العدد 18A-1 ايلول ٢٠٢٥ المجلة العراقية للبحوث الانسانية والاجتماعية والعلمية
No. 18A-1 – Sept 2025 Iraqi Journal of Humanitarian, Social and Scientific Research
Print ISSN 2710-0952 Electronic ISSN2790-1254

تطبيق تقنية الكروماتوغرافيا (HPLC) السائلة عالية الأداء في تحليل المركبات الدوائية المعقدة

بحث مقدم الى مديرية تربية واسط / شعبة البحوث والدراسات التربوية

م.م الاء زاير راضي
التخصص /كمياء تحليلية

الملخص

تعتبر الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) من أهم التقنيات التحليلية المستخدمة في دراسة المركبات الكيميائية، وبالأخص في المجال الدوائي. تهدف هذه الدراسة إلى استعراض تطبيق HPLC في تحليل المركبات الدوائية المعقدة، بما في ذلك الأدوية متعددة المكونات، والمستحضرات التي تحتوي على مشتقات كيميائية متشابهة، إضافة إلى الكشف عن الشوائب والمكونات غير النشطة وتعتمد الدراسة على شرح مفصل لمبدأ HPLC ، حيث يتم فصل المركبات الكيميائية داخل العمود الكروماتوغرافي باستخدام طور ثابت وطور متحرك، مما يسمح بتحديد هوية المركبات وكميتها بدقة عالية. كما توضح الدراسة المعدات الأساسية المستخدمة، بما في ذلك الأعمدة الكروماتوغرافية، المضخات عالية الضغط، والكواشف مثل UV-Vis و Mass Spectrometry، إلى جانب طرق تحضير العينات وتحليل البيانات وتشير النتائج المتوقعة إلى قدرة HPLC على فصل المركبات المعقدة بدقة، وتقديم بيانات كمية ونوعية موثوقة، مما يسهم في تحليل فعالية الأدوية، مراقبة نقائها، والكشف عن أي شوائب محتملة .كما تسلط الدراسة الضوء على التحديات المرتبطة باستخدام HPLC ، بما في ذلك الحاجة لاختيار الظروف التشغيلية المناسبة، تحضير العينات بعناية، وتكلفة المعدات والصيانة.

تؤكد الدراسة على الدور الحيوي لتقنية HPLC في ضمان جودة وسلامة المستحضرات الدوائية، ودعم تطوير الأدوية الحديثة من خلال تقديم تحليلات دقيقة وشاملة. وبناءً على المراجعة والتحليل، يمكن الاستنتاج أن HPLC تقنية لا غنى عنها في المختبرات التحليلية والصناعية، حيث توفر بيانات دقيقة تساعد في اتخاذ القرارات العلمية والصيدلانية الصحيحة.

Abstract

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) is one of the most important analytical techniques used for the study of chemical compounds, particularly in the pharmaceutical field. This study aims to explore the application of HPLC in the analysis of complex pharmaceutical compounds, including multi-component drugs, formulations containing chemically similar derivatives, and the detection of impurities or inactive components.

The study provides a detailed explanation of the HPLC principle, where chemical compounds are separated within a chromatographic column using a stationary phase and a mobile phase, allowing for accurate identification and quantification of the compounds. It also highlights the essential equipment, including chromatographic columns, high-pressure pumps, and detectors such as UV-Vis and Mass Spectrometry (MS), along with sample preparation methods and data analysis procedures.

The expected outcomes indicate that HPLC is capable of accurately separating complex compounds and providing reliable qualitative and quantitative data. This contributes to assessing drug efficacy, monitoring purity, and detecting potential impurities. The study also addresses challenges associated with HPLC usage, including the need for careful selection of operational conditions, meticulous sample preparation, and high equipment and maintenance costs.The study emphasizes the critical role of HPLC in ensuring the quality and safety of pharmaceutical formulations and supporting the development of new drugs through precise and comprehensive analysis. Based on the review and analysis, it can be concluded that HPLC is an indispensable technique in both research and industrial laboratories, providing accurate data that support informed scientific and pharmaceutical decisions

المقدمة

تعد صناعة الأدوية وتحليلها من المجالات الحيوية التي تلعب دورًا محوريًا في صحة الإنسان وسلامته. فالمستحضرات الدوائية غالبًا ما تحتوي على مزيج من المركبات الفعالة والشوائب والمكونات المساعدة، مما يجعل عملية التحليل الكيميائي والتأكد من جودتها ودقتها أمرًا بالغ الأهمية. ومن بين التقنيات التحليلية الحديثة، برزت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) كأداة قوية وموثوقة لفصل وتحديد المركبات الكيميائية بكفاءة ودقة عاليتين.

تعتبر HPLC تطويرًا للتقنيات التقليدية للكروماتوغرافيا السائلة، حيث تستخدم ضغطًا عاليًا لدفع المذيب عبر عمود يحتوي على مادة ثابتة، مما يسمح بفصل المركبات على أساس خصائصها الكيميائية مثل القطبية أو الحجم الجزيئي. ومن أبرز مميزات HPLC قدرتها على التعامل مع المركبات الدوائية المعقدة، سواء كانت أدوية مركبة تحتوي على عدة مكونات نشطة، أو مستحضرات تحتوي على مشتقات كيميائية متشابهة يصعب فصلها بالطرق التقليدية.

تستخدم HPLC في مجالات متعددة من التحليل الدوائي، بما في ذلك تحديد تركيز المكونات الفعالة، الكشف عن الشوائب، مراقبة الجودة، ودراسة الاستقرار الدوائي .كما يمكن دمجها مع تقنيات تحليلية أخرى مثل مطيافية الكتلة (Mass Spectrometry, MS) للحصول على تحليل أدق وأكثر شمولية، مما يعزز من قدرتها على تقديم بيانات كمية ونوعية دقيقة للمركبات المعقدة.

إن أهمية HPLC لا تقتصر على فصل المركبات وتحليلها فقط، بل تمتد أيضًا إلى دعم عمليات تطوير الأدوية الجديدة، حيث تتيح للباحثين تقييم فعالية وسلامة المستحضرات قبل طرحها في الأسواق. وبفضل حساسيتها العالية ودقتها المتميزة، أصبحت HPLC معيارًا صناعيًا في مختبرات التحليل الدوائي والبحث العلمي، وتلعب دورًا أساسيًا في ضمان الجودة الدوائية وحماية صحة المستهلكين.

يهدف هذا البحث إلى دراسة تطبيقات HPLC في تحليل المركبات الدوائية المعقده ومبدا العمل

الدراسات السابقة

تُعد تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) من الأدوات التحليلية الأساسية في مجال التحليل الدوائي، حيث تُستخدم لفصل وتحديد وكمية المركبات الكيميائية في المستحضرات الدوائية. وقد شهدت

السنوات الأخيرة العديد من الدراسات التي تسلط الضوء على تطبيقات HPLC في تحليل المركبات الدوائية المعقدة، مثل الأدوية متعددة المكونات والشوائب والمنتجات التحليلية.

