

طريقة تحليلية جديدة وتقييمها لتحديد سيفترياكسون الصوديوم باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالطور العكوس

مصطفى زيدان* . د. محمد جمال الخطيب** . د. حسين خضر***

المخلص

عُيِّن تركيز مركب سيفترياكسون الصوديوم (Ceftriaxone Sodium) باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالطور العكوس ومكشاف الأشعة فوق البنفسجية عند طول الموجة 254 nm. أُجري التحليل على العمود C18 أبعاده (25cm×4.6 mm) (5 μm ×)، واستُخدم بوصفه طورًا متحركًا مزيج (وقاء 93%: كحول إيزوبروبيلي 7%)، ويتألف الوقاء من خلات الصوديوم ثلاثية الماء بتركيز 5.1 g/L / حمض الخل الثلجي لضبط الـ pH عند الدرجة 6، ومعدل التدفق 1.2 mL/min. حصلنا على النتائج الخطية للتركيز المدروسة ضمن المجال (8–178) μg/mL وحققنا معامل ارتباط (Correlation Coefficient) بقيمة $R^2 = 0.9999$. حُسب الانحراف المعياري النسبي المئوي لست عينات (n=6)، وكانت القيمة مقبولة $RSD\% = 0.74$ ، تميزت هذه الطريقة بالدقة والانتقائية العالية وانخفاض الكلفة، ومن ثم إمكانية استثمارها على مجال واسع في مخابر الرقابة الدوائية. الكلمات المفتاحية: الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالطور العكوس، سيفترياكسون الصوديوم، الكيمياء الخضراء.

*قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، معمل الـديماس للصناعات الدوائية، مركز الدراسات والبحوث العلمية، دمشق
**أستاذ، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
***باحث رئيسي-معهد بحوث الصناعات الصيدلانية والكيميائية-مركز الدراسات والبحوث العلمية-دمشق، سورية.

New Analytical Method and its Validation to Determine Ceftriaxone Sodium by RP-HPLC

M. Zaidan* Dr. M. J. Alkhateeb** Dr. H. Khudr***

Abstract

The concentration of Ceftriaxone Sodium was determined by using Reversed Phase Liquid Chromatography (RP-HPLC) equipped with UV detector on wavelength of 254 nm and column C18 (25cm, 4.6mm, 5 μ m). The mobile phase consists of (Buffer 93%: 2-Propanol 7%) and the buffer is a solution of 5.1 g/L of Sodium Acetate Trihydrate adjusted to pH=6 with glacial acetic acid. The flow rate adjusted to 1.2 mL/min. Results were linear in the range of (8 – 178) μ g/mL with correlation coefficient $R^2=0.9999$.

The relative standard deviation of (n=6) replicates was RSD%=0.74, This method was characterized by high precision, high specificity, low cost and suitable for quality control in pharmaceutical industries.

Keywords: RP-HPLC, Ceftriaxone Sodium, Green Chemistry.

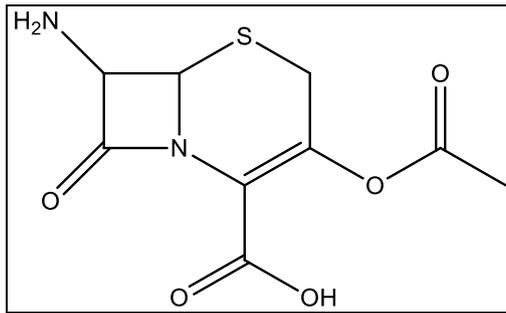
* Department of chemistry_ Faculty of sciences_ Damascus university_ Syria.

** Research Institute for Pharmaceutical and Chemical Industries_ Scientific Studies and Research Centre (SSRC)_Damascus, Syria.

*** Department of chemistry_ Faculty of sciences_ Damascus university, Syria / Dimas for Pharmaceutical Industries_ Scientific Studies and Research Centre (SSRC)_ Damascus, Syria

المقدمة

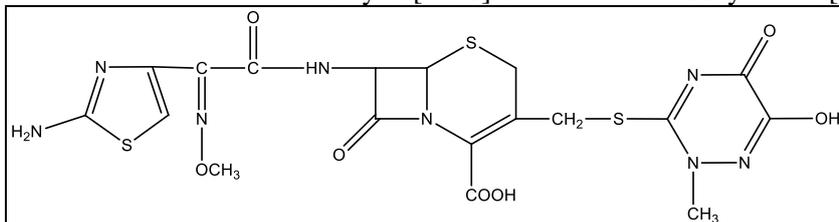
يتم تحليل المواد الكيميائية الداخلة في الصناعات الدوائية سواء كمواد أولية أو كمكونات ضمن المستحضرات الدوائية ومنها السيفالوسبورينات (Cephalosporins) وفق الطرائق المتبعة في دساتير الأدوية الأمريكي والبريطاني والأوروبي والياباني [1-4]. السيفالوسبورينات هي مضادات حيوية واسعة الطيف تستخدم لعلاج أمراض تسمم الدم (Septicemia)، والالتهاب الرئوي (Pneumonia)، والتهاب السحايا (Meningitis)، والتهابات القناة الصفراوية (Biliary-tract infections)، والتهاب الصفاق (Peritonitis)، والتهابات المسالك البولية (Urinary-tract infections) [5]. السيفالوسبورينات في معظمها مركبات نصف صناعية وتنتج عن إضافة زمر جانبية على مركب 7-أمينو حمض السيفالوسبورين (7-Aminocephalosporanic acid) موضح بالشكل (1) [6, 7]، وتصنف من ضمن زمرة البيتا لاكتام (β -Lactam) من المضادات الحيوية (Antibiotics) بسبب احتواء بنيتها على حلقتين ثنائيتين إحداهما حلقة بيتا لاكتام رباعية والأخرى حلقة ثنائي هيدروثيازين (Dihydrothiazine) سداسية [8-10].



