

این مطلب توسط www.4800.blogfa.com تهیه شده است. استفاده از آن با ذکر منبع مجاز است.

در این آموزش سعی شد با بیان ساده و شرح کاربردی مطالب و بررسی یک مثال به صورت مرحله به مرحله نحوه کار با دستگاه HPLC آموزش داده شود.

آموزش کار با دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC)

تعیین مقدار ماده موثر یک ترکیب با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

در ابتدا باید یک روش کار معتبر در دسترس باشد. برای ترکیبات دارویی و زیر مجموعه های آن ها روش کارهایی تحت عنوان فارماکوپه وجود دارد و یا در مورد ترکیبات مربوط به صنایع غذایی ، خوراکی و غیره نیز منابع معتبری در دسترس می باشد. گاهی هم روش معتبر آنالیز یک ماده با خرید محموله یا نمونه ، از شرکت تولید کننده آن ماده درخواست میشود. به هر حال مرحله اول کار داشتن یک روش و دستور کار معتبر و مناسب است. اگر روش کاری در دسترس نباشد کار کمی مشکل تر می شود و نیاز به تجربه و مهارت و همچنین تحقیق در مورد ترکیب مورد نظر ، دستگاهوری و روش های آنالیزی و ... می باشد که خود شرح مفصلی دارد. فرض می کنیم که یک روش معتبر در دسترس داریم. به طور مثال :

تعیین مقدار ماده موثر ترکیب دارویی سفتریاکسون با استفاده از روش کروماتوگرافی و دستگاه HPLC

این روش بر اساس روش ارائه شده در فارماکوپه (USP) می باشد. (دانلود روش به صورت کامل به زبان انگلیسی)

<http://4800.blogfa.com/post-126.aspx>

روش را به زبان انگلیسی مشاهده کنید تا به توضیح و شرح آن بپردازیم. هر قسمت با فاصله جدا شده است تا بررسی و توضیح داده شود.

Assay—

pH7.0buffer— Dissolve 13.6g of dibasic potassium phosphate and 4.0g of monobasic potassium phosphate in water to obtain 1000mLof solution.Adjust this solution with phosphoric acid or 10N potassium hydroxide to a pHof 7.0±0.1.

pH5.0buffer— Dissolve 25.8g of sodium citrate in 500mLof water,adjust with citric acid solution (1in 5)to a pHof 5.0±0.1,and dilute with water to a volume of 1000mL.

Mobile phase— Dissolve 3.2g of tetraheptyl ammonium bromide in 400mLof acetonitrile,add 44mLof pH7.0bufferand 4mLof pH5.0buffer,and add water to make 1000mL.Filter through a membrane filter of 0.5µm or finer porosity,and degas.Make adjustments if necessary (see System Suitabilityunder Chromatography á621ñ).

Standard preparation— Dissolve an accurately weighed quantity of USP Ceftriaxone Sodium RS in Mobile phase, to obtain a solution having a known concentration of about 0.2 mg per mL. Use this solution promptly after preparation.

Resolution solution— Dissolve a suitable quantity of USP Ceftriaxone Sodium E-Isomer RS in Standard preparation, and dilute with Mobile phase to obtain a solution containing about 160 µg of USP Ceftriaxone Sodium E-Isomer RS per mL and 160 µg of USP Ceftriaxone Sodium RS per mL. Use this solution promptly after preparation.

Assay preparation— Transfer about 40 mg of Ceftriaxone Sodium, accurately weighed, to a 200-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with Mobile phase to volume, and mix. Use this solution promptly after preparation.

Chromatographic system (see Chromatography 621f)—The liquid chromatograph is equipped with a 270-nm detector and a 4.0-mm × 15-cm column that contains 5-µm packing L1. The flow rate is about 2 mL per minute. Chromatograph the Resolution solution, and record the peak responses as directed under Procedure: the resolution, R, between the ceftriaxone E-isomer and ceftriaxone peaks is not less than 3. Chromatograph the Standard preparation, and record the peak responses as directed under Procedure: the column efficiency determined from the analyte peak is not less than 1500 theoretical plates, the tailing factor for the analyte peak is not more than 2, and the relative standard deviation for replicate injections is not more than 2%.