1. مراجعة شاملة لتطبيقات HPLC في التحليل الدوائي

أجرت دراسة نشرت في مجلة *Biomed Pharma Journal* مراجعة شاملة لتطبيقات HPLC في التحليل الدوائي، حيث تم التركيز على المبادئ الأساسية للتقنية وتطبيقاتها في فصل وتحديد المركبات الفعالة والشوائب في الأدوية. أشارت الدراسة إلى فعالية HPLC في تقديم نتائج دقيقة وموثوقة، مما يجعلها أداة أساسية في مراقبة الجودة وضمان سلامة الأدوية.(biomedpharmajournal.org)

2. التحديات والفرص في استخدام HPLC في التحليل الدوائي

نشر مقال في *Chromatography Online* مقالًا يناقش الجوانب الإيجابية والسلبية لاستخدام HPLC في التحليل الدوائي. أشار المقال إلى أن HPLC ضرورية لتحليل الأدوية، حيث توفر تحديدًا دقيقًا للمكونات الفعالة والشوائب بفضل قدرتها العالية على الفصل والحساسية. ومع ذلك، تم الإشارة إلى بعض التحديات مثل تعقيد التقنية، وارتفاع تكاليف المعدات، وتحضير العينات الذي يتطلب وقتًا وجهدًا، مما قد يعيق اعتمادها على نطاق واسع.(chromatographyonline.com)

3. تطبيق HPLC في تحليل الأدوية المعقدة

أظهرت دراسة نشرت في *PubMed Central* أهمية HPLC في تحليل الأدوية المعقدة، مثل تلك التي تحتوي على عدة مكونات فعالة أو تحتوي على شوائب صعبة الفصل. تم استخدام HPLC لتأكيد هوية الأدوية وتقديم نتائج كمية، بالإضافة إلى مراقبة تقدم العلاج في المرضى. كما تم استخدام التقنية لفهم العمليات البيولوجية والمرضية في الجسم البشري من خلال تحليل الأدوية والمنتجات الاستقلابية في سوائل الجسم مثل البلازما والبول.(PMC)

4. التطورات الحديثة في HPLC وتأثيرها على التحليل الدوائي

تناولت دراسة نشرت في *American Pharmaceutical Review* التطورات الحديثة في HPLC وتأثيرها على التحليل الدوائي. تم التركيز على تحسينات مثل استخدام الأعمدة ذات الجسيمات الدقيقة، وتقنيات الفصل المتقدمة، ودمج HPLC مع تقنيات أخرى مثل مطيافية الكتلة (MS) لتحسين دقة التحليل. أشارت الدراسة إلى أن هذه التطورات قد حسنت من قدرة HPLC على التعامل مع الأدوية المعقدة وتقديم نتائج أكثر دقة وموثوقية.(americanpharmaceuticalreview.com)

5. تطبيق HPLC في مراقبة الجودة وضمان سلامة الأدوية

أفادت دراسة نشرت في *Lab Manager* بأن HPLC تُستخدم بشكل واسع في صناعة الأدوية لمراقبة الجودة وضمان سلامة الأدوية. تم استخدام HPLC لتقييم التركيبات، والتحقق من النقاء، ومراقبة التغيرات الناتجة عن التعديلات في العمليات أو أثناء التوسع في الإنتاج. كما تم استخدام التقنية لتحديد العمر الافتراضي للأدوية ومراقبة التغيرات في التركيبات بمرور الوقت.(Lab Manager)

المنهجية

تحليل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) هو تقنية تحليلية متقدمة تُستخدم لفصل، وتحليل، وقياس المركبات الكيميائية في المحاليل السائلة. تُعتبر HPLC واحدة من أكثر الطرق شيوعًا في الكيمياء التحليلية، والصيدلة، وعلوم المواد، نظرًا لدقتها وفعاليتها في الفصل.

تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) هي تقنية تحليلية تستخدم تجاذب المركب مع كل من الطور المتحرك (عادةً مذيب ممدد) و الطور الثابت (صلب مسامي مغطى بطبقة خاصة). يُستخدم مضخة لتوفير تدفق مستمر للمذيب يتم إدخال عينة منحلة فيه. بمجرد إدخال العينة المذابة، ستسير العينة ضمن

العمود الفصل الذي يحوي الطورالثابت، ويتم بعدها فصل المواد الكيميائية من ضمن خليط العينات المذابة، اعتمادًا على تفاعلها مع جزئيات غطاء الطور الثابت في عمود الفصل وبعد فصل المكونات في العمود، تمرر من خلال مجموعة من أجهزة الكشف. تُستخدم استجابة الكاشف و "زمن التثبيت" (الوقت اللازم لانتقال المركب ضمن العمود من مرحلة الحقن إلى لحظة الخروج من العمود) للتعرف على المركبات للمادة المحللة. بالإضافة إلى ذلك، يُستخدم عدد من تقنيات الكشف لتحديد نوع محدد من المركبات مثل كاشف (UV – Vis) وكشف التأثير (FLD) أو كشف التبخير بإضاءة خافتة(ELSD)

تحليل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء تقنية تحليلية متقدمة تُستخدم لفصل وتحليل المركبات في المحاليل السائلة. يُعتبر HPLC من أكثر الأساليب شيوعًا في مجالات الكيمياء التحليلية، والصيدلة، وعلوم المواد، نظرًا لدقته وسرعته في الفصل.

مبدأ العمل

تقوم تقنية HPLC على مفهوم فصل المركبات بناءً على تفاعلاتها مع الطور الثابت والطور المتحرك. في هذه الطريقة، يُستخدم عمود مملوء بمادة مسامية كطور ثابت، ويتم إدخال المحلول السائل (الطور المتحرك) تحت ضغط عالٍ باستخدام مضخة. يتم فصل المركبات بناءً على اختلافات في التلاصق والتفاعل مع الطور الثابت. عند ضخ المذيب (الطور المتحرك) مع العينة، تمر المركبات خلال العمود بسرعات مختلفة بناءً على تفاعلاتها مع الطور الثابت. المركبات التي تلتصق بالطور الثابت لفترة أطول تستغرق وقتًا أطول للخروج، مما يؤدي إلى فصلها.

١. تحضير العينة:

يتم إعداد العينة المراد تحليلها، والتي قد تتطلب تخفيفًا أو تنقية قبل التحليل.

