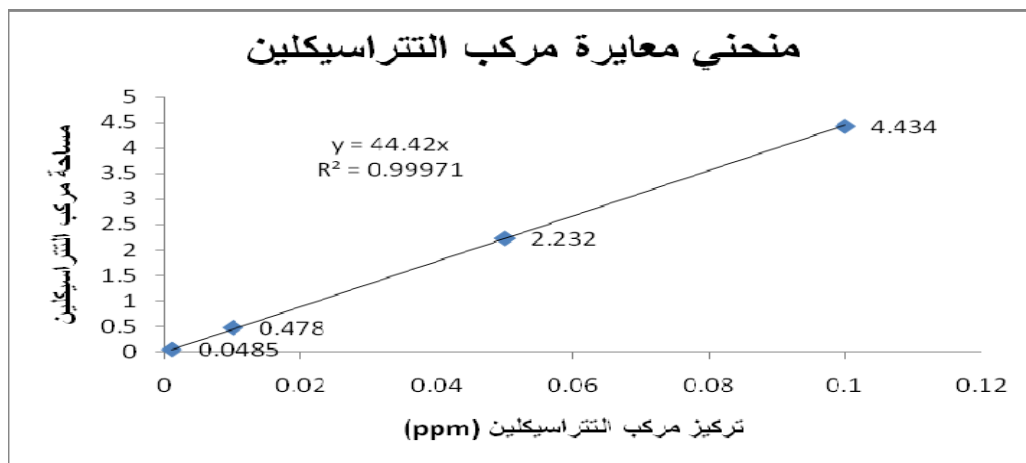
منحنى المعايرة:

حضرت سلسلة من المحاليل العيارية (1, 10, 50, 100ppb) 0.001, 0.01, 0.05, 0.1ppm لمركب التتراسيكلين، وطبقت الشروط المثلى التي تم الحصول عليها باعتماد تركيز 0.1ppm \cong 100ppb وفقاً لهذه الدراسة على تحديد مركب التتراسيكلين بتركيز تراوحت بين 0.001- 0.1ppm، وبينت النتائج ظهور قمم بمساحات جيدة بلغت 4.434 و 2.232 و 0.478 و 0.0485 بزمن احتفاظ R_t :4.171 min لكل تركيز من هذه التراكيز كما هو موضح في الجدول (14).

جدول (14): مساحة قمم مركب التتراسيكلين الموافقة لتراكيز تراوحت بين 0.001- 0.1ppm

تركيز مركب التتراسيكلين العياري (ppm)	مساحة قمة مركب التتراسيكلين
0.001	0.0485
0.010	0.478
0.050	2.232
0.100	4.434

يوضح الشكل (12) منحنى معايرة مركب التتراسيكلين الذي تميز بخطية جيدة ضمن مجال 0.001- 0.1ppm عند طول الموجة المعتمد λ_{max} =265nm وبمعامل الارتباط $R^2=0.99971$ correlation coefficient عند زمن احتفاظ 4.171min.



شكل (12): منحنى المعايرة لمركب التتراسيكلين

تطابقت شروط فصل مركب التتراسيكلين من ناحية مكونات الطور المتحرك وسرعة تدفقه في الطريقة التي توصلت إليها هذه الدراسة وفقاً لتقانة HPLC-DAD باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي Eclipse XDB- C8 (250 x 4,6mm id., 5µm) مع طريقة الفصل الموصوفة باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي (Hypersil C8 (250 x 4,6mm id., 5µm) [9]، مع اختلاف في طول الموجة الموافق للامتصاص الأعظمي لمركب التتراسيكلين، حيث تمّ فصل مركب التتراسيكلين عند طول الموجة $\lambda_{max}=365nm$ باستخدام العمود الكروماتوغرافي (Hypersil C8 (250 x 4,6mm id., 5µm) بزمن احتفاظ $R_t:6.7min$ ، وعند طول الموجة $\lambda_{max}=265nm$ وفق هذه الدراسة باستخدام العمود الكروماتوغرافي (Eclipse (250 x 4,6mm id, 5µm) بزمن احتفاظ أقل بدقيقتين $R_t:4.169min$.

الاستنتاجات والتوصيات:

1- تُظهر هذه الدراسة كما هو موضح في الجدولين (6, 12) أفضلية في زمن الاحتفاظ $R_t:4.169min$ عند التركيز 0.1ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي Eclipse XDB- C8 (250 x 4,6mm id., 5µm) بالمقارنة مع زمن الاحتفاظ $R_t:4.750min$ عند التركيز 1ppm باستخدام العمود الكروماتوغرافي (Eclipse XDB- C18 (5µm، نظراً للاختلاف الحاصل في طول السلسلة الكربونية بين عمودي الفصل الكروماتوغرافيين المُستخدمين.

2- تُبين هذه الدراسة كما هو موضح في الجدولين (6,12) مساحة قمة أفضل 6.08 الموافقة لتركيز 0.1ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بالمقارنة مع مساحة القمة 7.203 الموافقة لتركيز 1ppm (أكبر بحوالي 10 مرات عن سابقه) باستخدام العمود الكروماتوغرافي C18.