الشكل (1) مركب 7-أمينو حمض السيفالوسبورين

تُقسم السيفالوسبورينات إلى خمس أجيال تبعًا لفعاليتها تجاه الجراثيم، ويعد مركب السيفترياكسون (Ceftriaxone) من مركبات الجيل الثالث، الشكل (2) [6، 7، 10]، وهو:

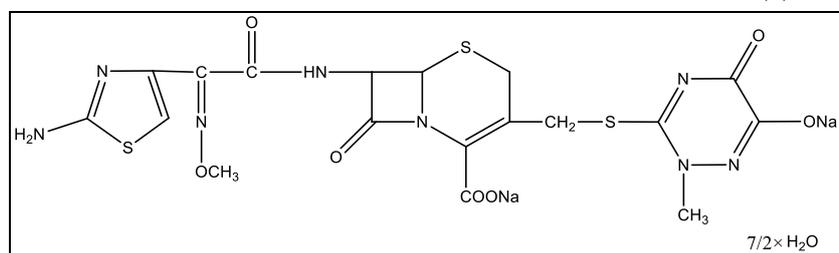
(6R,7R)-7-[2-(2-Amino-4-thiazolyl) glyoxylamido]-8-oxo-3-[[[1,2,5,6-tetrahydro-2-methyl-5,6-dioxo-as-triazin-3-yl)thio]methyl]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]-oct-2-ene-2-carboxylic acid[1]



الشكل (2) مركب السيفترياكسون

يُستخدم السيفترياكسون في الصناعة الدوائية بشكل ملح صوديومي يعرف باسم سيفترياكسون الصوديوم (Ceftriaxone Sodium)، ويتميز بانحلاليته الجيدة في الماء

الشكل (3) [2، 3].



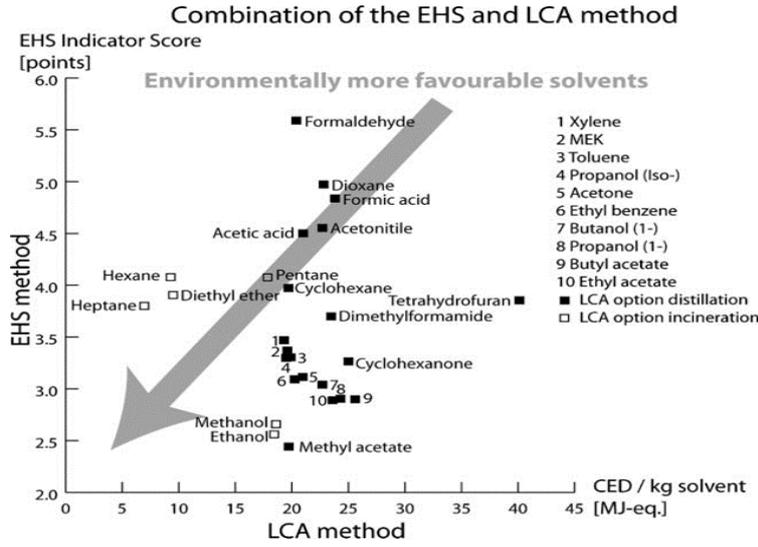
الشكل (3) مركب سيفترياكسون الصوديوم المائي

تعتمد الطريقة التحليلية المذكورة في دساتير الأدوية الأمريكي بإصدار عام 2018 [1]، والبريطاني بإصدار عام 2015 [2]، والأوروبي بإصدار عام 2016 [3]، والياباني بإصدار عام 2016 [4]، على تقانة الكروماتوغرافيا السائلة في تعيين تركيز كل من المادة الأولية الفعالة (Raw Material) والمادة الفعالة ضمن المستحضر (Active Pharmaceutical Ingredient (API)).

تتشارك الدساتير المذكورة باستخدام الطريقة الآتية:

- جهاز كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء بالطور العكوس (RP-HPLC) مزود بمكشاف UV عند طول الموجة 254 nm.

