

## دراسة تحليلية حول مقارنة الشروط المثلى لفصل وتحديد السبيراميسين والتايلوزين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 وفق تقانة HPLC-DAD

الدكتور عصام محمد\*  
الدكتور دارم طباع\*\*  
الدكتور تميم عليا\*\*\*  
لبينة الرحبة\*\*\*\*

(تاريخ الإيداع 16 / 10 / 2014. قُبِلَ للنشر في 10 / 12 / 2014)

### □ ملخص □

تتخصر استخدامات الصادات الماكروليدية في الطب البيطري في معالجة طيف واسع من الأمراض المعدية. يتناول هذا البحث تحديد الشروط المثلى لفصل وتحديد صادين ماکروليدين هما التايلوزين والسبيراميسين فصلاً وتحديداً مترامين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 والمقارنة بينهما بغية تطوير طريقة سريعة وحساسة، يُمكن اعتمادها في قياس هذين المركبين باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وكاشف المصفوفة الديودية (High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector HPLC-DAD).

اعتمدت هذه الدراسة على استخدام التمليص المُتدرج Gradient Elution للطور مُتحرك، وتمَّ التوصل إلى أفضل شروط مُمكنة للفصل والتحديد مُترافقين مع أفضل زمن احتفاظ ومساحة قمة للمركبين المدروسين باستخدام طور مُتحرك مكون من محلول مائي لفوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية اللامائية عند pH=2.4 ومحلول عضوي للأسيتونتريل بنسبة 80:20v/v (محلول A) والأسيتونتريل (محلول B)  $[Na_2HPO_4(0.04M) \text{ pH:}2.4/ACN(80:20v/v)]/ACN$ ، ودرجة حرارة 40°C لكلا العمودين، وسرعة تدفق 1ml/min للطور المُتحرك، وطول موجة امتصاص أعظمي 280nm للتايلوزين و232nm للسبيراميسين؛ إذ سُجِّلَ أفضل مساحة قمة 5.759 للتايلوزين و5.927 للسبيراميسين عند التركيز 0.10ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بالمقارنة مع أفضل مساحة قمة 4.432 للتايلوزين و4.212 للسبيراميسين للتركيز نفسه باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C18، كما لوحظ تسجيل أفضل زمني احتفاظ لمركبي التايلوزين والسبيراميسين  $R_t:7.013, 4.214min$  على التوالي عند التركيز 0.10ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بالمقارنة مع أفضل زمني احتفاظ  $R_t:7.641, 5.898min$  على التوالي عند التركيز نفسه باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C18. تميز منحنى المُعايرة لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين المفصولين على عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بخطية جيدة ضمن مجال من التراكيز تراوح بين 1-100ppb  $\approx 0.0010-0.10ppm$  عند طولي الموجة  $\lambda_{max}=280, 232nm$  على التوالي.

الكلمات المفتاحية: صادات ماکروليدية (تايلوزين وسبيراميسين)، 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.

## An analytical study on Comparison of the Optimal Conditions for Separation and Determination of Tylosin and Spiramicine, Using C8 and C18 Chromatographic Separation Columns by HPLC-DAD Technique

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

(Received 16 / 10 / 2014. Accepted 10 / 12 / 2014)

### □ ABSTRACT □

Tylosin and Spiramicin are medium-spectrum macrolide antibiotic used exclusively in veterinary medicine for the treatment of a wide range of infections. This research deals with the determination of optimal conditions for simultaneous separation and determination of two macrolides antibiotics (Tylosin and Spiramicine), using C8 and C18 Chromatographic separation columns and doing the comparison between them in order to develop a rapid and sensitive method which can be used to measure these two compounds using High Performance Liquid Chromatography – Diode array detector (HPLC-DAD).

This study has used the gradient elution for mobile phase and revealed that the best conditions for separation and determination are conjugated with the best retention times and best areas for both studied compounds using a mobile phase consisted of an aqueous solution of anhydrous disodium Hydrogen Phosphate at pH=2.4 and an organic solution of acetonitrile with a ratio of 80:20v/v (solution A) and acetonitrile (solution B) [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:2.4/CAN (80:20v/v)]/ ACN, temperature 40°C for both columns, flow ratio of 1ml/min. for the mobile phase and maximum absorption wave length 280 nm, 232nm for Tylosin and Spiramicine respectively. The best peak areas are recorded as 5.759, 5.927 for Tylosin and Spiramicine 0.10ppm respectively, using C8 Chromatographic separation column in comparison with the best peak areas 4.432, 4.212 respectively at the same concentration using C18 Chromatographic separation column. It was noticed that the best retention times for Tylosin and Spiramicine were 7.013, 4.214min. respectively at concentration of 0.10ppm using C8 Chromatographic separation column in comparison with the best retention times 7.641, 5.898min. respectively at the same concentration using C18 Chromatographic separation column. The calibration curves for both separated compounds on C8 Chromatographic separation column showed a good linearity within a concentration range of 0.0010-0.10 ppm  $\approx$  1-100ppb at the two wave lengths  $\lambda_{max}$  = 280, 232nm respectively.

**Keywords:** Macrolides Antibiotic (Spiramicin, Tylosin), 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-Albath University-Lattakia-Syria.

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

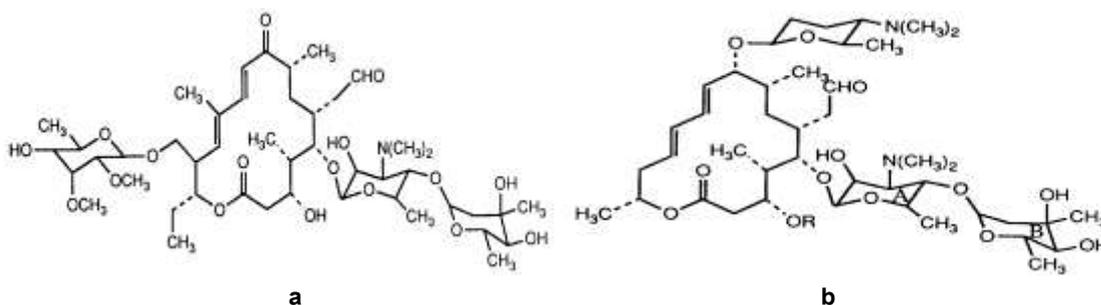
\*\*\*\* postgraduate Student, Department of Chemistry-Faculty of Science-Tishreen University-Lattakia-Syria.

## مقدمة:

اعتمدت الأبحاث العلمية على استخدام تقانات تحليلية عدة في تحديد النزر المتبقي للصادات الماكروليدية في المنتجات الغذائية المختلفة ذات المنشأ الحيواني، مثل طريقة اختبار الامتزاز المناعي المرتبط بالإنزيم (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) وغيرها [1, 2, 3]. تسمح تقانات الكروماتوغرافيا بقياس النزر المتبقي لصادات عدة في آن معاً كالتحليل الكيفي والكمي بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء مع كاشف الأشعة فوق البنفسجية (High performance liquid chromatography-Ultra violet detector, HPLC-) (UV [1, 4, 5, 6])، وتقانة الكروماتوغرافيا السائلة المزودة بمطياف أو مطياف كتلة (liquid chromatography - mass spectrometry, LC-MS)، وتقانة الكروماتوغرافيا (liquid chromatography- tandem mass spectrometry LC/MS/MS) [1, 4, 5]، وتقانة الكروماتوغرافيا الغازية بالتحلل الحراري (pyrolysis-gas chromatography) [5]. تميزت تقانة HPLC المزودة بكاشف مطيافية الكتلة بحدود كشف منخفضة جداً تصل إلى حدود (0.1-0.3µg/Kg) [7] بالمقارنة مع التقانات الأخرى المستخدمة في التحليل، لكنها تبقى تقانة باهظة التكاليف [8] وغير متوفرة في جميع المخبر الخدمية [5]. تُستخدم تقانة HPLC-MS في الاختبارات التأكيديّة وليست في الأعمال الروتينية مثل مراقبة الصادات في المنتجات الغذائية المتوفرة في الأسواق [9, 10]، كما تستخدم تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء باستخدام كاشف المصفوفة الديودية High performance liquid chromatography-photo diode array detector, HPLC-DAD في تأكيد هوية النزر المتبقية للصادات وفق قرار الوكالة الأوروبية European Commission Decision 2002/657/EC [4].

استخدم بعض الباحثين التمليص المتدرج (gradient elution) الذي يتمتع بتكرارية منخفضة بالمقارنة مع التمليص متساوي القوة (isocratic elution) [5]. استخدمت أغلب الدراسات العلمية المنشورة عمودين كروماتوغرافيين C8, C18 في فصل الصادات الماكروليدية باستخدام تقانة HPLC [6].

تُعد تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المزودة بكاشف المصفوفة الديودية من الطرائق التحليلية الحساسة والانتقائية والمناسبة لتحليل مركبي التايلوزين والسيبراميسين. يمثل الشكل (1-a, b) جزئي مركبي التايلوزين والسيبراميسين.



شكل (1): a: جزئي مركب التايلوزين b: جزئي مركب السيبراميسين

**أهمية البحث وأهدافه :**

يهدف البحث إلى تحديد الشروط المثلى (نسب مُذبيات الطور المُتحرك، pH الطور المتحرك، درجة حرارة العمود الكروماتوغرافي، سرعة تدفق الطور المُتحرك، طول الموجة الأعظمي الأمثل  $\lambda_{max}$ ) التي يمكن اعتمادها في تحديد مُركبي التايلوزين والسبيراميسين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 وفق تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المزودة بكاشف المصفوفة الديوية.

تكمن أهمية البحث في إمكانية التوصل إلى مساحة قمة وزمن احتفاظ جيدين يساعدان في توفير الجهد والزمن اللازمين في المرافق الخدمية لتحليل عدد من العينات التي تحتوي على مُركبي التايلوزين والسبيراميسين في زمن قصير باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

**طرائق البحث ومواده****Solvents and Solutions****المُذبيات والمحاليل المستخدمة**

- مركب سبيراميسين Spiramycine (98%)، إنتاج شركة (Sigma USA).
  - مركب التايلوزين Tylosin (98%)، إنتاج شركة (Sigma USA).
  - ميثانول (Methanol, CH<sub>3</sub>OH) (HPLC-grad) 99.8%، إنتاج شركة (Merck-Germany).
  - أسيتونتريل (Acetonitrile, CH<sub>3</sub>CN) (HPLC-grad) 99.8%، إنتاج شركة (Merck-Germany).
  - فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية اللامائية (Disodium Hydrogen Phosphate anhydrate, ) 98% (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)، حمض الفوسفور (Phosphoric Acid, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)، إنتاج شركة (Merck-Germany).
  - ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (de-ionized).
- تتمتع جميع المركبات والمُذبيات والمحاليل المستخدمة بدرجة عالية من النقاوة.

**Apparatus and Tools****الأجهزة والأدوات المُستخدمة**

- فلتر غشائية 0.45µm (Milliporemembrance-filters)، إنتاج شركة Goettingen-Germany .Albet.
- حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic water – bath).
- جهاز ترشيح.
- عمودي فصل كروماتوغرافيين:
- Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (C18-250 x i.d 4.6 mm, 5µm)
- Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8(C8-250 x i.d 4.6 mm, 5µm)
- جهاز كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء مزود بكاشف المصفوفة الديودية الضوئية ماركة (Agilent-USA). تراوحت درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي بين 10-80°C، ومجال تدفق الطور المتحرك بين 0.001 - 10m/min بحساسية تصل إلى 0.001 m/min.
- مذبيات الطور المتحرك Mobile-phase: محلول فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية اللامائية في ماء ثنائي التقطير (0.040M)، واسيتونتريل.