Procedure— Separately inject equal volumes (about 20 µL) of the Standard preparation and the Assay preparation into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the responses for the major peaks. Calculate the quantity, in µg, of ceftriaxone (C₁₈H₁₈N₈O₇S₃) per mg of the Ceftriaxone Sodium taken by the formula:

$$200(CP/W)(r_u/r_s),$$

in which C is the concentration, in mg per mL, of USP Ceftriaxone Sodium RS in the Standard preparation, P is the designated potency, in µg of ceftriaxone per mg, of USP Ceftriaxone Sodium RS, W is the quantity, in mg, of the Ceftriaxone Sodium taken to prepare the Assay preparation, and r_u and r_s are the ceftriaxone peak responses obtained from the Assay preparation and the Standard preparation, respectively.

همان طور که در روش می بینید باید شش محلول تهیه کنیم: بافر pH7، بافر pH5، فاز متحرک، محلول استاندارد و محلول رزولوشن، محلول نمونه

بافر pH7

برای تهیه بافر pH7، طبق روش مقدار ۱۳.۶ گرم دی بازیک پتاسیم فسفات و ۴ گرم مونوبازیک پتاسیم فسفات را وزن کنید و در ۱۰۰۰ میلی لیتر اب مقطر حل کنید و سپس با استفاده از دستگاه pH متر و با اسید فسفریک یا پتاسیم هیدروکساید ۱۰ نرمال، pH محلول را به ۷ برسانید. (اگر پس از حل کردن دو ماده فوق، pH محلول کمتر از ۷ بود پتاسیم هیدروکساید را قطره قطره اضافه کنید تا pH به ۷ برسد و اگر بالاتر از ۷ بود از اسید فسفریک برای تنظیم استفاده کنید.)

بافر pH5

بافر pH5 را نیز مطابق روش ذکر شده تهیه کنید. (مشابه بافر pH7 می باشد با کمی تغییر)

فاز متحرک

برای تهیه فاز متحرک طبق روش مقدار ۳.۲ گرم از تتراهیپتیل آمونیوم بروماید را وزن کنید و در ۴۰۰ میلی لیتر استونیتریل حل کنید و سپس ۴۴ میلی لیتر از محلول بافر pH7 و ۴ میلی لیتر از محلول بافر pH5 که در بالا تهیه کردید اضافه کنید و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. سپس محلول حاصل را از فیلتر مخصوص 0.5 µm عبور داده و خوب مخلوط و همگن کنید.

محلول هایی که وارد دستگاه کروماتوگرافی می شوند باید عاری از مواد ذائذ و حل نشده باشد چرا که باعث تخریب دستگاه و ستون ، گرفتگی مسیرها و مشکل در هنگام کار با دستگاه می شوند. بنابراین معمولا محلول ها را قبل از ورود به دستگاه فیلتر و همگن می کنند. (معمولا از فیلتر خلع برای فیلتر کردن و دستگاه سونیکیت برای همگن سازی استفاده می شود.)

فاز متحرک طوری انتخاب و تهیه میشود که در طول موج مورد نظر جذب قوی نداشته باشد و در عین حال به خوبی ماده مورد نظر در آن حل شود ، مناسب با دستگاه و ستون مورد استفاده باشد ، برهمکنشی با ماده یا پرکننده های ستون نداشته باشد ، باعث تخریب و یا خوردگی ستون و دستگاه نشود ، در دسترس و مقدور به صرفه باشد و ...

برخی از حلال های عمومی که به عنوان فاز متحرک در دستگاههای گروماتوگرافی مایع (دستگاه HPLC) استفاده می شود عبارتند از : اب مقطر ، متانول ، استونیتریل ، تترا هیدروکلرو فوران (THF) ، کلروفرم و گاهی مخلوطی از نسبت های متفاوت از این حلال ها استفاده می شود.