٢. إدخال العينة:

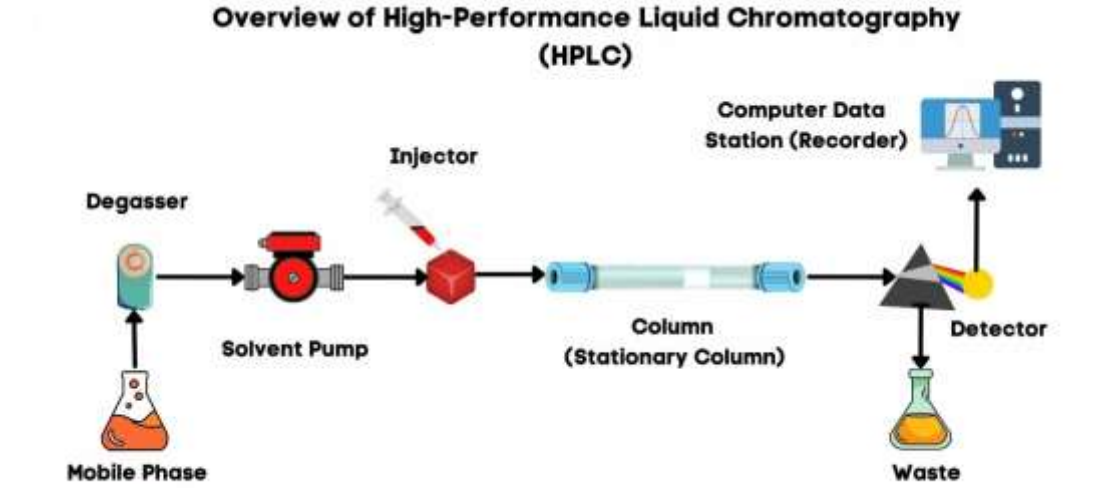
يتم إدخال العينة مع المذيب (الطور المتحرك) إلى العمود عبر مضخة ضغط عالية. هذا الضغط العالي ضروري لضمان تدفق المحلول عبر العمود.

٣. فصل المركبات:

تمر المركبات المختلفة خلال العمود بسرعات متفاوتة بناءً على خصائصها مثل التلاصق مع الطور الثابت. المركبات التي تلتصق بقوة أكبر تستغرق وقتًا أطول للخروج من العمود، بينما تمر المركبات الأقل تلاصقًا بسرعة أكبر.

٤. الكشف والتحليل:

بعد مرور المركبات عبر العمود، يتم الكشف عنها باستخدام كاشف مناسب (مثل كاشف الأشعة فوق البنفسجية أو كاشف الفلورة). تُسجل البيانات لتمثل العلاقة بين الوقت والمادة المفصولة، مما ينتج عنه منحنيات تحليلية تُستخدم لتحديد هوية وكمية المركبات.



أنواع الكواشف في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC)

تستخدم الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) أنواعًا مختلفة من الكواشف لتحليل المركبات المفصولة، ويعتمد اختيار الكاشف في HPLC على طبيعة المحللات، والحساسية المطلوبة، والتطبيق المحدد. كل كاشف له مزاياه وعيوبه، مما يجعل من الضروري اختيار الأنسب لتحقيق تحليل دقيق وموثوق.. وهنا الأنواع الرئيسية من الكواشف المستخدمة فيHPLC ، مع المبادئ والتطبيقات والمركبات المناسبة لكل منها:

1.كاشف الأشعة فوق البنفسجية(Ultraviolet Detector)(UV)

- المبدأ: يقيس امتصاص الضوء فوق البنفسجي من قبل المحللات أثناء خروجها من العمود.
- التطبيقات: يستخدم على نطاق واسع للمركبات التي تمتص الضوء فوق البنفسجي، مثل المركبات العطرية والعديد من الأدوية.
- العينات المناسبةللقياس: العينات البيئية، المواد الغذائية، المستحضرات الصيدلانية

يستخدم بشكل شائع لتحليل المركبات التي تمتص الضوء فوق البنفسجي كالفينولات، الكيتونات، الأحماض النووية، المركبات العضوية، الأدوية، والمركبات العطرية..

2.كاشف مصفوفة الثنائي(Dioed Array Detector)(DAD)

- المبدأ: مشابه لكواشف UV ولكنه يمكنه قياس الامتصاص عند أطوال موجية متعددة في نفس الوقت.
- التطبيقات: مفيد في تحديد وقياس المركبات بناءً على أطياف UV الخاصة بها.
- العينات المناسبة للقياس: العينات المعقدة مثل المستحضرات الدوائية والمستخلصات النباتية.

يستخدم لتحليل المركبات بناءً على أطياف UV الخاصة بها، مما يساعد في التعرف على المركبات المختلفة جميع المركبات التي لها امتصاصات مميزة في نطاق..UV

3.كاشف مؤشر الانكسار(Refractive Index Detector)(RID)

- المبدأ: يقيس التغيرات في مؤشر الانكسار للمرحلة المتنقلة عندما تمر المحللات عبر الكاشف.

- التطبيقات: مناسب للمركبات غير النشطة في UV.
- العينات المناسبة للقياس: العينات الغذائية، مثل العصائر والحلويات.

يستخدم للكشف عن المركبات غير النشطة في UV ، مثل السكريات المركبات غير العضوية والعضوية لسكريات، الكحوليات، وغيرها من المركبات التي لا تمتص UV.

4. كاشف الفلورة (Fluorescence Detector)

- المبدأ: يقيس الفلورنسانس المنبعثة من المحللات عندما تتعرض لطول موجي محدد من الضوء.
- التطبيقات: حساس للغاية وانتقائي؛ يستخدم في التحليل الدقيق.
- العينات المناسبة للقياس: العينات البيولوجية، الأدوية، والمستخلصات النباتية.

يستخدم للكشف عن المركبات الفلورية، ويتميز بحساسية عالية المركبات التي تكون فلورية بشكل طبيعي أو يمكن تحويلها لتصبح فلورية، مثل بعض الأدوية والجزيئات البيولوجية.

5. كاشف الموصلية (Conductivity Detector)

- المبدأ: يقيس موصلية الإلنت، التي تتغير مع وجود الأنواع الأيونية.
- التطبيقات: شائع الاستخدام في المركبات الأيونية وفي كروماتوغرافيا الأيونات.
- العينات المناسبة للقياس: المياه، المحاليل الملحية، والعينات البيئية.

يستخدم في تحليل المركبات الأيونية و الأيونات غير العضوية، الأحماض العضوية، والقواعد.

6. مطياف الكتلة (Mass Spectrometer Detector)(MS)

المبدأ: يحلل الأيونات بناءً على نسبة الكتلة إلى الشحنة بعد تأيينها.
التطبيقات: يوفر معلومات بنيوية وقياس كمي؛ حساس للغاية.
العينات المناسبة للقياس: العينات البيولوجية، الأدوية، والمخاليط الكيميائية.
يستخدم لتحليل المركبات وتحديد هياكلها، ويعتبر أداة قوية في التحليل الكيميائي و مجموعة متنوعة من المركبات العضوية وغير العضوية، خاصة تلك التي يمكن تأيينها..