تم اختيار تراكيز المحاليل العيارية لمركب التايلوزين والسبيراميسين ضمن مجال تراوح بين 0.0010-1.0ppm بغية تحديد شروط الفصل المثلى وفق تقانة HPLC-DAD.

### الشروط المثلى لفصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C18)

#### The Optimal Ratio for Mobile Phase Solvents النسبة المثلى لمُذيبات الطور المتحرك

تم اختيار مكونات الطور المتحرك من مُذيب الأستونتريل ومحلل المُنظم الفوسفاتي بغية ضبط المكون المائي للطور المتحرك عند قيمة منتقاة لـ pH=3.5 والتي أُجريت دراسة لاحقة لتحديد قيمتها المثلى وذلك بسبب امتصاصية الطور المُتحرك المنخفضة عند أطوال موجية منخفضة [1]، وبناءً عليه أُجريت الدراسة المخبرية بادئ ذي بدء عبر حقن 0.1ppm من مركبي التايلوزين والسبيراميسين العيارين عند طولي موجة 280, 232nm على التوالي ودرجة حرارة 25°C وتدفق 0.8ml/min باستخدام العمود الكروماتوغرافي C18 بهدف تحديد تأثير نسب المزيج A:[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) with De-ionized water pH:3.5/ACN(0:0v/v)] المستخدم في تركيب مزيج الطور المتحرك A مع ثبات في حجم المُذيب B:[ACN] الموافق لظهور القمتين الكروماتوغرافيتين للمركبين المدروسين، وذلك وفق البرنامج الزمني لتدرج نسب الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي كما هو موضح في الجدول (1).

يلاحظ من الجدول (2) تباين واضح في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة الكروماتوغرافية لمركبي التايلوزين والسبيراميسين عند التركيز 0.1ppm، ويعود السبب الرئيس في هذا التباين إلى تغيير في نسب المحلول A (الأستونتريل مع المحلول المنظم الفوسفاتي (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) الداخل في تكوين الطور المتحرك؛ إذ لوحظ تأثير نسب المحلول A في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة العائدة لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين. من ناحية ثانية، أهملت نتائج لتجارب لم تظهر فيها قمة واضحة ومفصلة للمركبين المدروسين، كما هو واضح عند استخدام نسب المزيج الثلاثة الأولى الموضحة في الجدول (2)، في حين لوحظ ظهور قمة لكل من المركبين المدروسين مع زيادة نسبة المحلول المنظم الفوسفاتي (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) في الطور المتحرك بدءاً من 60% والتي أصبحت أكثر وضوحاً بزيادة نسبته، وسُجلت أفضل مساحة قمة لكل من المركبين السابقين الذكر عند استخدام نسبة للمحلول A وفق الآتي: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M)pH:3.5/ACN(80:20v/v) وذلك بمتوسط زمن احتفاظ 11.299, 16.811min ومتوسط مساحة قمة 1.933, 0.690 لكل من التايلوزين والسبيراميسين على التوالي.

جدول(1): البرنامج الزمني لتدرج نسب الطور المتحرك المستخدم في فصل مركبي

التايلوزين والسبيراميسين عند طولي الموجة 280, 232nm على التوالي.

الزمن (min)	مُذيب A Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) with De-ionized water pH:3.5/ACN (0:0v/v)	مُذيب B CAN
0.01	100	0
0.5	60	40
30	60	40
35	100	0

جدول(2): تأثير نسب الأسييتو نتريل مع محلول المنتظم الفوسفاتي في مزيج المحلول A في قمم مركبي التايلوزين والسبيراميسين.

الطور المتحرك (Mobile phase)	التايلوزين 0.10ppm				السبيراميسين 0.10ppm					
	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%				زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%			
		*** حد الثقة $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					*** حد الثقة $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(30:70v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(40:60v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(50:50v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(60:40v/v)	17.872	0.254	0.260	0.246	0.262	14.626	0.019	0.019	0.022	0.021
		0.256±2.813					0.020±7.407			
		0.256±0.010					0.020±0.002			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(70:30v/v)	17.221	0.426	0.428	0.433	0.421	13.750	0.386	0.381	0.383	0.389
		0.427±1.163					0.385±0.910			
		0.427±0.007					0.385±0.005			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(80:20v/v)	16.811	0.691	0.699	0.699	0.672	11.299	1.933	1.930	1.935	1.933
		0.690±0.110					1.933±0.107			
		0.690±0.018					1.933±0.003			

T:25°C, Column (C18),  $\lambda_{\text{v}}=280\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{sp}}=232\text{nm}$ , Flow:0.8ml/min

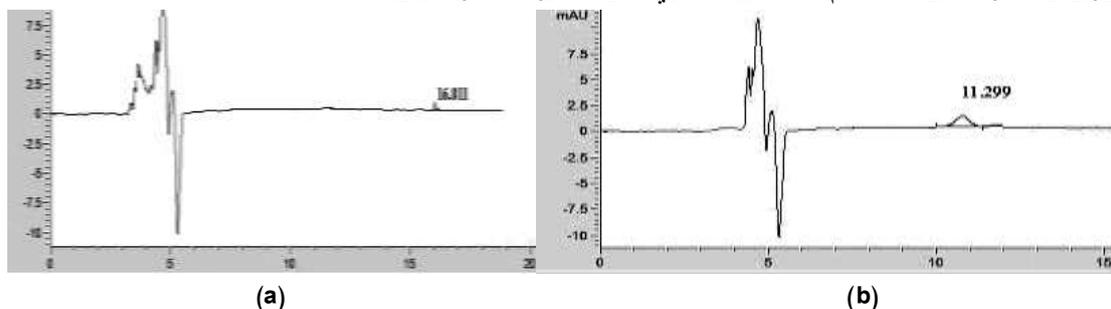
\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\* n=4: متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

تجدر الإشارة إلى أنه تم الحصول على قمة واضحة لمركب التايلوزين 0.10ppm بمتوسط مساحة 0.690 عند متوسط زمن احتفاظ قدره  $R_t:16.811\text{min}$ . وبانحراف معياري نسبي مئوي 0.11%. تم أيضاً الحصول على قمة واضحة لمركب السبيراميسين 0.10ppm بمتوسط مساحة 1.933 عند متوسط زمن احتفاظ قدره  $R_t:11.299\text{min}$  بانحراف معياري نسبي مئوي 0.107%. يوضح الشكل (2) كروماتوغرامي فصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين دون حدوث تداخلات ناجمة عن المركبات العائدة للطور المتحرك.

تم وفق هذه الدراسة استخدام مفهوم التمليص المتدرج للطور المتحرك في فصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين، مع الإشارة إلى أنه يتم الحصول وفق هذه الدراسة على نتائج إيجابية تؤخذ بالحسبان عند فصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين باستخدام التمليص متساوي القوة للطور المتحرك وفق تقنية HPLC-DAD.

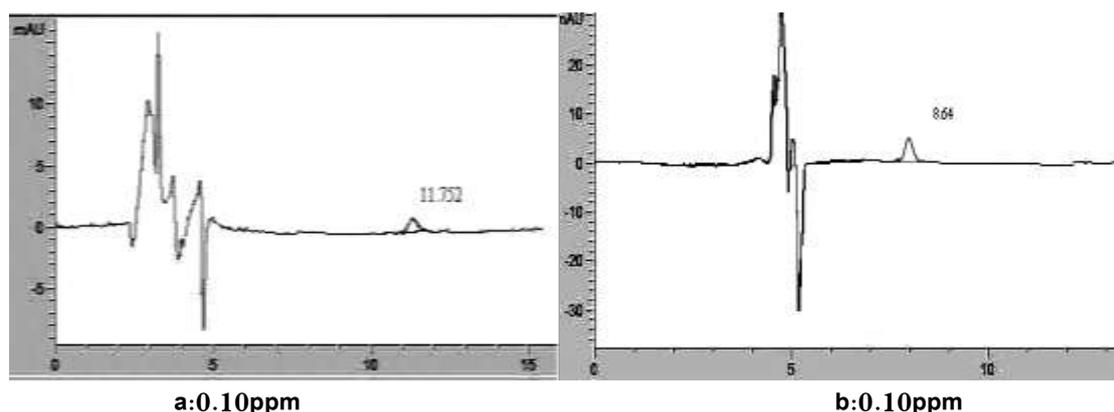


شكل(2):<sup>a</sup>: كروماتوغرام قمة مركب التايلوزين 0.10ppm و <sup>b</sup>: كروماتوغرام قمة مركب السبيراميسين 0.10ppm عند نسب الطور المتحرك A [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:3.5/ACN(80:20v/v)].

**Optimal pH of Mobile Phase****pH المثلى للطور المتحرك**

تتمتع الصادات الماكروليدات بقلوبتها نظراً لاحتوائها على سكر أحادي في تركيب الجزيء مما يجعل زمن احتفاظ هذه المركبات يتأثر كثيراً كبيراً بالرقم الهيدروجيني العائد للطور المتحرك [1, 2, 11]. تُعدّ قيمة pH الطور المتحرك ذات فعالية كبيرة في فصل الصادات الماكروليدات وفق تقانة HPLC-DAD؛ إذ يجري عادةً فصل الماكروليدات في وسط حمضي [2]، لذا أجريت دراسة مخبرية بغية تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للطور المتحرك. أُستخدم حمض الفوسفور في هذه الدراسة من أجل تأمين pH الوسط للطور المتحرك A:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})/\text{ACN}(80:20\text{v/v})]$ ؛ حيث جرى تغيير pH الطور المتحرك A ضمن مجال تراوح بين (pH:2.2-5) وثبتت الإجراءات التحليلية السابقة.

يظهر من نتائج الجدول (3) تأثير تغيرات pH وسط الطور المتحرك A في قمة مركب التايلوزين وزمن احتفاظه؛ إذ لوحظ تناقص في متوسط زمن الاحتفاظ عند الفصل على العمود الكروماتوغرافي C18 ضمن المجال  $R_t:11.752-19.405\text{min}$ ، وفي الوقت نفسه زيادة في مساحة قمة هذا المركب وذلك بالتزامن مع زيادة حموضة وسط الطور المتحرك A، وقد سُجل أفضل متوسط زمن احتفاظ  $R_t:11.752\text{min}$  الموافق لأفضل متوسط مساحة قمة 4.430 لمركب التايلوزين عند pH:2.4 بانحراف معياري نسبي مؤني بلغ 0.079%.



شكل (3): <sup>a</sup>: كروماتوغرام قمة مركب التايلوزين 0.10ppm و <sup>b</sup>: كروماتوغرام قمة مركب السبيراميسين 0.1ppm (b)، عند pH:2.4 للطور المتحرك  $\text{A:Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})$  pH:2.4/ACN(80:20v/v)

تناقص متوسط زمن احتفاظ مركب السبيراميسين من  $R_t:14.647\text{min}$  عند pH:5 إلى  $R_t:8.640\text{min}$  عند pH:2.2، إلى جانب ذلك، انعكست الزيادة في حموضة وسط الطور المتحرك A إيجابياً على مساحة قمة مركب السبيراميسين؛ حيث سُجل أفضل متوسط مساحة 4.206 لمركب السبيراميسين 0.1ppm عند pH:2.4 بانحراف معياري نسبي مؤني بلغ 0.109% كما هو موضح في الجدول (3).