محلول استاندارد

برای تهیه استاندارد طبق روش باید محلول ۰.۲ میلی گرم در میلی لیتر از ماده استاندارد سفتریاکسون سدیم تهیه شود و از محلول فاز متحرک به عنوان حلال استفاده شود.

ماده USP Ceftriaxone Sodium RS در واقع ماده استاندارد سفتریاکسون سدیم بر اساس فارماکوپه USP می باشد که تحت همین نام موجود است و خریداری می شود. به دلیل قیمت بالای این استاندارد ها ، گاهی برای صرفه جویی در هزینه ها از استاندارد های ثانویه به جای استاندارد USP استفاده می شود که مستلزم برآورده شدن شرایطی است که خود بحث مفصل است.

باید محلولی تهیه کنیم که در هر یک میلی لیتر آن مقدار ۰.۲ میلی گرم از استاندارد سفتریاکسون سدیم داشته باشد. بنابراین با یک محاسبه ساده این کار را انجام می دهیم.

مثلا : ۵ میلی گرم در یک بالن ۲۵ میلی لیتری یا ۱۰ گرم در یک بالن ۵۰ میلی لیتری و ...

در این جا روش به ما اجازه داده است که مقدار محلول و استفاده از استاندارد را با توجه به شرایط خود و حساسیت کار تعیین کنیم.

پس به صورت زیر عمل کنید :

برای تهیه استاندارد مقدار ۵ میلی گرم را به دقت وزن کنید و در یک بالن ۲۵ میلی لیتر بریزید و با محلول فاز متحرک به حجم برسانید. در این جا هم محلول فیلتر و همگن شود. (با توجه به نیاز و شرایط موجود می توانید مقدار ۱۰ میلی گرم را در بالن ۵۰ میلی لیتری یا ۲۰ میلی گرم را در یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری و ... حل کنید. بدیهی است با تغییر وزن برداشتی و حجم مورد نظر ، دقت و مقدار خطا هم تغییر می کند.)

محلول رزولوشن

برای تهیه این محلول نیز همانند روش عمل کنید ، در این جا علاوه بر ماده استاندارد یک ایزومر آن هم استفاده می شود.

گاهی روش مورد نظر یا الزامات موجود در یک سازمان یا یک روش ، در کنار روش مورد نظر شرایطی را هم مد نظر دارد که باید فراهم شود. در این جا چون حساسیت تعیین مقدار ماده موثر در مورد یک ترکیب دارویی بالا است روش در نظر دارد میزان تفکیک و حساسیت روش و دستگاه را نسبت به ماده اصلی و یک ایزومر آن را نیز بررسی کند. یعنی بررسی می شود که آیا دستگاه و روش می تواند این دو ماده را تفکیک کند یا نه ، در نتیجه اگر در محلول رزولوشن تفکیک به خوبی انجام گیرد در نتیجه در صورت وجود ایزومر ماده در محلول تست ، مقدار آن مشخص و تفکیک خواهد شد.

در محلول رزولوشن معمولاً یک محلول با غلظت مشخص از ماده اصلی و یک ایزومر آن یا ترکیب ناخالص مورد نظر یا مشتقات مشابه دیگر که ممکن است در فرایند تولید آن ماده به محصول اصلی وارد شده باشد یا به خوبی جدا نشده باشد و ... تهیه می کنند و با محلول تست مقایسه و مقدار آن را تعیین می کنند.

اگر تفکیک به خوبی صورت نگیرد و یا بررسی نشود ممکن است یک ایزومر و یا یک ترکیب ناخالص به همراه ماده اصلی در دستگاه گروماتوگرافی مشاهده شود و مقدار آن ایزومر یا ترکیب ناخالص هم به عنوان ترکیب اصلی تلقی شود و باعث ایجاد خطا در تعیین مقدار ماده موثر یک ترکیب شود.