7. كاشف تشتت الضوء المتبخِّر (Evaporative Light Scattering Detector)(ELSD)

المبدأ: يقيس الضوء المتناثر من الجسيمات التي يتم تشكيلها من المحللات بعد تبخر المرحلة المتنقلة.
التطبيقات: مفيد للمركبات غير الطيارة وشبه الطيارة، خاصة في تحليل الأدوية والأغذية.
العينات المناسبة للقياس: المستحضرات الغذائية، المستخلصات النباتية، والمواد الكيميائية.
يستخدم لتحليل المركبات غير الطيارة وشبه الطيارة كالدهون، البوليمرات، والمركبات العضوية غير الطيارة..

8. مطياف الكتلة مزدوج (Tandem Mass Spectrometer Detector)(MS/MS)

- المبدأ: شكل متقدم من مطياف الكتلة يسمح بتفتيت الأيونات لتوفير معلومات بنيوية مفصلة.
- التطبيقات: يستخدم للخلائط المعقدة والتحليل الدقيق في دراسة الأدوية والبروتينات.
- العينات المناسبة للقياس: العينات البيولوجية المعقدة، الأدوية، والمستحضرات الصيدلانية.

يستخدم لتحليل الخلطات المعقدة وتقديم معلومات بنيوية تفصيلية وقياس العينات البيولوجية المعقدة، الببتيدات، والمستقلبات..

أهميته

١. دقة عالية: توفر HPLC دقة عالية في قياس تركيز المركبات، مما يجعلها مناسبة لتحليل المواد الدوائية والبيئية.

٢. الصيدلة: التحليل الكمي والنوعي للمركبات الدوائية والمركبات النشطة.

٣. الكيمياء: لفصل وتحليل المركبات في الأبحاث الكيميائية.

٤. علوم المواد: لدراسة خصائص المواد الجديدة.

٥. التحليل البيئي: للكشف عن ملوثات في المياه والتربة.

٦. فصل وتحديد المركبات العضوية في عينة مجهولة

٧. قياس السموم المختلفة في البيئة.

٨. فصل وتشخيص البروتينات والجزيئات الحيوية ومقارنة بنى البروتينات المختلفة..

٩. مراقبة معايير الأدوية والسموم وتحليل المواد الغذائية..

١٠. تشخيص وتحديد السوائل غير الطيارة.

١١. التطبيقات المتعلقة بالأحماض الأمينية، فصل وتنقية وتحديد البروتينات (وكذلك أبحاث البروتيوميات)، الأحماض النووية، الهيدروكربونات، الأدوية، التربينويدات، المبيدات الحشرية، المضادات الحيوية، الستيرويدات، الأنواع العضوية ومجموعة من المواد المعدنية المتنوعة، وكذلك في بعض الاختبارات المتعلقة بتحديد تركيز الأدوية.

١٢. تحديد بنية البوليمرات.

١٣. كفاءة فصل أكبر مقارنة ببعض طرق الكروماتوغرافيا الأخرى.

إعداد العينة القياسية(Standard)

لضمان دقة القياسات، يُفضل إعداد عينة معيارية معروفة للمركب المراد تحليله. يجب اختبار هذه العينة باستخدام نفس ظروف التحليل التي تُستخدم للعينة الأصلية. هذا يساعد في التأكد من أن النتائج الناتجة دقيقة وموثوقة.

العينات القابلة للقياس

يمكن استخدام HPLC لتحليل مجموعة واسعة من العينات، بما في ذلك:

- الأدوية: مثل المركبات النشطة في الأدوية.
- المركبات الكيميائية: مثل الأصباغ، والمواد الكيميائية الصناعية.
- المواد الغذائية: مثل الفيتامينات، والمواد المضافة.
- المحاليل البيولوجية: مثل المصل والبول.

1.مبدأ الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC)

تعتمد تقنية HPLC على مبدأ الفصل الكيميائي للمركبات المختلفة في العينة بناءً على تفاعلها مع الطور الثابت والطور المتحرك.

- الطور الثابت :(Stationary Phase) هو المادة الموجودة داخل العمود الكروماتوغرافي، والتي تتفاعل مع المركبات حسب قطبيتها، حجمها، أو خصائصها الكيميائية الأخرى.
- الطور المتحرك :(Mobile Phase) هو السائل الذي يمر عبر العمود تحت ضغط عالي، ويعمل على نقل المركبات عبر العمود.

تُقسم تقنية HPLC عادة إلى نوعين رئيسيين حسب طبيعة الفصل:

١. HPLCالعكسي :(Reverse Phase HPLC) يستخدم أعمدة غير قطبية وطور متحرك قطبي، وهو الأنسب لتحليل المركبات الدوائية العضوية.

٢. HPLCالعادي :(Normal Phase HPLC) يستخدم أعمدة قطبية وطور متحرك غير قطبي، ويُستخدم عادة لفصل المركبات القطبية.

2.المعدات والأدوات المستخدمة

لإجراء تحليل HPLC دقيق، تحتاج المختبرات إلى المعدات التالية:

- جهاز HPLC متكامل :يشمل مضخة لضخ الطور المتحرك، عمود كروماتوغرافي، كاشف (Detector)ووحدة تسجيل النتائج.
- أعمدة كروماتوغرافية :مثل أعمدة C18 شائعة الاستخدام في تحليل الأدوية، والتي توفر فصلًا عالي الكفاءة للمركبات العضوية.
- الكواشف :(Detectors) الأكثر شيوعًا هي الكواشف فوق البنفسجية (UV-Vis) للكشف عن المركبات القادرة على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية. يمكن أيضًا استخدام كواشف الفلورة (FLD)أو مطيافية الكتلة (MS) لتحليل أكثر دقة.
- المذيبات :مثل الماء المقطر، الأسيتونيتريل، الميثانول أو مذيبات أخرى حسب طبيعة المركبات المدروسة.
- أدوات تحضير العينات :مثل محاليل القياس، ماصات دقيقة، فلتر للعينات لإزالة الجسيمات الصلبة قبل التحليل.

3.تحضير العينات

- يتم إذابة العينات الدوائية في مذيب مناسب لضمان ذوبان كامل للمركبات الفعالة.
- تُصفّى العينات باستخدام فلتر دقيق (عادة ٠.٤٥ ميكرومتر) لإزالة الجسيمات الصلبة التي قد تسد عمود.HPLC
- تحضير سلسلة من المحاليل القياسية لتحديد خطية الاستجابة وتحليل النتائج الكمية.