جدول(3): تأثير pH الطور المتحرك A:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:2.4/ACN(80:20v/v) في قيم مركبي التالوزين والسبيراميسين 0.10ppm.

pH	التالوزين 0.10ppm				السبيراميسين 0.10ppm					
	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%				زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%			
		*** حد الثقة $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					*** حد الثقة $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
2.2	11.752	4.421	4.432	4.433	4.423	8.677	4.176	4.189	4.125	4.172
		4.427±0.127					4.166±0.671			
		4.427±0.009					4.166±0.039			
2.4	11.752	4.433	4.433	4.425	4.429	8.640	4.207	4.211	4.20	4.205
		4.430±0.079					4.206±0.109			
		4.430±0.005					4.206±0.006			
2.6	13.911	2.966	2.945	2.976	2.968	8.989	3.896	3.874	3.902	3.874
		2.964±0.466					3.887±0.377			
		2.964±0.018					3.887±0.020			
2.8	15.107	1.944	2.035	1.987	1.998	9.832	3.349	3.388	3.350	3.320
		1.991±1.882					3.352±0.932			
		1.991±0.052					3.352±0.039			
3.0	15.844	1.238	1.225	1.229	1.235	10.587	2.755	2.775	2.756	2.710
		1.232±0.475					2.749±1.003			
		1.232±0.008					2.749±0.038			
3.2	16.241	0.994	0.986	0.977	0.980	10.844	2.321	2.315	2.315	2.337
		0.984±0.762					2.322±0.448			
		0.984±0.010					2.322±0.014			
3.4	16.537	0.735	0.741	0.739	0.729	11.053	2.117	2.110	2.105	2.107
		0.736±0.719					2.110±0.249			
		0.736±0.007					2.110±0.007			
3.5	16.692	0.691	0.690	0.694	0.690	11.299	1.933	1.929	1.930	1.933
		0.691±0.274					1.931±0.107			
		0.691±0.003					1.931±0.003			
3.6	16.752	0.584	0.588	0.580	0.589	11.876	1.765	1.765	1.767	1.760
		0.585±0.703					1.764±0.169			
		0.585±0.006					1.764±0.004			
3.8	16.988	0.573	0.573	0.570	0.575	12.256	1.594	1.590	1.598	1.596
		0.573±0.360					1.595±0.214			
		0.573±0.003					1.595±0.005			
4.0	17.314	0.514	0.520	0.516	0.518	12.902	1.244	1.240	1.240	1.240
		0.517±0.499					1.241±0.161			
		0.517±0.004					1.241±0.003			
5.0	19.405	0.394	0.389	0.390	0.393	14.647	0.533	0.532	0.533	0.530
		0.392±0.608					0.532±0.266			
		0.392±0.003					0.532±0.002			

T:25°C, Column (C18), λ<sub>ty</sub>=280nm, λ<sub>sp</sub>=232nm, Flow:0.8ml/min,  
[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M)/ACN(80:20v/v)]/ACN

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربعة مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

\*\*: n=4 متوسط مساحة قمة المركب لأربعة مكررات لكل تركيز.

### درجة الحرارة المثلى لفرن العمود الكروماتوغرافي (C18)

#### Optimal Temperature for Chromatographic Column oven(C18)

جرى وفق تقانة HPLC-DAD تغيير درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي C18 بدءاً من درجة حرارة الغرفة 25°C إلى الدرجة 40°C، ولوحظ بعد إجراء اختبارات تجريبية عدة لدرجات الحرارة عدم ظهور تغير ملحوظ في مساحة القمم الكروماتوغرافية العائدة لكل من المركبين مع تغير درجة حرارة فرن العمود، بينما طرأ تغير طفيف على متوسط زمن الاحتفاظ العائد لهذه القمم، حيث انخفض زمن الاحتفاظ العائد لمركب التايلوزين 0.10ppm من Rt:11.750min في درجة حرارة 25°C إلى Rt:10.464min في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي مؤني تراوح بين 0.025-0.046% كما هو موضح في الجدول (4). بينما انخفض متوسط زمن الاحتفاظ العائد لمركب السبيراميسين 0.10ppm من Rt:8.641min في درجة حرارة 25°C إلى Rt:7.308min في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي مؤني تراوح بين 0.021-0.029% كما هو موضح في الجدول (4).  
يوضح الشكل (4) قمم كروماتوغرافية لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين في درجتي حرارة 40°C و 35°C.

جدول (4): تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمم مركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm

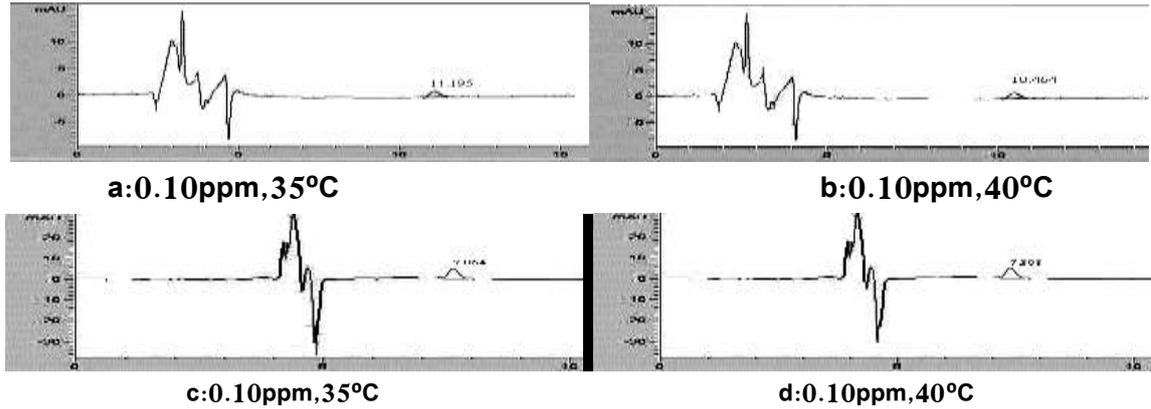
درجة حرارة العمود	التايلوزين 0.10ppm				السبيراميسين 0.10ppm					
	مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ Rt(min)* ± RSD%				مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ Rt(min)* ± RSD%			
		حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
25	4.425	11.746	11.750	11.753	11.750	4.222	8.641	8.644	8.638	8.640
		11.750±0.025					8.641±0.029			
		11.750±0.004					8.641±0.003			
30	4.433	11.576	11.570	11.577	11.576	4.210	8.441	8.439	8.438	8.439
		11.575±0.028					8.439±0.015			
		11.575±0.004					8.439±0.002			
35	4.429	11.195	11.190	11.196	11.198	4.222	7.862	7.865	7.865	7.864
		11.195±0.031					7.864±0.018			
		11.195±0.005					7.864±0.002			
40	4.423	10.457	10.466	10.464	10.468	4.217	7.309	7.310	7.307	7.307
		10.464±0.046					7.308±0.021			
		10.464±0.007					7.308±0.002			

Column (C18),  $\lambda_{iy}=280\text{nm}$ ,  $\lambda_{sp}=232\text{nm}$ , Flow:0.8ml/min, [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:2.4/ACN(80:20v/v)]/ACN

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\* : n=4 متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.



شكل(4): <sup>a, b</sup>: كروماتوغرافي مركب التابلوزين 0.1ppm و <sup>c, d</sup>: كروماتوغرافي مركب السبيراميسين 0.1ppm عند درجتي حرارة 35°C, 40°C.

### The Optimal Flow for Mobile Phase

### التدفق الأمثل للطور المتحرك

تم في هذه المرحلة دراسة التدفق الأمثل للطور المتحرك؛ إذ جرى حقن محلول عياري لمركبي التابلوزين والسبيراميسين بتركيز 0.10ppm مترافقاً مع تغيير في تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C18) ضمن مجال تراوح بين 0.5-1m/min وتنشيط الشروط المثلى التي توصلت إليها الدراسة التجريبية السابقة أعلاه. يوضح الجدول (5) متوسط النتائج المخبرية التي تم الحصول عليها بغية الوصول إلى أفضل شروط فصل لمركبي التابلوزين والسبيراميسين. أظهرت النتائج المخبرية عدم تأثر مساحة قمة مركبي التابلوزين والسبيراميسين 0.10ppm بتغير تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي، وبالتالي عدم ظهور تغير ملحوظ في المساحات العائدة لقمة المركبين. يجب التنويه إلى أن زيادة تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي أثر تأثيراً إيجابياً في زمن تمليص مركب التابلوزين في العمود الكروماتوغرافي؛ إذ سُجل أعلى متوسط زمن احتفاظ  $R_t: 12.869\text{min}$  لمركب التابلوزين عند تدفق 0.5m/min وأدنى متوسط زمن احتفاظ  $R_t: 7.641\text{min}$  عند تدفق 1m/min للطور المتحرك بقمة مفصولة فصلاً جيداً كما هو موضح في الشكلين (5-a,b). لوحظ أيضاً التأثير الإيجابي لزيادة تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي في زمن تمليص مركب السبيراميسين في العمود الكروماتوغرافي؛ إذ سُجل أدنى متوسط زمن احتفاظ  $R_t: 5.896\text{min}$  لمركب السبيراميسين عند تدفق 1m/min للطور المتحرك بقمة مفصولة فصلاً جيداً كما هو موضح في الشكلين (5-c, d).

جدول (5): تأثير تدفق الطور المتحرك في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة القمة العائدة لمركبي التابلوزين والسبيراميسين.

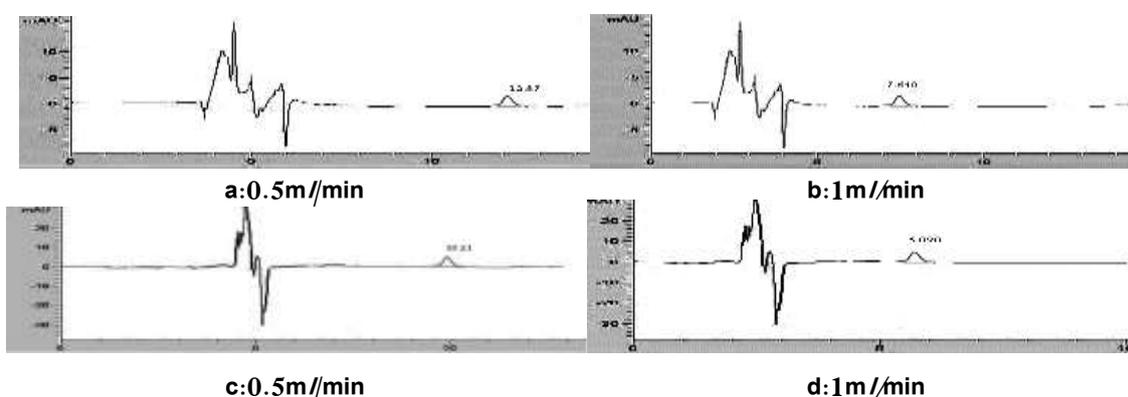
تدفق الطور المتحرك (m/min)	0.10ppm التابلوزين				0.10ppm السبيراميسين					
	مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ $R_t(\text{min})^* \pm \text{RSD}\%$				مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ $R_t(\text{min})^* \pm \text{RSD}\%$			
		حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
0.50	4.453	12.864	12.874	12.869	12.870	4.214	10.210	10.208	10.211	10.210
		12.869±0.032					10.210±0.012			
		12.869±0.006					10.210±0.002			

0.60	4.437	11.969	11.977	11.975	11.975	4.215	9.132	9.133	9.135	9.132
		11.974±0.029					9.133±0.015			
		11.974±0.005					9.133±0.002			
0.70	4.430	11.203	11.209	11.215	11.197	4.216	8.347	8.347	8.347	8.347
		11.206±0.069					8.347±0			
		11.206±0.011					8.347±0			
0.80	4.433	9.729	9.730	9.729	9.729	4.217	7.310	7.308	7.309	7.308
		9.729±0.005					7.309±0.013			
		9.729±0.0007					7.309±0.001			
0.90	4.430	8.874	8.874	8.871	8.874	4.216	6.741	6.741	6.740	6.741
		8.873±0.017					7.741±0.007			
		8.873±0.002					7.741±0.001			
1.0	4.435	7.641	7.640	7.642	7.640	4.215	5.898	5.896	5.895	5.895
		7.641±0.013					5.896±0.024			
		7.641±0.001					5.896±0.002			

T:40°C, Column (C18),  $\lambda_{ty}=280\text{nm}$ ,  $\lambda_{sp}=232\text{nm}$ ,  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})\text{pH}:2.4 / \text{ACN}(80:20\text{v})]/\text{ACN}$

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\* : n=4 متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز. \*\*\* حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.