- عمود تحليل كروماتوغرافي من النوع C18 ($5 \mu\text{m} \times 4.6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$).
- الطور المتحرك يحضر بالطريقة الآتية:
 - يؤزن 2 g من رباعي ديكيل بروم الأمونيوم (Tetradecyl ammonium bromide) مع 2 g من رباعي هبتيل بروم الأمونيوم (Tetraheptyl ammonium bromide) وتُحل في حجم 440 mL ماء مقطر ثم يضاف حجم 55 mL من وقاء فوسفاتي (Phosphate buffer solution) مضبوط عند درجة الحموضة $\text{pH}=7$ و 5 mL من وقاء السترات (Citrate buffer solution) مضبوط عند درجة الحموضة $\text{pH}=5$ ثم يضاف حجم 500mL من الأسيتونتريل (Acetonitrile).
- حجم الحقنة 20 μL ومعدل التدفق 1.5 mL/min.
- تُحضر كل من العينة والعياري بتركيز 0.3 mg/mL وتُحل في الطور المتحرك. تعرف الكيمياء الخضراء بأنها تقليل استخدام المواد الخطرة أو التخلص من استخدامها في الصناعة الكيميائية، وهذا يشمل المواد الأولية الداخلة في الصناعة والكواشف (Reagents) والمذيبات والمنتجات الثانوية، وقد ظهر مصطلح الكيمياء التحليلية الخضراء ضمن معايير مشابهة، ومن أهمها المذيبات الخضراء [11، 12]. تصنف المذيبات الخضراء وفق طريقتين أساسيتين في التقييم هما: طريقة تقييم دورة الحياة (Life-Cycle Assessment (LCA)) وطريقة تقييم السلامة والصحة والبيئة (Environmental, health and safety (EHS)) [13-15].



الشكل (4) تصنيف المذيبات الخضراء بتقاطع طريقي EHS, LCA [14]

يمثل الشكل تقاطع طريقي EHS و LCA، حيث يدل المحور X على تزايد كمية الطاقة اللازمة للتخلص من كيلوغرام واحد من المذيبات المستخدمة حسب طريقة LCA، سواء عن طريق إعادة التدوير بالتقطير أو عن طريق الحرق. ويدل المحور Y على تزايد القيمة بين 0 و 9 لكل مادة كيميائية حسب طريقة EHS وتشمل تسعة عوامل تقييم ضمن ثلاث فئات، الفئة الأولى هي السلامة؛ وتشمل ثلاثة عوامل تقييم هي: التسرب والاشتعال، أو الانفجار والتفاعلية، أو التفكك، الفئة الثانية هي الصحة؛ وتشمل ثلاثة عوامل تقييم هي: السمية الحادة والسمية التراكمية والتهيج، الفئة الثالثة هي البيئة؛ وتشمل ثلاثة عوامل تقييم هي: ثبات المذيب وخطورة تلويثه لكل من الماء والهواء [14].

مواد البحث وطرائقه

1- المواد المستخدمة:

استُخدمت مادة أولية مع شهادة تحليل من سيفترياكسون الصوديوم من معمل الديماس للصناعات الدوائية، وتم اعتبارها عياري مخبري (Working Standard) لتحضير محاليل السلسلة العيارية جميعها، تركيزها 93.4% ومحتوى الرطوبة 9%. والمحل المستخدم هو الكحول الإيزوبروبيلي عالي النقاوة من شركة Merck ومن الصنف (HPLC – grade) كما أن المواد الكيميائية المستخدمة من مصدر أوروبي وبنقاوة عالية (HPLC – grade) أو ما يعادلها.

المواد الكيميائية المستخدمة لتحضير الطور المتحرك موضحة في الجدول الآتي:

الجدول (1) المواد الكيميائية المستخدمة

اسم المادة	CAS number ⁷	النقاوة	الشركة المصنعة
خلات الصوديوم ثلاثية الماء (Sodium Acetate trihydrate)	[6131-90-4]	HPLC-grade	Merck
حمض الخل الثلجي (Glacial Acetic acid)	[64-19-7]	Puriss grade	Merck
كحول إيزوبروبيلي (2-Propanol)	[67-63-0]	HPLC-grade	Merck

العينات المدروسة من إنتاج شركات دوائية سورية موضحة بالجدول (2).

الجدول(2) المستحضرات المصنعة في سوريا والداخلية في الدراسة

اسم المستحضر	التركيز من سيفترياكسون لكل فيال mg	الشركة المصنعة
سيفاكسون	1000	أوبري (Oubari)
هياسيف	500	ابن حيان (Ibn Hayyan)

⁷ رقم سجل دائرة الخدمات التابعة لمجلة المستخلصات الكيميائية

2- الأجهزة المستخدمة:

- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء الياباني الصنع من إنتاج شركة Shimadzu ويتألف من الوحدات الآتية:

- وحدة التحكم من الطراز CBM-20Alite.
- المضخة من الطراز Binary gradient LC-20AT.
- المكشاف من الطراز SPD-20A.
- وحدة الفرن والحاقن اليدوي من الطراز CTO-20A.