4.إجراءات تشغيلHPLC

١. اختيار الظروف التشغيلية:

  - معدل تدفق الطور المتحرك (Flow Rate) عادة بين ٠.٥–١.٥ مل/دقيقة.

- درجة حرارة العمود: التحكم فيها لضمان تكرار النتائج.
- طول العمود وقطره: يؤثر على دقة الفصل وسرعة التحليل.

٢. حقن العينة في الجهاز :باستخدام ماصة دقيقة أو وحدة حقن أوتوماتيكية.

٣. الفصل والتحليل:

- تمر المركبات عبر العمود وتفصل حسب تفاعلاتها مع الطور الثابت.
- الكاشف يسجل إشارة لكل مركب عند وقت الاحتفاظ الخاص به.

٤. معالجة البيانات:

- رسم الكروماتوغرام (Chromatogram) لكل عينة.
- تحديد أوقات الاحتفاظ لكل مركب.Peak Retention Time
- حساب التركيزات النسبية أو المطلقة للمركبات باستخدام المنحنيات القياسية.

.5معايير الدقة والجودة

- تكرار التحليل (Repeatability) للتحقق من استقرار النتائج.
- دقة القياس (Accuracy) والتحقق من صحة النتائج عبر مقارنة العينات القياسية.
- التحقق من فصل المركبات المتداخلة لتجنب التداخل في القراءات.

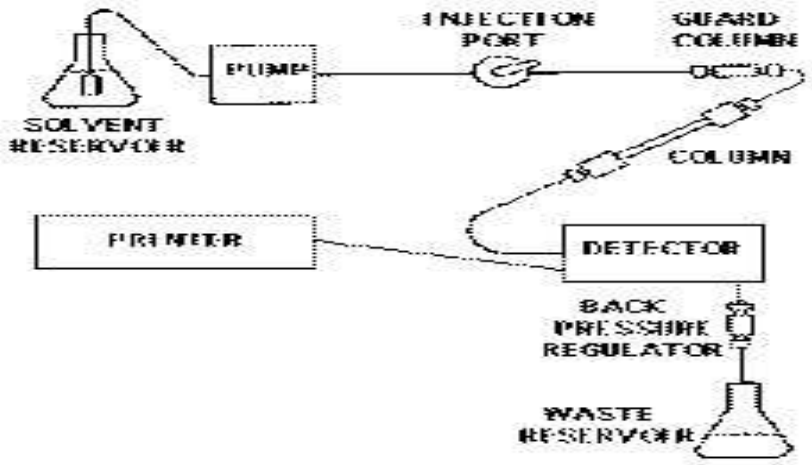
تعريف الفصل بال HPLC

هي طريقة من طرائق الفصل بالكروماتوغرافيا يتم فيها استخدام أعمدة أبعادها صغيرة تعبأ بأطوار ثابتة أبعادها صغيرة جداً فتحقق عدداً كبيراً من الطبقات النظرية التي تزيد كفاءة الفصل وتمكن من فصل تراكيز صغيرة للعينة كما توفر في كمية الطور الثابت والمتحرك المستخدمين في عملية الفصل وتقصر زمن الفصل غير أن إمرار الطور المتحرك يجب أن يتم تحت الضغط العالي.

ضخ الطور المتحركMobile Phase Elution

١- الضخ المتماثل isocratic elution

يتألف الطور المتحرك في هذه الطريقة من محل واحد أو مزيج محلين بنسبة ثابتة فلا يتغير تركيب الطور المتحرك طيلة عملية الفصل.



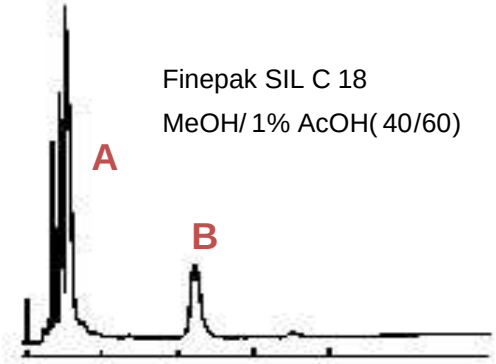
2: gradient elution- الضخ التدريجي .

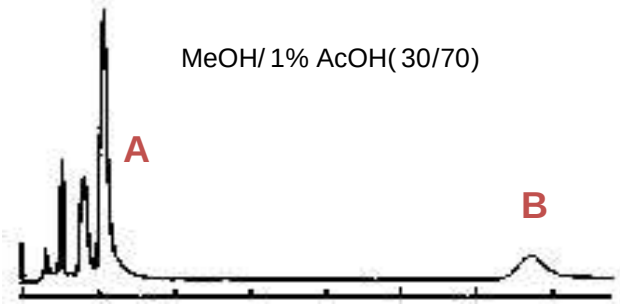
. يتألف الطور المتحرك في هذه الطريقة من محيلن أو أكثر بحيث تختلف قطبية المحلات عن بعضها ويتغير تركيب المتحرك بشكل مستمر أثناء عملية الفصل.

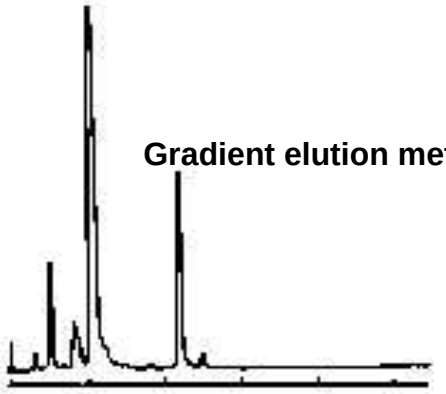
Isocratic elution method

MeOH/1% AcOH

30/70→45/55







Linear Gradient、16min

أجزاء الجهاز The apparatus

يتألف ال HPLC من الأجزاء الرئيسية التالية:

أوعية الطور المتحرك Mobile phase Reservoirs : تكون أجهزة ال HPLC الحديثة مزودة بوعاء أو أكثر مصنوع من الزجاج أو الستانلس ستيل يتسع كل منها ل ٥٠٠ مل من المحل المستخدم.

يمكن للفقاعات الموجودة في محلات الطور المتحرك أن تؤثر على أداء المتحريات المستخدمة في ال HPLC لذا يجب إزالة الفقاعات من الطور المتحرك قبل ضخه ويتم ذلك باستخدام الأمواج فوق الصوتية.