شكل(5): كروماتوغرامات تأثير تدفق الطور المتحرك في قمتي مركبي التايلوزين (a, b) والسبيراميسين (c, d) 0.10ppm.

### Optimal Maximum Wavelength $\lambda_{max}$

### طول الموجة الأعظمي $\lambda_{max}$ الأمثل

تسمح تقانة جهاز HPLC-DAD المستخدمة في هذه الدراسة باختيار مجموعة من الأطوال الموجية ضمن مجال طيفي عريض لكاشف الـDAD. يوفر الكاشف إمكانية تحديد امتصاصية مركبي التايلوزين والسبيراميسين عند الأطوال الموجية المختارة في وقت واحد. اختبر المسح الطيفي لمركبي التايلوزين والسبيراميسين ضمن مجال طيفي تراوح بين 190-400nm، وقد لوحظ ظهور امتصاصية للمركبين عند الأطوال الموجية 210, 232, 280, 287,  $\lambda=320\text{nm}$ .

طبقت الشروط التحليلية المثلى السابقة الذكر التي تمّ التوصل إليها على تقانة HPLC-DAD في تحديد طول

الموجة الأعظمي لكل من المركبين. يوضح الشكل (6) كروماتوغرامات مركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm

على عمود الفصل (C18) باستخدام تقانة HPLC-DAD. يلاحظ من الجدول (6) أن متوسط زمن احتفاظ مركب التابولوزين عند الأطوال الموجية المختارة بلغ  $R_t: 7.642\text{min}$  بفارق زمني قدره  $0.008\text{min}$  بين أدنى وأعلى زمن احتفاظ عند الأطوال الموجية المختارة وبانحراف معياري نسبي مؤتي بلغ  $0.048\%$ . من جهة ثانية، بلغ متوسط زمن احتفاظ مركب السبيراميسين  $R_t: 5.898\text{min}$  بفارق زمني قدره  $0.003\text{min}$  بين أدنى وأعلى زمن احتفاظ عند الأطوال الموجية المختارة وبانحراف معياري نسبي مؤتي بلغ  $0.021\%$ . لوحظ أيضاً اختلاف استجابة الكاشف لمركبي التابولوزين والسبيراميسين عند الأطوال الموجية المختارة سواءً للقمم العائدة لكل من المركبين أو للقمم العائدة للطور المتحرك.

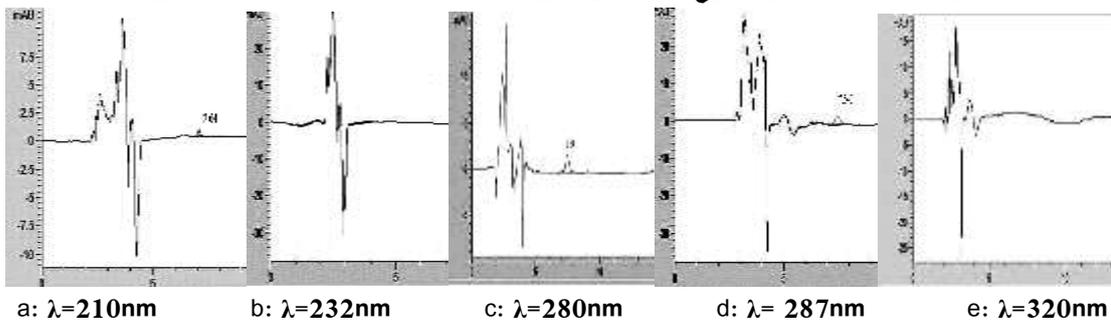
جدول (6): متوسط مساحة قمم مركبي التابولوزين والسبيراميسين بتركيز  $0.10\text{ppm}$  عند الأطوال الموجية المختارة.

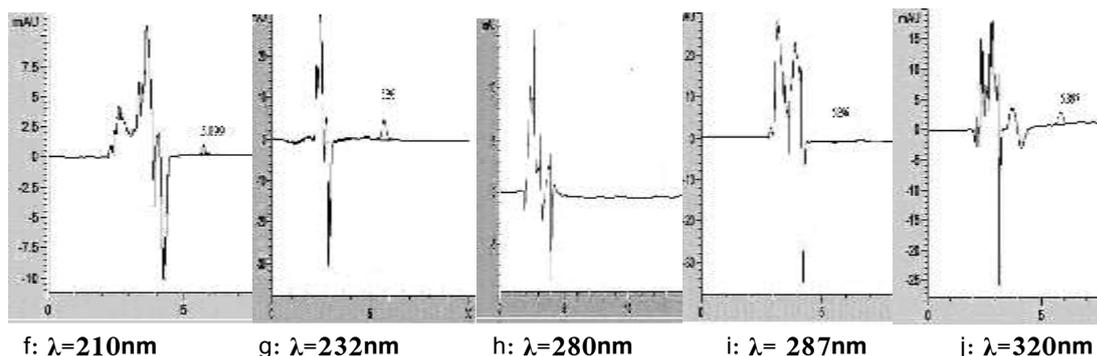
طول الموجة $\lambda(\text{nm})$	0.10ppm التابولوزين				0.10ppm السبيراميسين					
	زمن الاحتفاظ $t(\text{min})^*$	مساحة القمة $\text{Area}^{**} \pm \text{RSD}\%$				زمن الاحتفاظ $R_t(\text{min})^*$	مساحة القمة $\text{Area}^{**} \pm \text{RSD}\%$			
		$\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{***}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					$\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{***}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
210	7.640	0.958	0.961	0.965	0.963	5.899	1.01	1.01	1.0	1.013
		0.962±0.310					1.010±0.563			
		0.962±0.004					1.010±0.008			
232	7.648	-				5.898	4.214	4.215	4.210	4.212
		-					4.212±0.053			
		-					4.212±0.003			
280	7.641	4.429	4.435	4.433	4.432	-	-			
		4.432±0.056					-			
		4.432±0.003					-			
287	7.641	4.226	4.226	4.226	4.226	5.896	0.062	0.062	0.062	0.061
		4.226±0					0.062±0.810			
		4.226±0					0.062±0.0007			
320	-	-				5.898	3.833	3.834	3.836	3.836
		-					3.835±0.039			
		-					3.835±0.002			
Average RT: 7.642min, RSD%:0.048%					Average RT: 5.898min, RSD%:0.021%					
T:40°C, Column (C18), [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M)pH:2.4/ACN(80:20v\ v)]/ACN Flow:1ml/min										

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

\*\* n=4: متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.





f:  $\lambda=210\text{nm}$  g:  $\lambda=232\text{nm}$  h:  $\lambda=280\text{nm}$  i:  $\lambda=287\text{nm}$  j:  $\lambda=320\text{nm}$

كروماتوغرامات مركب

شكل (6): a, b, c, d, e: كروماتوغرامات مركب التابلوزين 0.10ppm.

السيبراميسين 0.10ppm.

اختلفت مساحة قمة كل من المركبين باختلاف طول الموجة المعتمد؛ إذ تراوح متوسط مساحات القمم بين 0-4.432 بانحراف معياري نسبي مئوي أقل بمجمعه من 0.5%. سُجلت امتصاصية أعظمية لمركبي التابلوزين والسيبراميسين عند طولي الموجة  $\lambda_{\text{max}}$ : 280nm و  $\lambda_{\text{max}}$ : 232nm على التوالي كما هو واضح في الجدول (6).

### الشروط المثلى لفصل مركبي التابلوزين والسيبراميسين باستخدام العمود الكروماتوغرافي (C8)

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

أجريت دراسة مخبرية عبر حقن كل من مركبي التابلوزين والسيبراميسين العيارين بتركيز 0.10ppm بغية تحديد تأثير نسب المزيج A:[ $\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})$  with De-ionized water pH:3.5/ACN(0:0v/v)] المستخدم في تركيب مزيج الطور المتحرك A مع ثبات في حجم المذيب B:[ACN] وذلك في زمن احتفاظ ومساحة القمتين الكروماتوغرافيتين لكل من المركبين المفصولين على العمود الكروماتوغرافي C8. استخدم برنامج التمليص الزمني المُتدرج لنسب المزيج A:[ $\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})$ ]pH:3.5/ACN(0:0v/v) ضمن العمود الكروماتوغرافي (C8-250x i.d 4.6mm,5 $\mu\text{m}$ ) الموافق لظهور القمتين الكروماتوغرافيتين للمركبين المدروسين وذلك في درجة حرارة فرن العمود 25°C وتدفق للطور المتحرك 0.8ml/min عند طولي الموجة 280,232nm لكل من مركبي التابلوزين والسيبراميسين على التوالي. يُلاحظ من الجدول (7) تأثير زمن احتفاظ ومساحة القمة الكروماتوغرافية العائدة لكل من المركبين بتغير نسب الأسيتونتريل مع المحلول الفوسفاتي المنظم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})$  الداخلة في تكوين الطور المتحرك A.

جدول(7): تأثير نسب الأسيتونتريل مع محلول المنظم الفوسفاتي في مزيج المحلول A في قمم مركبي التابلوزين والسيبراميسين.