تم توصيل وحدات الجهاز مع حاسب يحوي برنامج تشغيل من الشركة المصنعة نفسها بإصدار مرخص بنسخة LCsolution Version 1.21 SP1.

- العمود الكروماتوغرافي C18 الذي يعرف وفق دستور الأدوية الأمريكي بالعمود L1 من تصنيع شركة Merck الألمانية:

Purospher STAR RP-18 endcapped Hibar RT (25 cm× 4.6 mm × 5 µm)

- ميزان إلكتروني حساس وبدقة 0.1 mg من إنتاج شركة Precisa السويسرية موديل (Precisa 205 A SCS).

- جهاز قياس الحموضة (pH Meter) من إنتاج شركة WTW الألمانية موديل (Inolab pH 7310P).

3- اختيار الطور المتحرك:

تم اختيار طور متحرك يتألف من (وقاء 93%: كحول إيزوبروبيلي 7%)، ويتألف الوقاء من خلاص الصوديوم ثلاثية الماء بتركيز 5.1 g/L / حمض الخل الثلجي لضبط الـ pH عند الدرجة 6.

يتميز هذا الطور المتحرك عن الطرائق الدستورية في الدساتير الأربعة بأنه يستخدم مكونات أقل كلفة حسب الأسعار من موقع شركة Sigma Aldrich، كما يستخدم مواداً كيميائية خضراء كالكحول الإيزوبروبيلي الذي يعد من المذيبات الخضراء مقارنة

بالأسيتونتريل [15-17]، واستخدام وقاء من خلات الصوديوم مع حمض الخل الثلجي المستخدم أيضًا في الطرائق التحليلية الخضراء [18].

4- طريقة العمل:

1- الشروط الكروماتوغرافية المطبقة:

- العمود المستخدم هو C18 ويعرف في دستور الأدوية الأمريكي بالعمود L1 والأبعاد المستخدمة ($25\text{ cm} \times 4.6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$).
- يتألف الطور المتحرك من (وقاء 93% : كحول إيزوبروبيلي 7%).
- يحضر الوقاء بالطريقة الآتية: يوزن 5.1 g من خلات الصوديوم ثلاثية الماء، ويحل في حجم 900 mL من الماء المقطر، ثم تضبط درجة الحموضة عند $\text{pH} = 6$ باستخدام حمض الخل الثلجي، ثم يكمل الحجم إلى 1000 mL.
- سرعة تدفق الطور المتحرك هو 1.2 mL/min.
- المكشاف المستخدم هو مكشاف الأشعة فوق البنفسجية وطول الموجة $\lambda = 254\text{ nm}$.
- حجم خلية الحقن 20 μL .
- زمن التحليل الكلي 5 min.

2- تحضير محاليل السلسلة العيارية:

لتحضير محاليل السلسلة العيارية وُزن من العياري وزنة تحوي ما يعادل 51.5 mg من سيفترياكسون الصوديوم ويعادل 49.53 mg من السيفترياكسون الأساس، وأذيتت بكمية مناسبة من الماء المقطر، ثم نقل المحلول كميًا إلى دورق حجمي سعة 250 mL، وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى إشارة التدرج، ثم رَشَح المحلول بواسطة مرشحة قطر مساماتها 0.45 μm يمثل المحلول الناتج محلول الأم. حَصَرَت محاليل السلسلة العيارية ابتداءً من محلول الأم، وذلك بإجراء التمديد المناسب له بالماء المقطر، كما هو موضح في الجدول (3).

الجدول (3) تراكيز محاليل السلسلة العيارية المحضرة

المحلول العياري	تركيز المحلول العياري (mg/ml)
المحلول العياري 1	7.925
المحلول العياري 2	29.717
المحلول العياري 3	59.434
المحلول العياري 4	79.245
المحلول العياري 5	99.056
المحلول العياري 6	138.679
المحلول العياري 7	178.301

3- تحضير محاليل العينات:

وُزن محتوى كل فيال (Vial) من الشركات المدروسة، ثم وُزن منها 0.35 g وأذيب بكمية مناسبة من الماء المقطر، ثم نقل المحلول كميًا إلى دورق حجمي سعة 100 mL، وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى إشارة التدرج، ثم رشح المحلول بواسطة مرشحة قطر مساماتها 0.45 nm، ونقل حجم 7 mL إلى دورق حجمي 20 mL، وأكمل الحجم حتى خط إشارة التدرج بالماء المقطر للحصول على تركيز مفترض 99 mg/mL.