3- تميزت قمة مركب التتراسيكلين المفصولة عند طول الموجة $\lambda_{max}=265nm$ كما هو موضح في الجدولين (5, 10) بطيف ذي نقاوة عالية 1000 عند التركيز 0.1ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 مقارنةً بنقاوة الطيف 390 المفصول عند طول الموجة نفسه وتركيز 1ppm باستخدام العمود الكروماتوغرافي C18.

4- تمّ اعتماداً على الشروط المثلى المُترتبة عن هذه الدراسة- تحديد مُركب التتراسيكلين ضمن مجال من التراكيز تراوح بين (1-10ppb) \cong (0.001-0.1 ppm)، ورسم المنحني العياري الموافق الذي تميز بخطية جيدة ضمن مجال -0.001 correlation coefficient عند طول الموجة المُعتمد $\lambda_{max}=265nm$ وبمعامل الارتباط $R^2=0.99971$ وزمن احتفاظ 4.169min.

5- تمّ فصل مركب التتراسيكلين باستخدام العمود الكروماتوغرافي Eclipse XDB- C8(250 x 4,6mm id., 5µm) وفقاً لهذه الدراسة بزمن احتفاظ $R_t:4.169min$ أقل بدقيقتين بالمقارنة مع العمود الكروماتوغرافي (Hypersil C8 (250 x 4,6mm id., 5µm) [9]. يعود سبب ذلك على الأرجح إلى الاختلاف في نسب المذيبات الداخلة في تركيب الطور المتحرك oxalic acid : methanol : Acetonitrile (25:15:60)% و (15:25:60)% لكل من عمودي الفصل Eclipse XDB- C8 و Hypersil على التوالي.

6- تُعد هذه الدراسة من الدراسات الأكاديمية والتطبيقية في مجال الكيمياء التحليلية كونها تهدف إلى تحديد الشروط المثلى الضرورية لتحديد النزر المتبقي من الصادات الحيوية المُستخدمة كمحفزات نمو وفي مُعالجة بعض الأمراض عند الكائنات الحية ذات المنشأ الحيواني ومنتجاتها الغذائية المختلفة المُستخدمة في التغذية البشرية.

7- ضرورة القيام بأبحاث مماثلة في هذا المجال بغية التوصل إلى طريقة حساسة وسريعة توفر الجهد والزمن اللازمين في تحاليل المرافق الخدمية المُهتمة بتحديد النزر المتبقي لصادات أخرى مُماثلة.

المراجع:

- [1] CODONY, R. COMPANO , R. GRANADOS , M. GARCIA-REGUEIRO , A. J. PRAT, D. M. *Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography–electro-spray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 959, 2002, 131–141.
- [2] GENTILI, A. PERRET, D. MARCHESE, S. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 24, N^o. 7, 2005, 704-733.
- [3] CORCIA , D. A. NAZZARI, M. *Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products*. Journal of Chromatography A, 974, 2002, 53–89.
- [4] MACNEIL, J. D. *Drug residues in animal tissues*. J.AOAC. Vol. 86, N^o.1, 2003, 116-127.
- [5] ONAL, A. *Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices*. Food Chemistry. 127, 2011, 197–203.
- [6] SCHNEIDER, J. M. BRADEN, E. S. REYES-HERRERA, I. DONOGHUE, J. D. *Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B. Vol. 846, Issues 1-2, 2007, 8-13.
- [7] CRISTOFANI, E. ANATONINI, C. TOVO, G. FIORONI, L. PIERSANTI, A. GALARINI, R. *A confirmatory method for the determination of tetracycline in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection*. Analytica Chimica Acta. 637,2009,40-46.
- [8] ANDERSEN, C. W. ROYBAL, E. J. GONZALES, A. S. TURNIPSEED, B. S. PFENNING, P. A. KUCK, R. L. *Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta. 529, 2005, 145–150.
- [9] CINQUINA, L. A. LONGO, F. ANASTASI, G. GIANNETTI, L. COZZANI, R. *Validation of high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle*. Journal of Chromatography A. Vol. 987. Issues. 1-2, 2003, 227-233 .
- [10] TSAI, H. W. HUANG, C. T. HUANG, J. J. HSUE, H. Y. CHUANG, Y.H. *Dispersive solid- phase micro-extraction method for sample extraction in the analysis of four tetracycline in water and milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection*. Journal of Chromatography A.,1216,2009, 2263-2269.
- [11] FRITZ, W. J. ZUO, Y. *Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography*, Food Chemistry, 105, 2007, 1297–1301.
- [12] FURASAWA, N. *Isolation of tetracycline in milk using a solid-phase extraction column and water eluent*. Talanta. 59, 2003, 155–159.
- [13] OKA, H. ITO, Y. MATSUMOTO, H. *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*. Journal of Chromatography A. 882, 2000, 109–133.
- [14] HORIE, M. TAKEGAMI, H. TOYA, K. NAKAZAWA, H. *Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta. Vol. 492. Issues 1-2, 2003, 187-197.