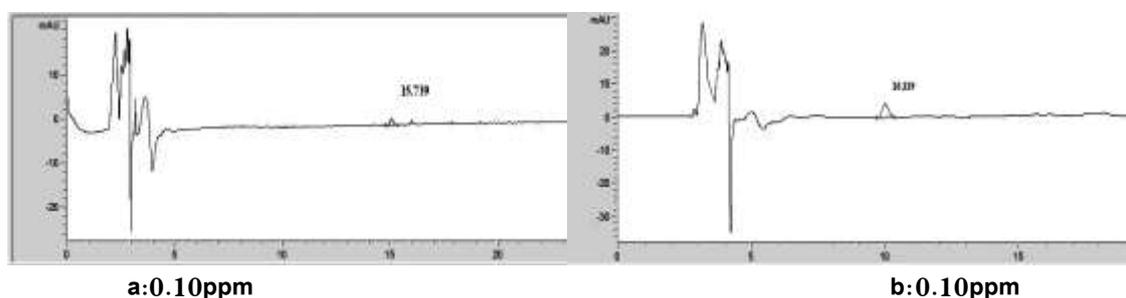
الطور المتحرك (Mobile phase)	التابلوزين 0.10ppm		السيبراميسين 0.10ppm	
	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** $\pm$ RSD%	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** $\pm$ RSD%
		$\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{***}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		$\bar{X} \pm \text{حد الثقة}^{***}$ $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})$ pH:3.5/ACN(30:70v/v)	-	-	-	-
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(0.04\text{M})$ pH:3.5/ACN(40:60v/v)	-	-	-	-

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(50:50v/v)	-	-				-	-			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(60:40v/v)	17.928	0.287	0.299	0.288	0.289	13.928	0.024	0.023	0.022	0.023
		0.291±1.912					0.023±3.55			
		0.291±0.008					0.023±0.001			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(70:30v/v)	17.928	0.522	0.523	0.522	0.521	12.972	0.581	0.583	0.581	0.585
		0.522±0.156					0.583±0.329			
		0.522±0.001					0.583±0.003			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) pH:3.5/ACN(80:20v/v)	15.739	0.871	0.869	0.869	0.870	10.339	2.652	2.664	2.675	2.657
		0.870±0.110					2.662±0.374			
		0.870±0.001					2.662±0.014			
T:25°C, Column (C8), λ <sub>ty</sub> =280nm, λ <sub>sp</sub> =232nm, Flow:0.8ml/min										

\* : متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\* : حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

\*\* : n=4 متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

شكل (7):<sup>a</sup> : كروماتوغرام قمة مركب التالوزين 0.10ppm و <sup>b</sup> : كروماتوغرام قمة مركب السبيراميسين 0.10ppmعند نسب الطور المتحرك A:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:3.5/ACN(80:20v/v)

لوحظ بدء ظهور قمة لكل من المركبين المدروسين عند استخدام نسبة 60% من محلول المنظم الفوسفاتي Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) الداخلة في تركيب الطور المتحرك A، وازدادت وضوحاً مع تزايد نسبته؛ إذ يوضح الجدول (7) والشكل (7) ظهور أفضل قمة لكل من مركبي التالوزين والسبيراميسين وفق النسب الآتية للطور المتحرك A وبتوسط مساحات قمة 0.870، 2.662 بانحراف معياري نسبي مؤتي % 0.11، 0.374 على التوالي.

### Optimal pH of Mobile Phase

### pH المثلى للطور المتحرك

أجريت دراسة مخبرية لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لمكون الطور المتحرك A. حُضِر لهذه الغاية محلول عياري لكل من مركبي التالوزين والسبيراميسين بتركيز 0.10ppm. أُستخدم حمض الفوسفور بغية ضبط pH وسط الطور المتحرك [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:3.5/ACN(80:20v/v)]؛ إذ جرى تغيير pH محلول المنظم الفوسفاتي ضمن مجال تراوح بين (2.2-5) مع تثبيت الإجراء السابق.

جدول(8): تأثير pH الطور المتحرك A في قيم مركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm.

pH	التايلوزين 0.10ppm				السبيراميسين 0.10ppm					
	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%				زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%			
		حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
2.2	10.658	5.776	5.776	5.778	5.777	7.640	5.925	5.924	5.924	5.925
		5.777±0.017					5.925±0.01			
		5.777±0.001					5.925±0.001			
2.4	10.658	5.778	5.778	5.778	5.779	7.640	5.925	5.925	5.925	5.924
		5.778±0.009					5.925±0.008			
		5.778±0.001					5.925±0.001			
2.6	11.995	4.573	4.573	4.573	4.573	8.137	5.121	5.121	5.121	5.121
		4.573±0					5.121±0			
		4.573±0					5.121±0			
2.8	13.893	3.873	3.873	3.873	3.873	8.655	4.672	4.676	4.673	4.673
		3.873±0					4.647±0.037			
		3.873±0					4.647±0.002			
3.0	14.759	2.744	2.767	2.716	2.722	9.247	3.980	3.980	3.980	3.980
		2.737±1.335					3.980±0			
		2.737±0.032					3.980±0			
3.2	15.133	1.377	1.364	1.370	1.370	9.763	3.565	3.564	3.566	3.566
		1.370±0.388					5.565±0.027			
		1.370±0.007					5.565±0.001			
3.4	15.486	0.911	0.904	0.911	0.911	10.012	2.878	2.881	2.879	2.879
		0.909±0.385					2.879±0.044			
		0.909±0.005					2.879±0.002			
3.5	15.739	0.874	0.877	0.879	0.875	10.339	2.662	2.658	2.654	2.660
		0.876±0.253					2.659±0.128			
		0.876±0.003					2.659±0.005			
3.6	15.822	0.842	0.840	0.838	0.840	10.876	2.529	2.525	2.520	2.520
		0.840±0.194					2.524±0.173			
		0.840±0.002					2.524±0.006			
3.8	16.040	0.822	0.831	0.829	0.826	11.563	2.367	2.299	2.315	2.354
		0.827±0.473					2.334±1.372			
		0.827±0.005					2.334±0.044			
4.0	16.506	0.764	0.766	0.764	0.766	12.010	1.895	1.881	1.888	1.876
		0.765±0.151					1.885±0.440			

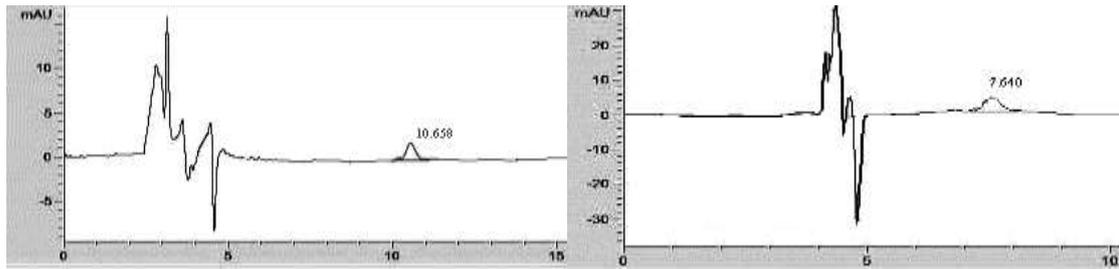
		0.765±0.002					1.885±0.012			
5.0	18.331	0.507	0.511	0.510	0.505	13.264	0.734	0.758	0.752	0.725
		0.508±0.542					0.742±2.071			
		0.508±0.004					0.742±0.021			
T:25°C, $\lambda_{ty}$ =280nm, $\lambda_{sp}$ =232nm, Flow:0.8m//min, [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M) /ACN(80:20v/v)]/ACN										

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

\*\* : n=4 متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

يظهر من نتائج الجدول (8) تأثير تغيرات pH وسط الطور المتحرك A على قمة مركب التابيلوزين والسبيراميسين وزمن احتفاظهما؛ إذ لوحظ تناقص في متوسط زمن احتفاظ المركبين المفصولين على عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بالتزامن مع زيادة حموضة وسط الطور المتحرك A، كما لوحظ زيادة في مساحة قمة كل من المركبين زيادة طردية بالتزامن مع زيادة حموضة وسط الطور المتحرك A، حيث سُجل أفضل متوسط زمن احتفاظ منوي 0.009% وأفضل مساحة قمة 5.778 لمركب التابيلوزين 0.10ppm عند pH:2.4 بانحراف معياري نسبي R<sub>t</sub>:10.658min. كما سُجل أفضل متوسط زمن احتفاظ R<sub>t</sub>:7.640min موافق لأفضل مساحة قمة 5.925 لمركب السبيراميسين 0.10ppm عند pH:2.4 بانحراف معياري نسبي منوي 0.008% كما هو موضح في الشكل(8).



a:0.10ppm

b:0.10ppm

شكل(8): <sup>a</sup>: كروماتوغرام قمة مركب التابيلوزين 0.10ppm و <sup>b</sup>: كروماتوغرام قمة مركب السبيراميسين 0.10ppm عند pH:2.4 للطور المتحرك A:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M) pH:2.4/ACN(80:20v/v)

### درجة الحرارة المثلى لفرن العمود الكروماتوغرافي

#### Optimal Temperature for Chromatographic Column oven

دُرُس تجريبياً تأثير درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي في متوسط زمن احتفاظ ومساحة قمة كل من مركبي التابيلوزين والسبيراميسين عند طولي موجة 280,232nm على التوالي، حيث جرى حقن محلول عياري لكل من المركبين بتركيز 0.10ppm في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C8)، مع تثبيت الإجراءات السابقين وبتدفق مقداره 0.8 m//min.

جدول (9): تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمة مركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm.

درجة حرارة العمود	التايلوزين 0.10ppm				السبيراميسين 0.10ppm					
	مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ Rt(min)* ± RSD%				مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ Rt(min)* ± RSD%			
		حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
25	5.778	10.658	10.658	10.658	10.658	5.925	7.640	7.640	7.640	7.640
		10.658±0					7.640±0			
		10.658±0					7.640±0			
30	5.778	10.576	10.571	10.577	10.577	5.924	7.340	7.340	7.338	7.339
		10.575±0.027					7.339±0.013			
		10.575±0.004					7.339±0.001			
35	5.777	10.184	10.181	10.186	10.188	5.926	6.953	6.954	6.955	6.954
		10.185±0.029					6.954±0.012			
		10.185±0.004					6.954±0.001			
40	5.778	9.615	9.615	9.615	9.616	5.925	6.409	6.408	6.408	6.408
		9.615±0.005					6.408±0.008			
		9.615±0.001					6.408±0.001			

Column(C8),  $\lambda_{ty}=280nm$ ,  $\lambda_{sp}=232nm$ , Flow:0.8ml/min,  
[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M)pH:2.4/ACN(80:20v/v)]/ACN

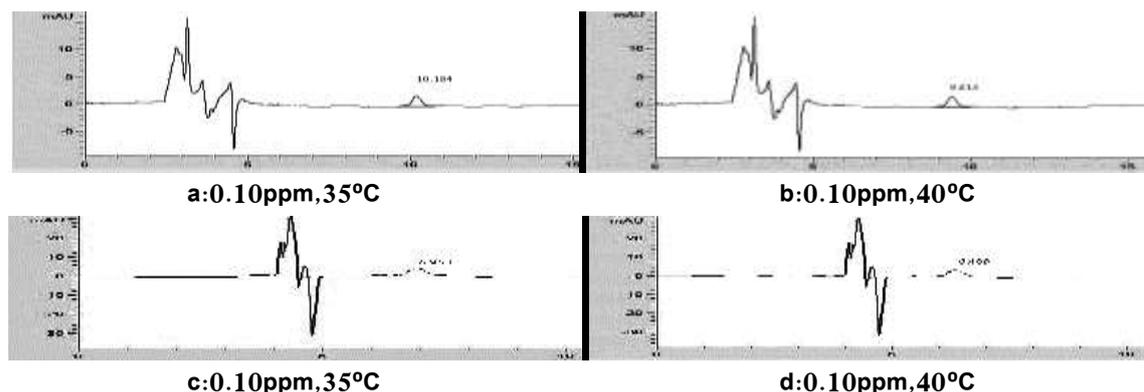
\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\* : n=4 متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

تم اختيار درجات حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي C8 ضمن المجال 25°C-40°C، يلاحظ من الجدول (9) عدم تغيير في مساحة القمم الكروماتوغرافية العائدة لكل من المركبين مع تغيير درجة حرارة فرن العمود، بينما طرأ تغيير طفيف على متوسط زمن الاحتفاظ العائد لهذه القمم، حيث انخفض زمن الاحتفاظ العائد لمركب التايلوزين 0.10ppm من Rt:10.658min في درجة حرارة 25°C إلى Rt:9.615min في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي 0.03% أقل من 0.03%. بينما انخفض متوسط زمن الاحتفاظ العائد لمركب السبيراميسين 0.10ppm من Rt:7.640min في درجة حرارة 25°C إلى Rt:6.408min في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي 0.02%.