النتائج والمناقشة

تتميز الطريقة التحليلية المطورة بما يلي:

أولاً: انخفاض كلفتها مقارنة بالطريقة المعتمدة في دساتير الأدوية؛ إذ إن كلفة تحضير 1 L من الطور المتحرك في الطريقة المتبعة في دساتير الأدوية يبلغ نحو 66 يورو على اعتبار أن المواد المستخدمة كلها ضمن نقاوة HPLC-Grade أو أعلى نقاوة متوفرة في شركة Sigma Aldrich، في حين تبلغ كلفة تحضير 1 L من الطور المتحرك في الطريقة المطورة حوالي 5.5 يورو ضمن قواعد التسعير نفسها، علمًا أن الطور المتحرك في الطريقة الدستورية يستخدم أيضًا في تحضير العينات مقارنة باستخدام الماء المقطر في الطريقة المطورة مما يزيد الاستهلاك بنسبة 20% كحد أدنى.

ثانيًا: لا آثار سلبية على البيئة لمواد ومحلات الطريقة المطورة؛ لأنها مواد صديقة للبيئة من مواد الكيمياء الخضراء بالمقارنة مع المواد والمحلات المستخدمة في الطرائق الدستورية وأقل بنسبة 84%، واعتماد الماء المقطر بوصفه محلول تمديد مقارنة باستخدام الطور المتحرك في الطرائق الدستورية، ومن ثم تخفيض إضافي في نسبة المذيبات وكلفة التخلص منها.

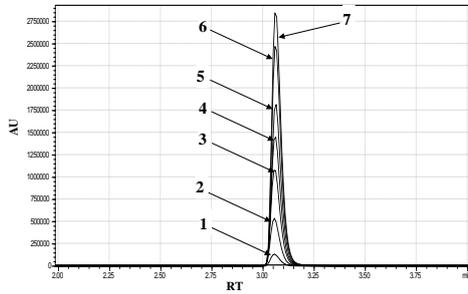
ثالثًا: تعتمد هذه الطريقة كما الطريقة الدستورية على العمود C18، وهو من الأعمدة الأساسية والمتوفرة في جميع مخابر الرقابة الدوائية.

رابعًا: ظهرت قمة المادة المحللة عند زمن استبقاء 3 min تقريبًا مع معامل تنبيل بحدود 1.6، وهو مقبول حسب دستور الأدوية الأمريكي، كما أن زمن التحليل قليل نسبيًا (5 min) ومن ثم يؤمن السرعة في تحليل مختلف العينات من مستحضرات أو مواد أولية.

خامسًا: تُوفّر الطريقة المطورة حدود كشف منخفضة؛ الأمر الذي يسهم في التحقق من مصدوقية عمليات التنظيف (Cleaning Validation) ضمن عمليات التصنيع.

سادسًا: يمكن استخدام الطريقة المطورة في تحليل مستحضرات السيفترياكسون المصنعة (الفيالات)؛ إذ إن المنتج لا يحوي على أي سواغات [19]، ومن ثم يكفي تحديد وزن محتوى الفيال وتحديد نقاوة المادة الموجودة بداخلها لمقارنة محتوى الفيال مع المحتوى المعنون.

لإثبات خطية التحليل ضمن مجال القياس لمحاليل السلسلة العيارية الموجودة في الجدول، حلّت هذه المحاليل ثلاث مرات كحد أدنى، ثم رُسمت الكروماتوغرامات لها كما هو موضح في الشكل (5).

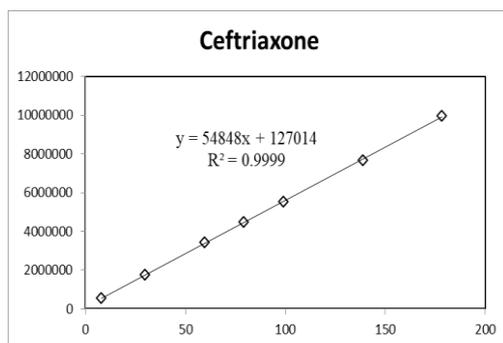


الشكل (5) كروماتوغرامات السلسلة العيارية

من كروماتوغرامات محاليل السلسلة العيارية السابقة، حُسبت مساحات القمم وانحراف قيمة التركيز النظري للمادة العيارية للمادة الفعالة السيفترياكسون الأساس عن المحسوب بيانياً، والنسبة المئوية للانحراف ضمن الجدول (4)، ثم رسم المنحني العياري لتركيز محاليل السلسلة العيارية مقابل مساحة قممها الشكل (6) وكانت النتائج مقبولة حسب دستور الأدوية الأمريكي [20].