محلول نمونه

محلول نمونه را طبق روش تهیه کنید. مقدار ۴۰ میلی گرم از نمونه سفتریاکسون سدیم را وزن کنید و در یک بالن ۲۰۰ میلی لیتر بریزید و با محلول فاز متحرک به حجم برسانید و سپس فیلتر و همگن شود. (این محلول ۰.۲ میلی گرم در میلی لیتر است)

شرایط کروماتوگرافی

در این بخش باید با توجه به روش کار ، دستگاه و آشکار ساز (دکتکتور) و ستون تعیین شده را آماده کنید و تنظیمات را مطابق روش انجام دهید.

طول موج تعیین شده در روش ۲۷۰ نانومتر است. به قسمت مربوط به تنظیم طول موج و دتکتکتور در نرم افزار دستگاه رفته و طول موج آن را ۲۷۰ نانومتر تنظیم کنید.

مطابق روش ستون دستگاه باید ستونی با طول و قطر 4.0-mm x 15-cm باشد و قطر ذرات پرکننده آن باید 5- μ m باشد. یک کد در روش ذکر شده است که این کد در فارماکوپه USP تعریف شده است و مشخصات ستون با کد L1 ، نوع پرکننده و قطر ذرات آن ذکر شده است و هنگام تهیه یا خرید ستون از این مشخصات استفاده می شود.

هر ستون با توجه به قطر آن ، طول آن ، قطر ذرات پرکننده آن ، نوع و جنس مواد پرکننده آن متفاوت است و کاربردی متفاوت دارد معمولاً در روش های معتبر نوع ستون و شرایط ستون تعیین می شود. این ستون همان فاز ثابت است که نقش مهمی در جداسازی ماده دارد.

مقدار فلو یا سرعت عبور فاز متحرک در روش ، ۲ میلی لیتر در دقیقه تعیین شده است. به قسمت تنظیمات پمپ و فلو بر روی خود دستگاه و یا نرم افزار آن رفته و مقدار فلو را تنظیم کنید.

در ادامه روش شرایطی جهت بالا بردن صحت و دقت آزمایش تعیین شده است. مثلاً مقدار رزولوشن نباید کمتر از ۳ باشد و یا میزان انحراف استاندارد بین تزریق های متوالی نباید بیشتر از ۲ درصد باشد و ...

مقادیر خواسته شده t_{R} , Resolution , Standard deviation , Theoretical plates را می توان پس از تزریق استانداردها ، رزولوشن و نمونه ها ، با استفاده از نرم افزار دستگاه تعیین کرد.

در صورتی که هر کدام از موارد خواسته شده مطابقت نداشته باشد باید بررسی و اصلاح شود که توضیح این مطلب نیز مفصل است.

روش کار

مقدار 20 μ L از محلول استاندارد و محلول نمونه به دستگاه گروماتوگرافی تزریق کنید . معمولاً سه بار استاندارد تزریق میشود و میانگین سطح زیر پیک ها برای محاسبه استفاده می شود ، در مورد نمونه ها هم معمولاً از میانگین استفاده می شود.

پس از تزریق و محاسبه میانگین سطح زیر پیک ها با استفاده از فرمول ذکر شده در روش ، مقدار ماده موثر سفتریاکسون سدیم در نمونه بدست می آید.

$200(CP/W)(ru/rs)$

C = غلظت استاندارد بر حسب میلی گرم در میلی لیتر

P = پتانسی استاندارد (مقدار ماده موثر) بر حسب μg of ceftriaxone per mg

W = وزن نمونه

ru = سطح زیر پیک استاندارد

rs = سطح زیر پیک نمونه

تهیه و تنظیم: www.4800.blogfa.com

امیدوارم این مطلب مورد استفاده شما قرار گرفته باشد.

در صورت کامل تر شدن این آموزش ، مطالب در همین قسمت قرار داده می شود.

<http://4800.blogfa.com/post-126.aspx>

این مطلب توسط www.4800.blogfa.com تهیه شده است. استفاده از آن با ذکر منبع مجاز است.