لوحظ من الدراسة السابقة أن درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي تلعب دوراً ضعيفاً في عملية تمليص كل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين ومذيبات الطور المتحرك من العمود الكروماتوغرافي. يوضح الشكل (9) قمتين كروماتوغرافيتين لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين في درجتَي حرارة 40°C و 35°C.



شكل (9): <sup>a, b</sup>: كروماتوغرام قمة مركب التايلوزين 0.10 ppm و <sup>c, d</sup>: كروماتوغرام قمة مركب السبيراميسين 0.10 ppm عند درجتي حرارة 35, 40°C.

### The Optimal Flow for Mobile Phase

### التدفق الأمثل للطور المتحرك

تم في هذه المرحلة من الدراسة تحديد التدفق الأمثل للطور المتحرك عبر حقن محلول عياري لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين بتركيز 0.10 ppm في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C8) مترافقاً مع تغيير في تدفق الطور المتحرك ضمن مجال تراوح بين 0.5–1 m/min وتثبيت الشروط التحليلية المثلى السابقة الذكر أعلاه. يوضح الجدول (10) أن متوسط مساحات قمم مركب التايلوزين تراوح بين 5.749–5.759، وقد لوحظ أن لزيادة تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي أثراً إيجابياً في انخفاض زمن تمليص المركبين من العمود الكروماتوغرافي؛ إذ سُجل أفضل متوسط زمن احتفاظ  $R_t$ : 7.013 min لمركب التايلوزين عند تدفق 1 m/min للطور المتحرك وفق الشكل (10-b).

جدول (10): علاقة تدفق الطور المتحرك بمتوسط زمن الاحتفاظ ومساحة القمم العائدة لمركبي التايلوزين والسبيراميسين.

تدفق الطور المتحرك (m/min)	التايلوزين 0.10 ppm				السبيراميسين 0.10 ppm					
	مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ $R_t(\text{min})^* \pm \text{RSD}\%$				مساحة القمة Area**	زمن الاحتفاظ $R_t(\text{min})^* \pm \text{RSD}\%$			
		حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$					حد الثقة*** $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			
0.50	5.756	11.911	11.911	11.911	11.911	5.923	9.732	9.732	9.732	9.732
		11.911±0				9.732±0				
		11.911±0				9.732±0				
0.60	5.750	10.752	10.754	10.754	10.754	5.926	8.422	8.421	8.422	8.420
		10.753±0.009				8.421±0.011				
		10.753±0.001				8.433±0.001				
0.70	5.749	10.021	10.022	10.023	10.023	5.927	7.446	7.446	7.447	7.446
		10.022±0.001				7.446±0.007				
		10.022±0.001				7.446±0.001				
0.80	5.756	9.615	9.615	9.615	9.614	5.926	6.409	6.409	6.409	6.408
		9.615±0.005				6.409±0.007				
		9.615±0.001				6.409±0.001				
0.90	5.756	8.287	8.287	8.287	8.287	5.926	5.335	5.335	5.335	5.335
		8.287±0				5.335±0				
		8.287±0				5.335±0				

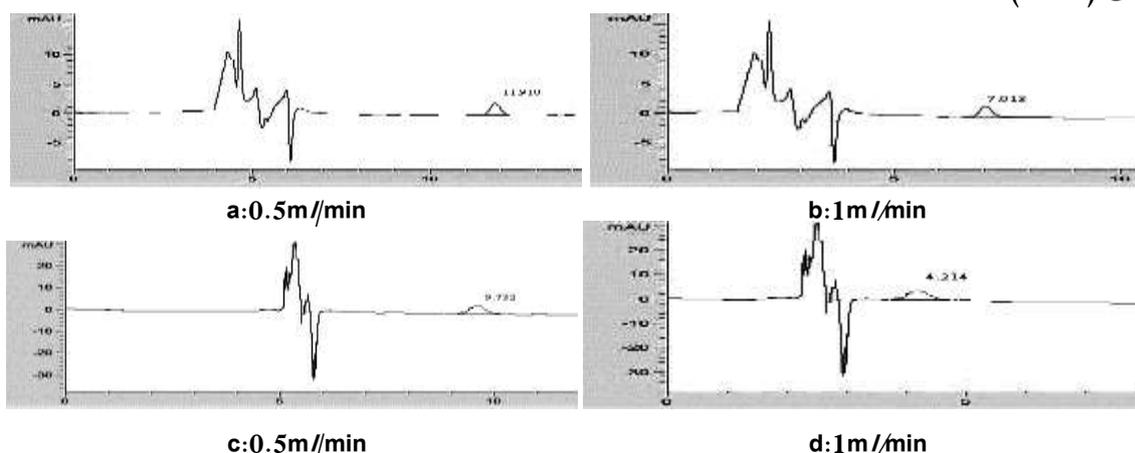
1.0	5.759	7.013	7.013	7.013	7.013	5.927	4.214	4.214	4.214	4.214
		7.013±0					4.214±0			
		7.013±0					4.214±0			
T:40°C, Column (C18), λ <sub>ty</sub> =280nm, λ <sub>sp</sub> =232nm, A [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M)pH:2.4 /ACN(80:20v/v)]/ACN										

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

\*\*n=4: متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

تراوح متوسط مساحات قمم مركب السبيراميسين بين 5.923-5.927، وقد لوحظ أن لزيادة تدفق الطور المتحرك في العمود الكروماتوغرافي أثراً إيجابياً في زمن تمليصه من العمود الكروماتوغرافي؛ إذ سُجّل أفضل متوسط زمن احتفاظ R<sub>t</sub>:4.214min عند تدفق 1ml/min للطور المتحرك بقمة مفصولة فصلاً جيداً كما هو موضح في الشكل (10-d).



شكل (10): a, b: كروماتوغرام قمة مركب التايلوزين 0.10ppm و c, d: كروماتوغرام قمة مركب السبيراميسين 0.10ppm عند تدفق 0.5, 1ml/min

### Optimal Maximum Wavelength λ<sub>max</sub>

### طول الموجة الأعظمي λ<sub>max</sub> الأمثل

تمّ اعتماد الأطوال الموجية λ=210, 232, 280, 287, 320nm بغية تحديد طول الموجة الأعظمي الأمثل الموافق لفصل كل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق تقانة HPLC-DAD؛ إذ جرى حقن محلول عياري لكل من المركبين بتركيز 0.10ppm في العمود الكروماتوغرافي C8 بتدفق 1ml/min ونسب مزج للطور المتحرك A::[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M)pH:2.4/ACN(80:20v/v)]/B:CAN(40v) عند درجة حرارة فرن العمود 40°C، يوضح الجدول (11) نتائج متوسط مساحات قمم مركبي التايلوزين والسبيراميسين وزمن الاحتفاظ عند الأطوال الموجية المختارة لكل منهما.

جدول (11): متوسط مساحة قمم مركبي التايلوزين والسبيراميسين بتركيز 0.10ppm عند الأطوال الموجية المختارة.

طول الموجة λ(nm)	التايلوزين 0.10ppm		السبيراميسين 0.10ppm	
	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	مساحة القمة Area** ± RSD%	حد الثقة ± $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$ ***	زمن الاحتفاظ Rt(min)*
				حد الثقة ± $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$ ***

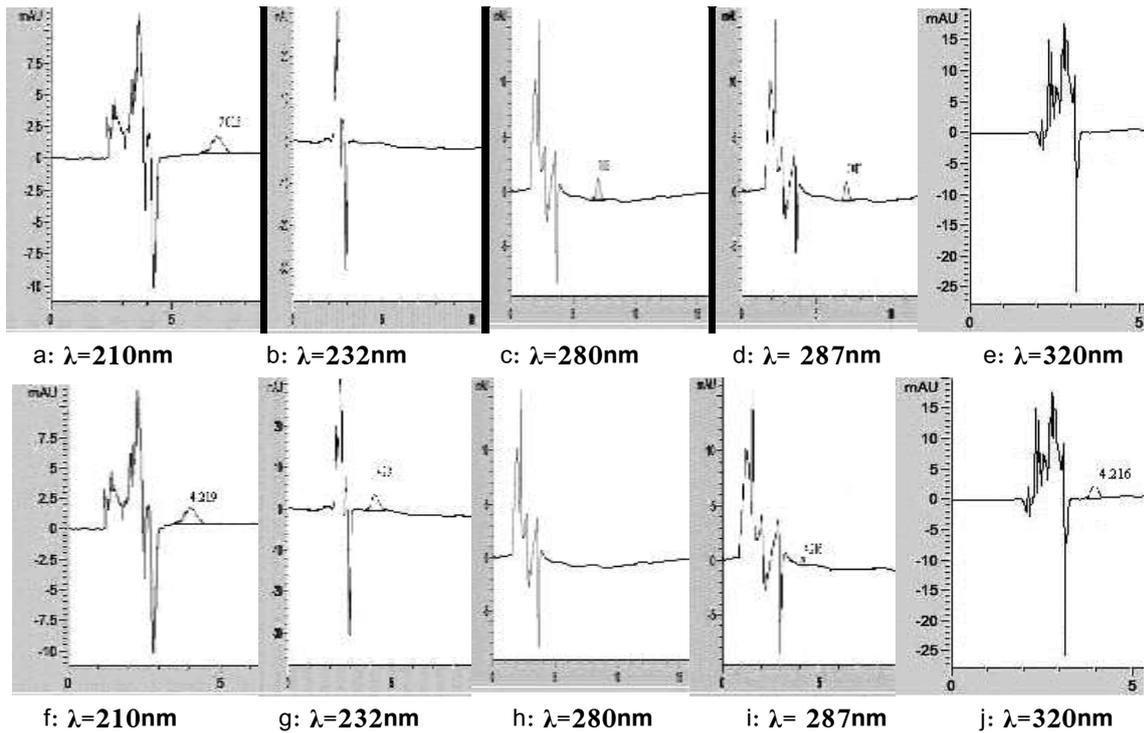
210	7.015	1.261	1.261	1.261	1.261	4.219	1.364	1.364	1.364	1.364	
		1.261±0					1.364±0				
		1.261±0					1.364±0				
232	-	-				4.214	5.927	5.927	5.927	5.927	
		-					5.927±0				
		-					5.927±0				
280	7.013	5.758	5.759	5.759	5.759	-	-				
		5.759±0.010					-				
		5.759±0.001					-				
287	7.017	4.983	4.983	4.983	4.983	4.216	0.074	0.072	0.074	0.074	
		4.984±0.020					0.074±1.360				
		4.984±0.001					0.074±0.001				
320	-	-				4.216	4.678	4.678	4.679	4.679	
		-					4.679±0.012				
		-					4.679±0.001				
Average RT: 7.015min, RSD%:0.029						Average RT: 4.216min, RSD%:0.049					
T:40°C, Column (C8), A [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M)pH:2.4 /ACN(80:20v/v)]/ACN Flow:1m/min											

\*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

\*\*\*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%. \*\*n=4: متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

يلاحظ من الجدول (11) أن متوسط زمن احتفاظ كل من مركبي التالوزين والسبيراميسين 0.10ppm وفق الأطوال الموجية المختارة بلغ  $R_t$ : 7.015, 4.216min على التوالي. اختلفت مساحة قمة كل من المركبين باختلاف طول الموجة المعتمد؛ إذ سُجّلت أعلى مساحة قمة 5.759, 5.927 لكل من مركبي التالوزين والسبيراميسين على التوالي عند طولي الموجة 280, 232nm  $\lambda_{max}$ : على التوالي أيضاً؛ إذ تراوح متوسط مساحات القمم العائدة لمركب التالوزين بين 1.261-5.759 بانحراف معياري نسبي مؤني أقل بمجمله من 0.03% عند متوسط زمن احتفاظ 7.015min، بينما كان متوسط مساحات القمم العائدة لمركب السبيراميسين ضمن المجال 1.364-5.927 بانحراف معياري نسبي مؤني أقل بمجمله من 1.5% عند متوسط زمن احتفاظ 4.216min.