الجدول (4) نتائج قياس عينات السلسلة العيارية

العياري	التركيز المحضر µg/ml	المساحة	التركيز المحسوب µg/ml	الانحراف %	المساحة المحسوبة	y-(ax+b)
1	7.92	554872.3	7.81	1.5	561656.6	-6784.3
2	29.72	1749216.7	29.58	0.5	1756923.7	-7707.0
3	59.43	3424489.3	60.13	-1.2	3386833.4	37655.9
4	79.24	4493005.0	79.61	-0.5	4473439.9	19565.1
5	99.06	5539583.3	98.62	0.4	5560046.4	-20463.1
6	138.68	7670369.3	137.55	0.8	7733259.3	-62890.0
7	178.30	9947089.7	179.06	-0.4	9906472.3	40617.4



الشكل (6) المنحني العياري للسلسلة العيارية

لتقييم التكرارية تم إعادة التحليل 6 مرات عند التركيز $99.06 \mu\text{g/mL}$ ، وحساب التركيز الموافق لكل قيمة وفق معادلة منحنى المعايرة من اختبار الخطية، ثم حساب الاستردادية% (Recovery%)، وحساب الانحراف المعياري (Standard Deviation)، والانحراف المعياري النسبي المئوي (Relative Standard Deviation)، وكانت النتائج مقبولة حسب دستور الأدوية الأمريكي الجدول (5).

تحسب الاستردادية من القانون:

$$\text{الاستردادية\%} = (\text{التركيز المحسوب} \setminus \text{التركيز المحضر}) \times 100$$

الجدول (5) نتائج اختبار التكرارية مع تقييم الانحراف

Y = 54848X + 127014			معادلة المنحنى العياري	
الاستردادية%	التركيز المحضر $\mu\text{g/mL}$	التركيز المحسوب $\mu\text{g/mL}$	المساحة	رقم القياس
99.34	99.06	98.4	5524160	1
98.95	99.06	98.01	5502437	2
100.69	99.06	99.73	5596978	3
100.86	99.06	99.90	5606259	4
99.95	99.06	99.00	5556763	5
100.16	99.06	99.21	5568450	6
99.99	المتوسط الحسابي Average			
0.74	الانحراف المعياري SD			
0.74	الانحراف المعياري النسبي المئوي RSD%			

لم يحسب اختبار الصحة وذلك لعدم وجود سواغات أو إضافات تدخل ضمن عملية تصنيع فيالات السيفترياكسون المحضرة.

حُسب حد الكشف الكمي ((Quantitation Limit (QL))، وحد الكشف الكيفي ((Detection Limit (DL)) من اختبار الخطية ومعادلة المنحنى العياري [21-23]، من المعادلات الآتية:

$$DL; QL = \frac{F \times SD}{b}$$

حيث:

F: ثابت قيمته تساوي 3.3 لحد الكشف الكيفي وتساوي 10 لحد الكشف الكمي.

b: ميل المنحني العياري.

SD: الانحراف المعياري المتبقي لمعادلة المنحني العياري ويحسب من المعادلة:

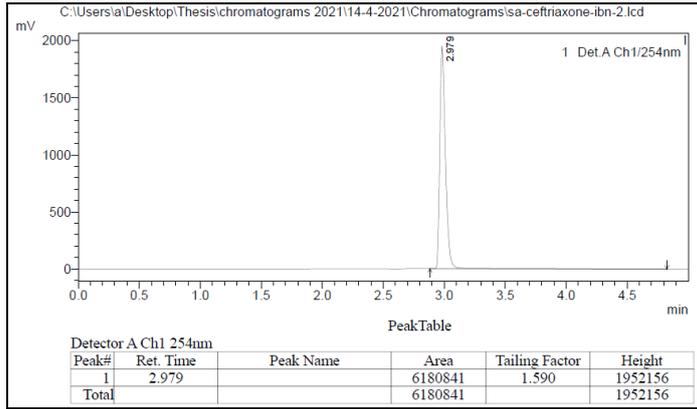
$$SD = \sqrt{\frac{\sum(y - (ax + b))^2}{n - 2}}$$

حيث:

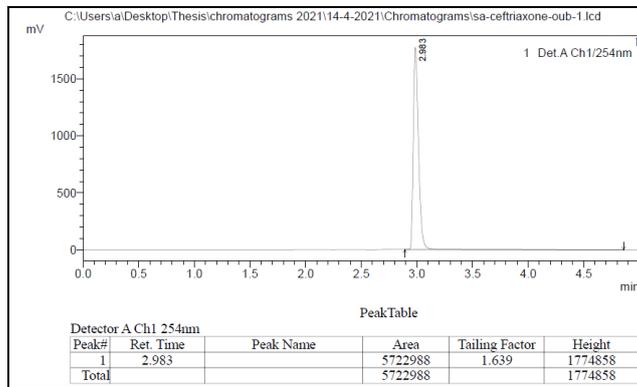
n: هو عدد نقاط المنحني العياري.

وكانت النتائج كالتالي: حد الكشف الكمي يساوي 7.3 µg/mL ، وحد الكشف الكيفي يساوي 2.4 µg/mL للسيفترياكسون الأساس.

طبقت الطريقة من أجل تعيين السيفترياكسون في المستحضرات الدوائية لتقدير مدى صلاحيتها من أجل الرقابة الدوائية؛ إذ اختُبرت على عينات مختلفة من المستحضرات المدروسة الموضحة في الجدول (1)، من مستحضرات دوائية سورية الصنع (فيالات)، وبعد إجراء التحاليل لها تم الحصول على الكروماتوغرامات الموضحة في الأشكال (7،8)، مع جداول تبين بعض المقادير المحسوبة من هذه الكروماتوغرامات.