نظام الضخ Pumping Systems يجب أن تتوفر في المضخات المستخدمة في ال HPLC الشروط التالية:

أن تتمكن من الضخ بضغوط عالية تصل إلى ١٠٠ وحدة / إنش ٢

أن تكون مصنوعة من مادة لا تتأكل بتأثير المحلات العضوية

أن تتمتع بتكرارية جيدة

أن تتراوح سرعة الضخ بين ٠١ – ١٠ مل / دقيقة

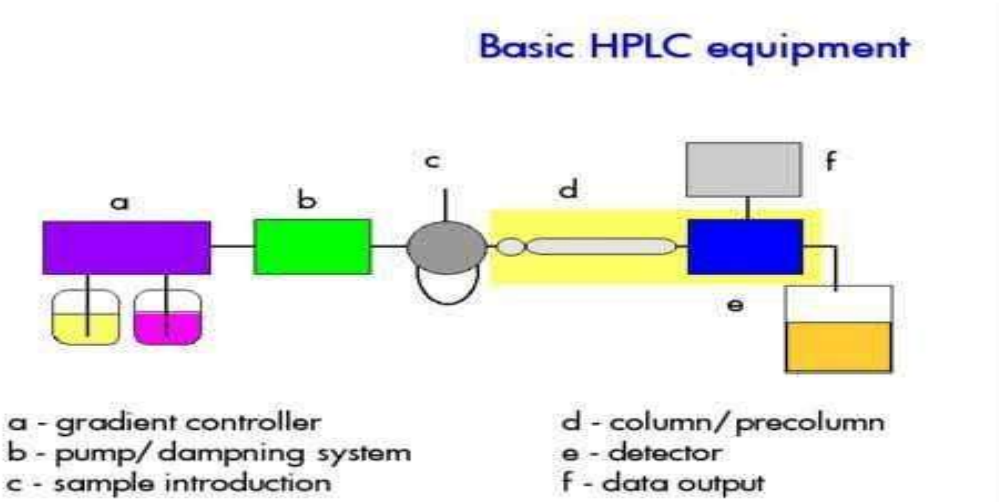
نظام حقن العينة *Sample Injection Systems* : هو عبارة عن حلقة متعددة الفتحات التي تكون مختلفة الأبعاد تتصل من جهة بالعينة ومن جهة أخرى بالعمود.

عمود الفصل: هناك نوعين من الأعمدة المستخدمة في ال HPLC

. الأعمدة العادية يكون طولها ١٠ ٣٠ سم وقطرها ٤ – ١٠ مم وأبعاد الحبيبات التي تملؤها ٥ – ١٠ ميكرون.

High speed, high performance الأعمدة السريعة عالية الأداء . columns يكون طولها ٣ – ٧ سم و قطرها ١ – ٤ مم مملوءة بحبيبات أبعادها ٣ – ٥ ميكرون

المتحري يجب أن تتمتع المتحريات المستخدمة بال HPLC بحساسية عالية وتكرارية جيدة واستجابة متناسبة مع كمية المادة المفصولة.



أهم المتحريات المستخدمة في ال HPLC

Refractometer detector متحري قرينة الانكسار

يعتمد هذا المتحري في مبدئه على تغير قرينة انكسار الطور المتحرك نتيجة خروج المواد المفصولة معه.

غير أن من عيوب هذا المتحري أنه لا يمكن استخدامه في حالة الضخ المتعدد للطور المتحرك كما أنه يتأثر بدرجة

الحرارة وحساسيته من رتبة ppm ١٠

متحري الطيف الضوئي في المجال المرئي وفوق البنفسجي: - UV-visible detector:

يعد هذا المتحري الأكثر استخداماً بين جميع المتحريات حيث يمكن تحري المواد العضوية التي تحمل لون أو يمكن أن تشكل معقداً ملوناً مع كاشف معين في المجال المرئي في حين يمكن تحري معظم المواد العضوية الحاملة مولدة للون chromophore في مجال فوق البنفسجي.

كما يمتاز هذا المتحري بعدم تأثره بدرجة الحرارة كما يمكن استخدامه في حالة الضخ المتعدد للطور المتحرك وتبلغ حساسية هذا المتحري حوالي

ppm 0.01.

غير أن المشكلة التي تواجهنا عند العمل بهذا المتحري هو وجود امتصاص

المحلات الطور المتحرك في مجال ال UV

يوضح الجدول التالي أطوال الأمواج الموافقة لامتصاص المحلات العضوية في مجال ال UV.

solvent	Cut off (nm)
acetone	330
Acetonitril	200
dichlormethan	233
ethanol	205
ethylacetate	255
methanol	206
tetrahydrofuran	230
Toluen	212

متحري التألق

تعد حساسية هذه الطريقة أعلى بقليل من حساسية الطريقة السابقة وهي طريقة نوعية تعتمد على قدرة بعض المركبات العضوية على إصدار أشعة التألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية.

The amperometric detector متحري مقياس الأمبير

يعد هذا المتحري نوعياً بالنسبة للمركبات الفعالة كهربائياً وله استخدامات كثيرة في المجال الحيوي كتحري آثار الكاتيكول أمين في الدماغ.

Electrolytic conductivity detector : متحري الناقلية الكهربائية

يعتمد على تغير الناقلية الكهربائية للطور المتحرك نتيجة خروج المواد المفصولة الفعالة كهربائيا معه ويعد هذا المتحري نوعياً للمركبات الفعالة كهربائياً .

Mass specrometric detector: متحري مطياف الكتلة

يقوم هذا المتحري بتحديد هوية المادة المفصولة بتحويلها إلى أيونات وفصل هذه الأيونات تبعاً لنسبة كتلتها إلى شحنتها.

الأطوار الثابتة والمتحركة المستخدمة في ال HPLC

What are mobile and stationary phases for HPLC

تعد كرما توغرافيا الادمصاص adsorption chromatography وكروماتوغرافيا التوزع partition chromatography من أكثر الطرائق المستخدمة في ال HPLC حيث تستخدم مادة صلبة ذات طبيعة