يوضح الشكل (11) كروماتوغرامات فصل مركبي التالوزين والسبيراميسين 0.10ppm على عمود الفصل الكروماتوغرافي (C8) عند الأطوال الموجية 210, 232, 280, 287, 320nm باستخدام تقانة HPLC-DAD.



شكل (11): كروماتوغرامات قمم مركب التاليزولين و كروماتوغرامات قمم مركب السبيراميسين بتركيز 0.1ppm عند الأطوال الموجية المختارة.

**الشروط المثلى لفصل مركبي التاليزولين والسبيراميسين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين (C8,**

**C18) وفق تقانة HPLC-DAD**

يلاحظ من الجدول (12) وبعد تحديد الشروط المثلى التي تمّ التوصل إليها وفق هذه الدراسة إمكانية تخفيض الفترة الزمنية لتدرج نسب الطور المتحرك في المرحلتين الأخيرتين من البرنامج الزمني من 30, 35min إلى 10, 12min كافية للحصول على القمم الكروماتوغرافية لفصل مركبي التاليزولين والسبيراميسين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين (C8, C18) باستخدام تقانة HPLC-DAD وفق الآتي.

جدول(12): الشروط التحليلية المثلى لفصل مركبي التاليزولين والسبيراميسين وفق تقانة HPLC-DAD المترتبة عن هذه الدراسة.

الشروط المثلى		التاليزولين 0.10ppm				السبيراميسين 0.10ppm			
		C18		C8		C18		C8	
		مساحة القمة	R <sub>t</sub> (min)	مساحة القمة	R <sub>t</sub> (min)	مساحة القمة	R <sub>t</sub> (min)	مساحة القمة	R <sub>t</sub> (min)
نسب الطور المتحرك	A[Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.04M)/ACN(80:20v/v)]/B(ACN)								
pH الطور المتحرك	2.4								
درجة الحرارة	40°C								
تدفق الطور المتحرك	1m/min								
طول الموجة الأمثل	$\lambda_{\max_{ty}}=280nm$ $\lambda_{\max_{sp}}=232nm$								
البرنامج الزمني لتدرج نسب الطور المتحرك وفق التمليص المتدرج Gradient elution		الزمن (min)		A		B			
		0.01		100		0			
		0.5		60		40			

	10	60	40
	12	100	0

يبين الجدول (12) أفضلية استخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي (C8) على مثيله C18 في فصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق تقانة HPLC-DAD وذلك من حيث مساحة القمة من جهة وزمن الاحتفاظ من جهة ثانية.

### دراسة تكرارية فصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق تقانة HPLC-DAD

طبقت تكرارية فصل مركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق الشروط التحليلية المثلى السابقة الذكر في الجدول (12)، إذ جرى حقن سلسلة محاليل عيارية بتركيز 0.010, 0.10, 1.0ppm في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C8). يوضح جدول (13) نتائج التكرارية التي كانت متطابقة لجهة فصل المركبين المدروسين. بلغ متوسط مساحة قمة مركب التايلوزين 0.010, 0.10, 1.0ppm (0.526, 5.258, 52.569) بانحراف معياري نسبي مؤني 0.010, 0.10, 0.001% على التوالي، في حين بلغ متوسط مساحة قمة مركب السبيراميسين 0.010, 0.10, 1.0ppm (0.593, 5.927, 59.265) بانحراف معياري نسبي مؤني 0.0710, 0.11, 0.001% على التوالي.

جدول(13): متوسط تكرارية تحديد مركبي التايلوزين والسبيراميسين.

المركب	التركيز (ppm)	متوسط مساحة القمة Area± RSD%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
التايلوزين	0.010	0.526±0.128	0.526	0.526	0.526	0.526	0.526	0.524	0.526	0.526	0.525	0.526
	0.10	5.258±0.011	5.258	5.258	5.259	5.259	5.258	5.257	5.258	5.258	5.258	5.258
	1.0	52.569±0.001	52.570	52.569	52.569	52.571	52.569	52.569	52.569	52.569	52.569	52.569
السبيراميسين	0.010	0.593±0.071	0.593	0.593	0.593	0.593	0.593	0.592	0.593	0.593	0.592	0.593
	0.10	5.927±0.11	5.927	5.927	5.927	5.927	5.926	5.925	5.927	5.927	5.927	5.927
	1.0	59.265±0.001	59.266	59.265	59.265	59.266	59.265	59.265	59.265	59.265	59.265	59.265

\*: n=10 تكرارية حقن المحلول العياري لمركبي التايلوزين والسبيراميسين

### the Calibration Curve

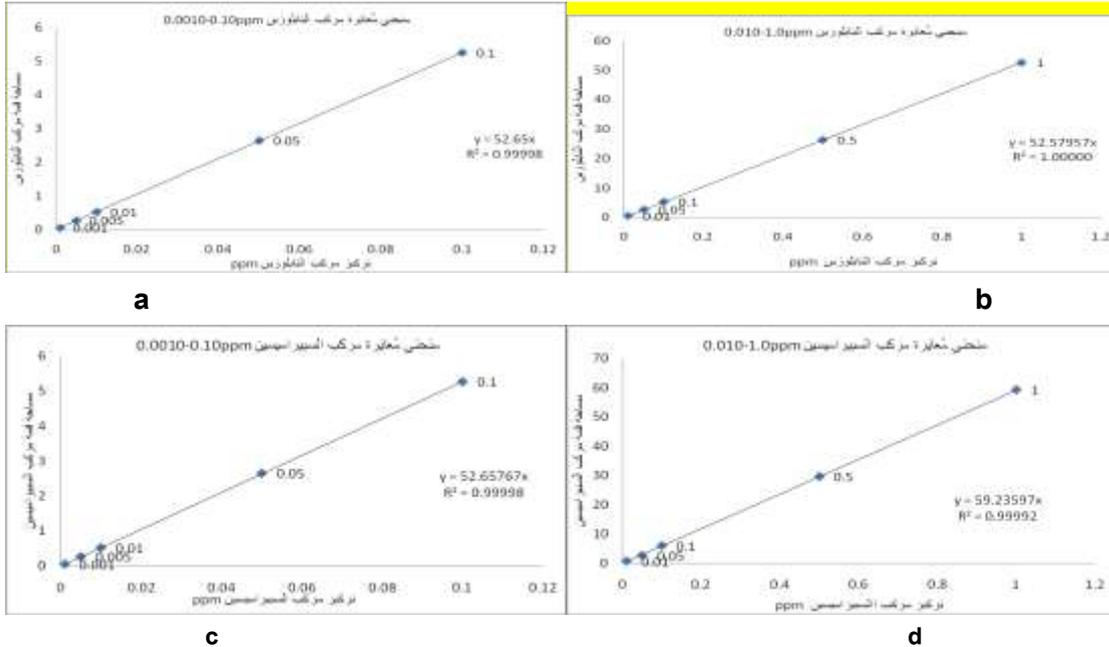
### منحني المعايرة

تم إنشاء منحني معايرة لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق طريقة المعيار الخارجي External Standard عند تراكيز مختلفة للصادين الماكروليدين، درست خطية المنحني العياري لمركبي التايلوزين والسبيراميسين عند طولي الموجة  $\lambda_{max}=280nm$ ,  $\lambda_{max}=232nm$  على التوالي باستخدام سلسلة تراكيز متدرجة من المحاليل العيارية 0.0010, 0.0050, 0.010, 0.050, 0.10, 0.50, 1.0ppm لكل مركب من المركبين. جرى حقن 20µl من كل محلول عياري لكل مركب في عمود الفصل الكروماتوغرافي C8، وتم رسم منحني المعايرة لكل منهما اعتماداً على تابعة مساحة القمة (Y) بدلالة التركيز (X)، يوضح الجدول (14) مساحات القمم عند التراكيز السابقة الذكر وزمن احتفاظ  $R_t:7.016$ ,  $R_t:4.216min$  لمركبي التايلوزين والسبيراميسين على التوالي، تميز منحني المعايرة لمركب التايلوزين بخطية جيدة ضمن مجال 0.0010-0.10ppm, 0.010-1.0ppm وبمعامل الارتباط  $R^2=0.99998$ , 1.0 correlation coefficient وكذلك منحني معايرة مركب السبيراميسين ضمن المجالين السابقين الذكر وبمعامل الارتباط  $R^2=0.99998$ , 0.99992 كما هو موضح في الشكل (12).

جدول(14): مساحات قمم مركبي التايلوزين والسبيراميسين الموافقة لتراكيز تراوحت بين 0.0010- 0.10ppm.

0.0010	0.0050	0.010	0.050	0.10	0.50	1.0	التركيز (ppm)
0.0537	0.2684	0.526	2.648	5.258	26.309	52.569	مساحة قمة التايلوزين*
0.0584	0.299	0.593	2.504	5.927	29.605	59.265	مساحة قمة السبيراميسين*

\*: n=4 تكرارية مساحة القمة لكل تركيز من تراكيز المحاليل العيانية لمركبي التايلوزين والسبيراميسين.



<sup>a,b</sup>: منحنى معايرة مركب التايلوزين بين 0.0010-0.10ppm و 0.010-1.0ppm.

<sup>c,d</sup>: منحنى معايرة مركب السبيراميسين بين 0.0010-0.10ppm و 0.010-1.0ppm.

الشكل (12): منحنيات المعايرة لمركبي التايلوزين والسبيراميسين ضمن مجال 0.0010-1.0ppm.

