الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الصيدلة
قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية

دراسة العلاقة بين المعايرة الميكروبيولوجية والمقايسة باستخدام الاستشراب السائل رفيع الإنجاز لمحتوى الكلورهيكسيدين في الغراغر (الغسولات الفموية)

study of the relationship between microbiological assay and assay using High Performance Liquid Chromatography of Chlorhexidine gargles (mouth washes)

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في المراقبة الدوائية

إعداد الصيدلانية: نهاد الحسن
إشراف الاستاذ: الدكتور أحمد حسن
مشاركة الاستاذ الدكتور: محمد عامر ماردیني

العام الدراسي 2015- 1436

الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

قرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا رقم /١٦٣٠/ المتخذ بالجلسة رقم /١٥/ تاريخ ٢٠١٥/٣/٣٠

اطلع مجلس البحث العلمي والدراسات العليا على قرار مجلس كلية الصيدلة رقم /١٥٨/ تاريخ ٢٠١٤/١٢/٢٤ وبعد الرجوع إلى اللائحة التنفيذية لقانون تنظيم الجامعات الصادرة بالمرسوم /٢٥٠/ لعام ٢٠٠٦ .

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /٩٣٠٥/ص تاريخ ٢٠١٠/٨/١٨ بشأن الموافقة على تسجيل رسالة الطالبة

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /١٠٠٥/ص.م تاريخ ٢٠١٥/٣/١٢ بشأن الموافقة على تعديل عنوان رسالة الطالبة

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /١٠٥٩/ تاريخ ٢٠١٣/١٢/١٠ بشأن الموافقة على نقل الإشراف

تستفيد الطالبة من المرسوم رقم /٣٩٣/ تاريخ ٢٠١٢/١٠/٣١ وتمنح سنة إضافية اعتباراً من ٢٠١٣/٨/١٨ لغاية ٢٠١٤/٨/١٨

تستفيد الطالبة من المرسوم رقم /٣٥٨/ تاريخ ٧/ ١٠/ ٢٠١٣وتمنح سنة إضافية اعتباراً من ٢٠١٤/٨/١٨ لغاية ٢٠١٥/٨/١٨

وبنتيجة المذاكرة قرر مجلس البحث العلمي والدراسات العليا :

الموافقة على تأليف لجنة الحكم على رسالة الماجستير في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية التي أعدتها الطالبة **نهاد الحسن** بعنوان :((دراسة العلاقة بين المعايرة الميكروبيولوجية والمقايسة باستخدام الاستشراب السائل رفيع الانجاز لمحتوى الكلورهيكسيدين في الغراغر الفموية : المضامض الفموية ")) بكلية الصيدلة من السادة الأساتذة :

د. أحمد حسن	الأستاذ في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية	كلية الصيدلة
جامعة دمشق	الاختصاص: الكيمياء الصيدلية	عضواً مشرفاً
د. جهاد حربالي	الأستاذ المساعد في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية	كلية الصيدلة
جامعة دمشق	الاختصاص : الكيمياء الصيدلية	عضواً
د. مصطفى العموري	الأستاذ المساعد في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة	كلية الصيدلة
جامعة دمشق	الاختصاص: ميكروبيولوجيا صيدلية	عضواً

وذلك وفق ما هو وارد في قرار مجلس الكلية آنف الذكر،،،

ملاحظة: يرجى إرسال نسخة عن الإعلان الخاص بتحديد موعد المناقشة فور صدوره إلى مكتب نائب رئيس الجامعة لشؤون البحث العلمي والدراسات العليا.

الإهداء

- إلى كل من ساهم ودعم هذا العمل بأي مجهود مهما كان قدره.
- إلى كل من تمنى لي الخير والتوفيق.
- إلى كل من حمل لي في قلبه ذرة حب.
- إلى من أحب.
- إلى بلدي، عائلتي، أصدقائي، أخوتي، أبنائي.

كلمة شكر

بداية الشكر من الأعماق لله عز وجل الذي وفقني لإنجاز هذا البحث.

فائق الإحترام والامتنان للأستاذ الدكتور أحمد حسن لتفضله بالإشراف على هذا البحث ومتابعته وتوجيهاته الهامة وتكرمه بالوقت والجهد لإخراج هذا العمل بالصورة اللائقة.