الشكل (7) الكروماتوغرام الناتج من قياس عينة سيفترياكسون لشركة ابن حيان



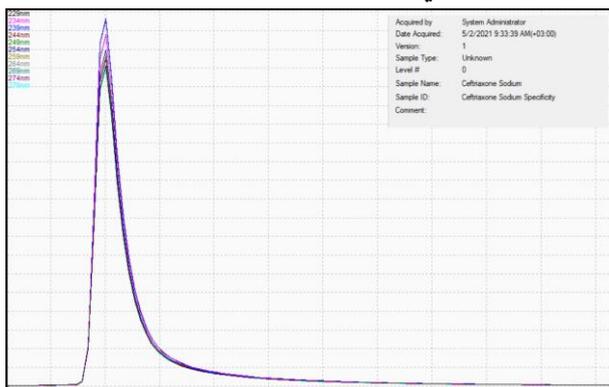
الشكل (8) الكروماتوغرام الناتج من قياس عينة سيفترياكسون لشركة أوبري

بعد حساب تركيز السيفترياكسون الأساس في العينات المحضرة ونسبته الى وزن محتوى الفيالات ثم إلى التركيز المصرح عنه كانت النتائج الموضحة في الجدول (7).

الجدول (6) نتائج تحليل عينات السيفترياكسون للشركات المحلية

النسبة المئوية من النسبة المعنونة	وزن محتوى الغيال (g)	السيفترياكسون ضمن العينة (g)	وسطي المساحة	وزن العينة (g)	العينة
104.16	0.6232	0.0318	6238777	0.0381	هياسيف 500
100.04	1.19	0.0292	5723618	0.0346	سيفاكسون 1000

كما تم التحقق من انتقائية الطريقة بتحليل عينات المستحضرات ضمن الشروط نفسها على جهاز مختلف مزود بمكشاف المصفوفة الضوئية (PDA) Photo Diode Array من طراز Shimadzu Prominace I LC-2030؛ إذ يقوم هذا المكشاف بإجراء مسح طيفي مستمر؛ الأمر الذي يسمح بقياس تجانس قمم المركبات المعزولة، ومن ثم نقاوتها وذلك في أثناء إجراء التحاليل عامة ولا سيما في الصناعة الصيدلانية [24، 25]. وكانت النتائج مقبولة ولا يوجد أي تداخل، الشكل (9).



الشكل (9) التأكد من انتقائية الطريقة باستخدام مكشاف المصفوفة الضوئية PDA

- من النتائج العملية تم التوصل الى الاستنتاجات التالية:
- 1- تعدّ هذه الطريقة التحليلية منخفضة التكلفة من حيث زمن التحليل القصير نسبياً، وانخفاض نسب المواد الداخلة في تحضير الطور المتحرك من مواد كيميائية ومذيب، إضافة إلى انخفاض الأثر البيئي السلبى مقارنة بالطرائق الدستورية، واعتمد الماء المقطر بوصفه مذيباً، الأمر الذي يسهم في تخفيض كلفة التحليل.
 - 2- عمود الفصل الكروماتوغرافي المستخدم في الطريقة المطورة هو العمود C18، وهو العمود نفسه المستخدم في الطريقة الدستورية، وهو شائع الاستخدام ومتوفر في جميع مخابر الرقابة الدوائية والمخابر المختصة بالتحاليل الدوائية.
 - 3- اختيرت درجة حموضة الوقاء في الطور المتحرك عند درجة pH=6 بما يتوافق مع درجة pH المحاليل المائية للمستحضر وبما يضمن انحلالية كاملة للمادة المدروسة [26]، بالإضافة إلى استهلاك الحد الأدنى من الأملاح بما يضمن تخفيض الكلفة والنتيجة الأفضل.
 - 4- اختير المذيب (الكحول الإيزوبروبيلي) ضمن قواعد الكيمياء الخضراء مع استهلاك أقل نسبة منه لتخفيض الكلفة.
 - 5- اختير طول موجة المكشاف عند 254 nm بشكل مشابه للطرائق الدستورية.
 - 6- اختير الماء المقطر بوصفه محلاً للعينات، لانخفاض كلفته، وقدرته العالية على حل المادة المدروسة، بالإضافة الى توفير ثبات المحاليل المحضرة لثلاثة أيام في درجة حرارة المخبر وعشرة أيام مبردة عند درجة الحرارة 4 °C [26].
 - 7- اختيرت سرعة تدفق الطور المتحرك بما يضمن أقصر زمن تحليل مع أفضل نتيجة من حيث معامل التذليل، وذلك عند القيمة 1.2 mL/min.
 - 8- اختبارات التحقق من المصدوقية بينت أن الطريقة خطية ضمن كامل مجال الدراسة (8 - 178) µg/mL، وبمعامل ارتباط بقيمة R2 = 0.9999، وضمن

الحدود المقبولة لاختبار التكرارية، وانحراف معياري نسبي مؤوي 0.74 لسته تحاليل عند التركيز $99.06 \mu\text{g/mL}$ ، وكذلك بانتقائية عالية ضمن شروط العمل.