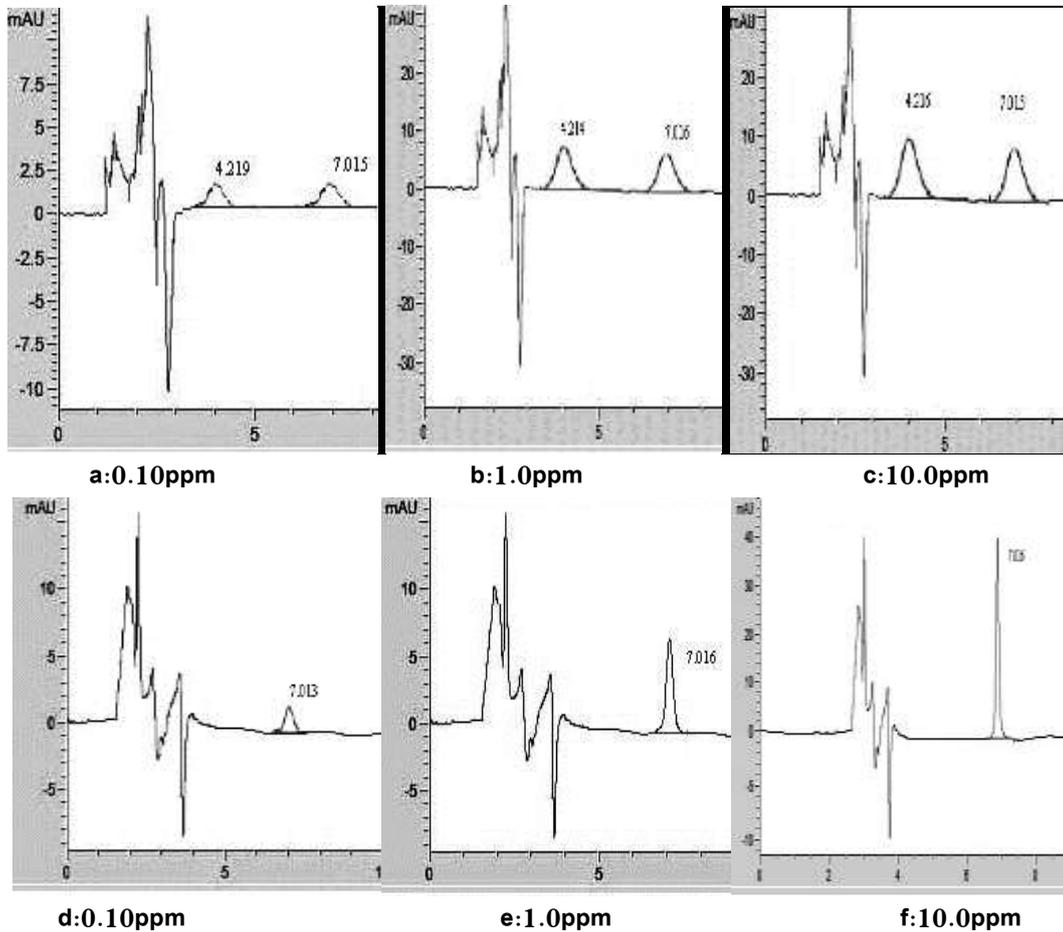
يلاحظ من الجدول (11) ظهور قمة لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين عند طول الموجة 210nm، لذا أجريت دراسة عبر حقن حقنة واحدة تحتوي على تركيز محدد للمركبين معاً وفق التراكيز 0.10, 1.0, 10.0ppm عند الأطوال الموجية 210, 232, 280nm باستخدام برنامج زمني واحد. يوضح الجدول (15) والشكل (13) إمكانية فصل المركبين معاً عند طول الموجة 210nm وفق نسبة استرجاع تراوحت بين 22.954 - 23.962% لمركب التايلوزين و 22.758 - 23.138% لمركب السبيراميسين، وهي نسبة أخفض بـ 4 مرات بالمقارنة مع نسبة استرجاع أكبر من 99% والمُسجلة للمركبين نفسيهما عند الفصل باستخدام طولي الموجة 280, 232nm، مما يعني أفضلية فصل كل مركب على حدة بغية الحصول على نسبة استرجاع مثالية.

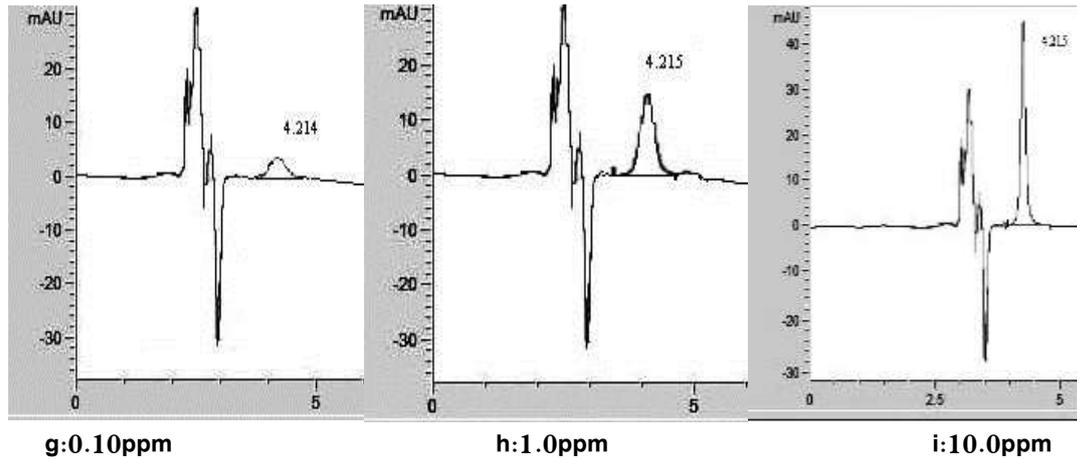
جدول (15): متوسطات مساحات القمم ونسب استرجاع مركبي التايلوزين والسبيراميسين عند الأطوال الموجية 210, 232, 280nm.

طول الموجة (nm) $\lambda$	التايلوزين			السبيراميسين		
	مساحة القمة Area* $\pm$ RSD%			مساحة القمة Area* $\pm$ RSD%		
	Rec%** نسبة الاسترجاع			Rec%** نسبة الاسترجاع		
التركيز	0.10ppm	1.0ppm	10.0ppm	0.10ppm	1.0ppm	10.0ppm
210	1.361 $\pm$ 0.153	12.597 $\pm$ 0.020	120.652 $\pm$ 0.008	1.364 $\pm$ 0.274	13.488 $\pm$ 0.060	136.574 $\pm$ 0.006
	22.954	23.962	23.177	23.013	22.758	23.138
232	-			5.927 $\pm$ 0.052	59.227 $\pm$ 0.010	586.965 $\pm$ 0.001
				99.996	99.935	99.441
280	5.897 $\pm$ 0.074	52.126 $\pm$ 0.008	515.772 $\pm$ 0.004	-		
	99.498	99.157	99.078			

T:40°C, Column (C8), A [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.04M)pH:2.4 /ACN(80:20v/v)]/ACN Flow:1m/min

\*: n=4 متوسط مساحة المركب لأربع مكررات. \*\*: متوسط النسبة المئوية لمردود استرجاع المركب لأربع مكررات.





شكل (13):<sup>a, b, c</sup>: كروماتوغرامات مركبي التايلوزين والسيبراميسين عند طول الموجة 220nm.  
<sup>d, e, f</sup>: كروماتوغرامات مركب التايلوزين عند طول الموجة 280nm.  
<sup>g, h, i</sup>: كروماتوغرامات مركب السيبراميسين عند طول الموجة 232nm.

### الاستنتاجات والتوصيات:

- تُعد هذه الدراسة من الدراسات الأكاديمية والتطبيقية في مجال الكيمياء التحليلية كونها تهدف إلى تحديد الشروط المثلى الضرورية لتحديد النزر المتبقي من الصادات الماكروليدية المُستخدمة كمُحفزات نمو وفي مُعالجة بعض الأمراض عند الكائنات الحية ذات المنشأ الحيواني ومنتجاتها الغذائية المُختلفة المُستخدمة في التغذية البشرية.
- تُظهر هذه الدراسة كما هو موضح في الجدول (12) أفضل زمن احتفاظ لمركبي التايلوزين والسيبراميسين 7.013, 4.214min على التوالي عند التركيز 0.10ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بالمقارنة مع أفضل زمن احتفاظ 7.641, 5.898min على التوالي عند التركيز 0.10ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C18.
- تُبين هذه الدراسة كما هو موضح في الجدول (12) مساحة أفضل قمة لمركبي التايلوزين والسيبراميسين 5.759, 5.927 على التوالي الموافقة لتركيز 0.10ppm باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 بالمقارنة مع أفضل مساحة قمة 4.432, 4.212 على التوالي الموافقة للتركيز نفسه باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C18.
- لوحظ من نتائج الجدولين (8, 3) تأثير pH الطور المتحرك في فعالية فصل مركبي التايلوزين والسيبراميسين في كلا العمودين الكروماتوغرافيين.
- يتمتع العمود الكروماتوغرافي C18 بقطبية ضعيفة وأكثر كرهاً للماء، بالمُقارنة مع عمود C8 الذي يتمتع بقطبية متوسطة، علاوةً على ذلك يمتلك العمود C8 سلسلة كربونية أقصر من C18 مما يعطي C8 أفضلية على C18 من حيث إمكانية الفصل الأفضل وزمن الاحتفاظ الأقصر، خاصة عند استخدام طور متحرك من الأسيتونتريل الذي يُعد من المُذيبات المتوسطة إلى عالية القطبية والتي تمنحه القدرة على تمليص المركبين المدروسين اللذين يتمتعان أيضاً بالقطبية نظراً لامتلاكهما لزمير  $CH_3$  و  $OH$  في بنية كل منهما.
- سجّلت نسبة الاسترجاع عند فصل مركبي التايلوزين والسيبراميسين معاً عند طول الموجة 210nm وفق تقانة HPLC-DAD نسبة ضعيفة أقل بأربع مرات بالمقارنة مع نسبة الاسترجاع التي تمّ التوصل إليها عند فصل مركبي

التايلوزين والسبيراميسين كل على حدة عند طولي الموجة 280, 232nm كما هو موضح في الجدول (15) والشكل (13).

• تمّ اعتماداً على الشروط المثلى المترتبة عن هذه الدراسة الحصول على فصل واضح لمركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق تقانة HPLC-DAD، وعلى منحني عياري تميز بخطية جيدة لكل من المركبين ضمن مجال من التراكيز تراوح بين 1-100ppb  $\approx$  0.0010-0.10ppm عند طولي الموجة  $\lambda_{max}=280, 232nm$  على التوالي.

### المراجع:

- [1] BERRADA, H. BORRULL, F. FONT, G. MOLTÒ, J. C. MARCÈ, R, M. *Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC.* Journal of Chromatography A 1157, 2007, 281-288.
- [2] Leal, C. Codony, R. Compano, R. GranadosM. Dolors, M. P. *Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography.* Journal of Chromatography A 910, 2001, 285-290.
- [3] CODONY, R. COMPANO, R. GRANADOS, M. GARCIA-REGUEIRO, A, J. PRAT, M, D. *Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry.* Journal of Chromatography A 959, 2002, 131-141.
- [4] BERRADA, H. BORRULL, F. FONT, G. MARCÈ, R, M. *Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry.* Journal of Chromatography A 1208, 2008, 83-89.
- [5] PRATS, C. FRANCESCH, R. ARBOIX, M. PÉREZ, B. *Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography B 766, 2001, 57-65.
- [6] GONZALEZ DE LA HUEBRA, M, J. VINCENT, U. *Review Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39, 2005, 376-398.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] CIVITAREALE, C. FIORI, M. BALLERINI, A. BRAMBILLA, G. *Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36, 2004, 317-325.
- [11] GONZALEZ DE LA HUEBRA, M, J. BORDIN, G. RODRIGUEZ, A, R. A. *multiresidue method for the simultaneous determination of ten macrolide antibiotics in human urine based on gradient elution liquid chromatography coupled to coulometric detection (HPLC-ECD).* Analytica Chimica Acta 517, 2004, 53-63.