المصاصية كطور ثابت في الحالة الأولى بينما يستخدم طور سائل محمول على صلب خامل في الحالة الثانية. وفي الحالتين تعتمد نتائج الفصل على قطبية المادة
المفصولة وقطبية الطور الثابت والمتحرك.
تعد السيليكا والألومين وكذلك السللوز من أهم الأطوار الثابتة المستخدمة في كروماتوغرافيا الادمصاص في ال HPLC .
في كروماتوغرافيا الادمصاص يتنافس الطور المتحرك والثابت على المواد المفصولة ويبقى الطور الثابت ثابتاً خلال عملية الفصل وتتغير قطبية الطور
المتحرك حتى يتم ال elution
تعد كروماتوغرافيا الادمصاص حساسة للتأثير الفراغي للمركبات المفصولة steric effect لذا تستخدم بكثرة لفصل الإيزوميرات التي تملك عدة متماكبات configuration لذا تستخدم كروماتوغرافيا الادمصاص بكثرة لفصل مشتقات أورتو وبارا للحلقة البنزينية.
تكون كروماتوغرافيا التوزع في ال HPLC حساسة للتغيرات الضئيلة بالوزن الجزيئي للمواد المراد فصلها. وتقسم إلى نوعين
كروماتوغرافيا التوزع بالطور العادي (NP-HPLC)
حيث يكون الطور الثابت قطبياً والطور المتحرك غير قطبي ويتم الاحتفاظ بالمواد القطبية وقتاً طويلاً في حين تغادر المواد غير القطبية عمود الفصل بسرعة.
كروماتوغرافيا التوزع بالطور العكوس (RP-HPLC)
حيث يكون الطور الثابت غير قطبي والطور المتحرك قطبي ويتم الاحتفاظ بالمواد غير القطبية وقتاً طويلاً في حين تغادر المواد القطبية عمود الفصل بسرعة. أما الطور المتحرك القطبي المستخدم في هذه الطريقة فهو محل قطبي كالأسيتونتريل، الميتانول، التتراهيدروفوران والماء وغالباً يستخدم مزيج من الماء مع أحد تلك المحلات السابقة. إن المحل العضوي الذي يمزج
مع الماء في RP-HPLC يدعى المحل المعدل modifier
يكون المحل المعدل ميتانول بالنسبة للمركبات الحمضية في حين يستخدم الأسيتونتريل للمركبات القلوية ويستخدم التتراهيدروفوران بكثرة للمركبات ثنائية القطب dipoles.
يعد الأوكتيل ديسيل سيليل العمود (C18) والديسيل سيليل العمود (C8) من أهم الأطوار الثابتة المستخدمة في RP-HPLC
يعد ال (PEG) من أكثر الأطوار الثابتة المستخدمة في ال NP-HPLC
كقاعدة عامة : يستخدم ال HPLC بالادمصاص لفصل المركبات عديمة القطبية في حين يستخدم ال HPLC بالتوزع لفصل المركبات عالية القطبية
وتستخدم كلتا الطريقتين لفصل بقية المواد متدرجة القطبية

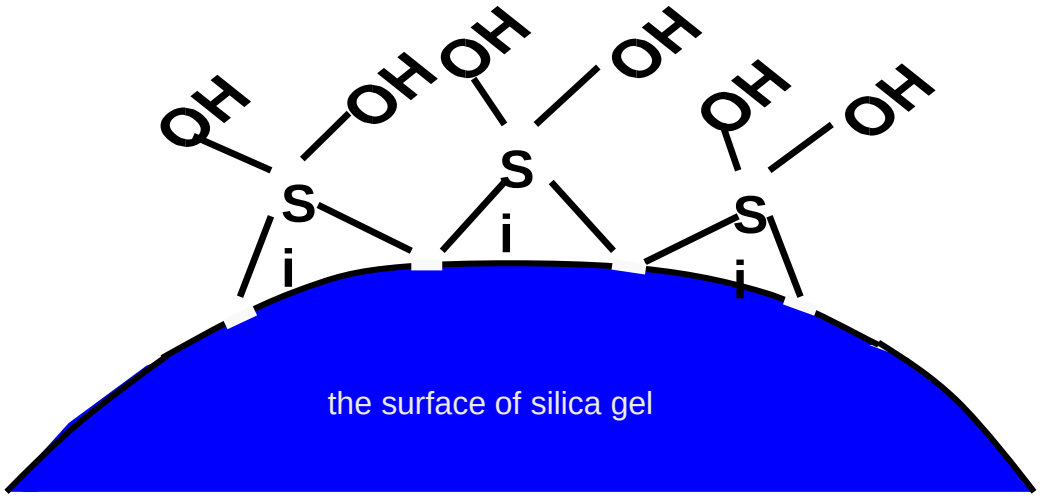
أنواع ال HPLC Types of HPLC

هناك أربعة أنواع رئيسة لل HPLC حسب طبيعة الطور الثابت المستخدم

كروماتوغرافيا الادمصاص السائلة عالية الأداء : High Performance Adsorption Chromatography

في هذه الطريقة يكون الطور الثابت مادة صلبة ذات طبيعة المصاصية ويتم تثبت المواد على الطور الثابت بخاصة الادمصاص.

تعد السيليكا أكثر الأطوار الثابتة استخداماً في هذا النوع ويعزى تأثيرها إلى مجموعات السيلانول – Si OH الموجودة في بنيتها

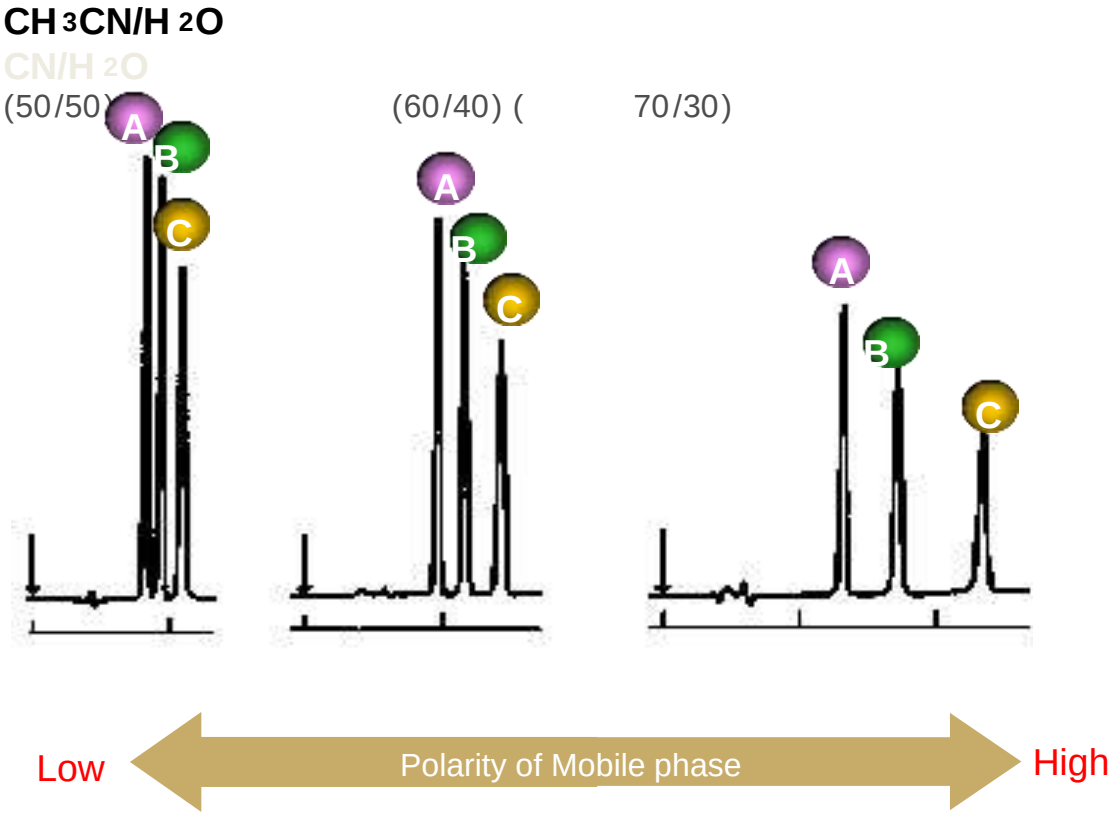


٢ كروماتوغرافيا التوزع عالية الأداءHigh Performance Partiti

في النوع يكون الطور الثابت سائل محمول على صلب خامل وتقسم هذه الطريقة حسب طريقة توضع الطور الثابت على المادة الحاملة إلى نوعين:

الطريقة في الفراغات بين حبيبات المادة الحاملة. يتوضع الطور الثابت في هذه Liquid-liquid chromatography

حيث يتوضع الطور Liquid-bonded phase chromatography الثابت على المادة الحاملة بارتبطه بروابط كيميائية على سطح



كروماتوغرافيا التبادل الأيوني العالية الأداء :

يكون الطور الثابت في هذه الطريقة مبادل شوارد كاتيوني أو أنيوني ويتم الفصل بلاعتماد على تبادل الشوارد حسب المعادلات التالية:

:

$$(RSO3\text{-})x \quad M{+}x + x\ H{+} \rightleftharpoons xRSO3\text{-}\ H \quad + + M{+}x$$

solu solid solu solid

$$^{-x} + x\ OH^{-} \quad [RN(CH_3)_3^{+}]_x\ A \rightleftharpoons + A^{-x} \quad xRN(CH_3)_3^{+}\ OH^{-}$$

كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي العالية الأداء

يكون الطور الثابت بنية تشبه المنخل ويتم فصل المواد بالاعتماد على وزنها الجزيئي وحجمها. ويكون الطور الثابت محب للماء في حال المواد القطبية ويكون محب للدسم في حال فصل المواد غير القطبية.

أولًا: المراجع العربية

١. محسن، ع. م. ع، وسعيد، ع. أ. م، وسالم، ط. أ. ف. (٢٠٢٢). التحليل الكروماتوغرافي – الكتلي لبعض المركبات الفعالة حيويًا في نباتين طبيين يمنيين. المجلة العربية للبحث العلمي، ٤(٢)، ٤٥–٦٠.
٢. صالح، ق. م. (٢٠٢٣). التقدير الدقيق لبعض المركبات الدوائية باستخدام تقنية HPLC. المجلة الآسيوية للكيمياء التطبيقية، ٩(١)، ١٥–٢٧.
٣. حمود، ر. ر. ك، وحمود، ع. ج، وعبد الرسول، و. ع، وحسين، ص. س. (٢٠٢١). الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC): المبادئ الأساسية والتطبيقات الشائعة. مجلة النهرين للعلوم، ٢٤(٣)، ٢٢١–٢٣٤.
٤. جامعة البعث. (٢٠٢٠). استخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) في تحليل بعض الفيتامينات والمعقدات المعدنية. أطروحة ماجستير، كلية العلوم، جامعة البعث.
٥. الزعبي، أ. (٢٠٢١). تحليل العينات الدوائية لتحديد محتوى المركبات الفعالة. موقع إي عربي. https://e3arabi.com
٦. uHPLCs. (2023). تطبيقات الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) في صناعة الأدوية الحيوية. مدونة uHPLCs. https://uhplcs.com/ar
٧. الهاشمي، س. ن. (٢٠٢٢). استخدام تقنيات الكروماتوغرافيا في مراقبة جودة الأدوية. مجلة العلوم الصيدلانية العربية، ١٣(٤)، ٥٥–٧٠.
٨. عبد الله، ر. ك. (٢٠٢٠). الكروماتوغرافيا السائلة كأداة لتحليل المركبات العضوية النشطة دوائيًا. مجلة الكيمياء العربية، ١٠(١)، ٩٠–١٠٣.
٩. جبر، م. ع. (٢٠١٩). تطبيقات الكروماتوغرافيا في تحليل المنتجات الصيدلانية المركبة. مجلة البحوث الكيميائية التطبيقية، ٥(٢)، ١٣٠–١٤٥.
١٠. أبو شقرة، ن. س. (٢٠٢١). الكروماتوغرافيا السائلة: المبادئ والتطبيقات في تحليل الأدوية. مجلة العلوم التطبيقية، ١٨(٣)، ٧٧–٩٢.

ثانيًا: المراجع الأجنبية

1. Zhu, Y., Qin, J., Wu, W., & Cai, L. (2024). Development and validation of a novel HPLC method for the detection of related substances of pralsetinib, a new anti-lung cancer drug. Frontiers in Chemistry, 12, 1450692. https://doi.org/10.3389/fchem.2024.145069
2. Müller, H.-C., & Schmidt, P. (2023). HPLC in pharmaceutical analytics: New techniques for old challenges and new Issues. Wiley Analytical Science. https://analyticalscience.wiley.com
3. Rajurkar, V. (2024). Advances in high-performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation: A comprehensive review. Journal of Drug Delivery and Biotherapeutics, 14(1), 45–58.
4. Amudala, Y., & Rao, Y. V. (2025). Current advances in pharmaceutical analysis and method development using high performance liquid chromatography: A review article. Journal of Pharma Insights and Research, 7(2), 22–35.
5. Chawla, G., & Chaudhary, K. K. (2019). A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. International Journal of Pharmaceutical and Chemical Analysis, 6(4), 143–150.
6. Kumar, A., & Patel, N. (2020). HPLC method development and validation for pharmaceutical dosage forms: A review. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, 8(5), 1–9.
7. Li, X., & Zhang, T. (2021). High-performance liquid chromatography as a tool for standardization of complex herbal drugs. Journal of Chromatography A, 1650, 462–478.
8. Singh, R., & Kaur, P. (2022). Recent innovations in HPLC: Method development and validation strategies. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 12(6), 33–45.
9. Sharma, V., & Gupta, R. (2023). Analytical method development for multicomponent pharmaceutical formulations using HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 228, 115–122.
10. Costa, M. L., & Silva, J. P. (2020). The role of HPLC in drug quality control: Case studies and practical aspects. Analytical Chemistry Research, 29, 100–112.
11. Kalantzi, L., & Macheras, P. (2022). Recent trends in HPLC analysis of impurities in pharmaceutical substances. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 157, 116832.

12.Hoffman, J., & Richards, D. (2021). Applications of high-performance liquid chromatography in modern pharmaceutical industry. Journal of Chromatographic Science, 59(9), 845–856.