9- حدي الكشف (QL) و (DL) المنخفضين نسبياً، يسمحان باستثمار هذه الطريقة ضمن عمليات التحقق من مصدوقية عمليات التنظيف (Cleaning Validation) ضمن عمليات التصنيع.

الخلاصة:

تمثل الطريقة المطورة بديلاً جيداً للطرائق الدستورية والطرائق الأخرى، من حيث استخدامها للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء للحصول على نتائج دقيقة وموثوقة، فضلاً عن اختيار شروط تحليل كروماتوغرافي منخفضة الكلفة وأقرب إلى قواعد الكيمياء الخضراء من حيث مكونات الطور المتحرك المتوفرة، وزمن التحليل القصير نسبياً، واختيار الماء المقطر بوصفه محلول تمديد لتحضير العينات، إضافة إلى استهلاك حد أدنى من المذيب (الكحول الإيزوبروبيلي).

يمكن استثمار هذه الطريقة في مخابر الرقابة الدوائية المختلفة ضمن عمليات تحليل المادة الأولية، والمستحضرات، ولتقييم عمليات التنظيف.

المراجع:

1. Schmiedel, D.A.-V.D.R., *USP 41 - NF 36 The United States Pharmacopoeia and National Formulary 2018: Main Edition Plus Supplements 1 and 2*. 2017: Deutscher Apotheker Verlag.
2. British Pharmacopoeia, C., et al., *British pharmacopoeia 2015 : the British Pharmacopoeia Commission has caused this British Pharmacopoeia 2015 to be prepared under regulation 317(1) of the Human Medicines Regulations 2012 and, in accordance with Regulation 317(4), the Ministers have arranged for it to be published*. 2014.
3. Convention on the Elaboration of a European, P., *European Pharmacopoeia*. 2016, Strasbourg: Council of Europe.
4. Japan and R. Kosei, *The Japanese pharmacopoeia, seventeenth edition : official from April 1, 2016*. 2016.
5. British Medical, A., B. Royal Pharmaceutical Society of Great, and C. Joint Formulary, *BNF 76*. 2018.
6. Whalen, K., *Lir: Pharmacology 7e (Int Ed) PB*. 2018: Wolters Kluwer Law & Business.
7. Bennett, J.E., R. Dolin, and M.J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 2020.
8. Goering, R., et al., *Mims' Medical Microbiology E-Book*. 2018.
9. Patrick, G.L. and P. Oxford University, *An introduction to medicinal chemistry*. 2013, Oxford: Oxford University Press.
10. Whalen, K., *Lippincott® Illustrated Reviews: Pharmacology*. 2018: Wolters kluwer india Pvt Ltd.
11. De La Guardia, M. and S. Armenta, *Green analytical chemistry: theory and practice*. 2010: Elsevier.

- 12 . Doble, M., K. Rollins, and A. Kumar, *Green chemistry and engineering*. 2010: Academic Press.
- 13 . Garrigues, S., S. Armenta, and M. de la Guardia, *Challenges in green analytical chemistry*. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, 2011: p. 1-9.
- 14 . Capello, C., U. Fischer, and K. Hungerbuhler, *What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents*. GREEN CHEMISTRY, 2007. 9(9): p. 927-934.
- 15 . Guardia, M. and S. Armenta, *Green solvents for analytical separation and analyses*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, RA Meyers (ed.) John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- 16 . Tobiszewski, M. and J. Namieśnik, *Greener organic solvents in analytical chemistry*. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2017. 5: p. 1-4.
- 17 . Byrne, F.P., et al., *Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides*. Sustainable chemical processes, 2016. 4(1): p. 1-24.
- 18 . de la Guardia, M. and S. Garrigues, *Handbook of green analytical chemistry*. 2012: Wiley Online Library.
- 19 . Roche, *Rocephin (Ceftriaxone Sodium) for injection*. 2009, Roche Nutley, NJ.
- 20 . Shabir, G.A., *Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry*. Journal of validation technology, 2005. 10: p. 314-325.
- 21 . Ermer, J. and P.W. Nethercote, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. 2014: Wiley.

- 22 . Miller, J.N. and J. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th Edition*. 2010.
- 23 . Comité de Direccão, I. *ICH Topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology*. in *International Conference on Harmonization*. 1994.
- 24 . Corradini, D., *Handbook of HPLC*. 2016: CRC Press.
- 25 . Chan, H. and G. Carr, *Evaluation of a photodiode array detector for the verification of peak homogeneity in high-performance liquid chromatography*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1990. 8(3): p. 271-277.
- 26 . Owens, H.M. and A.K. Dash, *Ceftriaxone Sodium: comprehensive profile*. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, 2003. 30: p. 21-57.