الشكر الجزيل وفائق الاحترام للأستاذ الدكتور محمد عامر ماريني لتفضله بالمشاركة بالإشراف على هذا البحث وعلى توجيهاته الكريمة التي أغنت البحث.

الشكر الجزيل وخالص المحبة للأستاذ المساعد الدكتور جهاد حربالي لتفضله بالمشاركة في لجنة الحكم وعلى ملاحظاته وتوجيهاته القيمة التي أفادت البحث.

الشكر الجزيل وكل المحبة والاحترام للأستاذ المساعد الدكتور مصطفى العموري لتفضله بالمشاركة في لجنة الحكم وعلى ملاحظاته وتوجيهاته القيمة التي أغنت البحث.

وعلى دعمه للبحث منذ البداية ورفده له بكل معلومة ورأي.

كل الشكر والامتنان والتقدير للأستاذ الدكتور جمعة الزهوري عميد كلية الصيدلة لما قدم ويقدم من عون ودعم للجميع.

كل الشكر والتقدير للأستاذة الدكتورة جمانة الصالح نائب العميد للشؤون الادارية.

كل الشكر والتقدير للأستاذ الدكتور عبد الحكيم نتوف نائب العميد للشؤون العلمية.

لما قدموه من تسهيلات وعون لإخراج هذا البحث.

الشكر الجزيل والامتنان العميق لمدير مخابر الرقابة الدوائية في وزارة الصحة الدكتور حبيب عبود لكل ما قدمه لي من عون ودعم للبحث.

الشكر الجزيل للعاملين في مخابر الرقابة الدوائية في وزارة الصحة وأخص بالذكر قمر قيتابي وماهر العطوان ومنى السعدي.

خالص الشكر والامتنان للأستاذ الدكتور محمد العبد الله لتكرمه على تقديم العون والدعم في كل مراحل إنجاز البحث.

خالص الشكر والامتنان للدكتور أنس ملص لتكرمه على استضافتي للعمل في مخبره.

الشكر كل الشكر للزميلة العزيزة روعة عكاشة على كل ما قدمت من نصيحة ومساعدة.

الشكر كل الشكر للزميلة خلود نشار على كل ما قدمت من دعم وتحفيز ونصيحة.

تصريح

الاسم الكامل: نهاد أحمد الحسن.

مكان وتاريخ الولادة: دمشق 1968/4/2 م .

عنوان البحث: دراسة العلاقة بين المعايرة الميكروبيولوجية والمقايسة باستخدام الاستشراب السائل رفيع الإنجاز لمحتوى الكلورهيكسيدين في الغراغر (الغسولات الفموية).

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم إقتباسه بالكامل من عمل علمي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق او أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر.

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.

أتعهد بأنني لم أقل إلا الحقيقة ولم أخفي شيئاً تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه أوقع.

التاريخ التوقيع

2015/6/18 نهاد أحمد الحسن

بدأ البحث بتاريخ 2010/8/18 وتم الانتهاء منه بتاريخ 2015/5/18.

تم إنجاز البحث في:

- مخبر الدراسات العليا – قسم المراقبة الدوائية في كلية الصيدلة في جامعة دمشق.
- مخابر الرقابة الدوائية التابعة لوزارة الصحة في مدينة دمشق.
- مخبر الدكتور أنس ملص – القسم الجرثومي – مدينة دمشق.

تاريخ مناقشة الرسالة 2015/5/18 م.

أسماء أعضاء لجنة الحكم:

بـــرئـــاســـة: أ. د أحمد حسن. التوقيع

الفاحص الأول: أ. م. د جهاد حربالي. التوقيع

الفاحص الثاني: أ. م. د مصطفى العموري. التوقيع

وقد تم إجراء التصحيحات المطلوبة منهم على الأطروحة.

قائمة المحتويات LIST OF CONTENTS

الموضوع	رقم الصفحة
قائمة المحتويات	1
أولاً:القسم النظري	8
المقدمة	9
الباب الأول	10
1- المقدمة	11
2- الغسولات الفموية	12
2-1- تعريفها	12
2-2- القوانين و التشريعات	12
2-3- اللمحة التاريخية	13
2-4- الاستعمال الشائع	15
2-5- أنواع الغسولات الفموية	16
2-6- آلية عملها	17
2-7- الاستخدامات و الفوائد	17
2-8- المساوئ و المحاذير	18
2-9- التخزين	18

3- مكونات الغسولات	18
3-1- المواد الفعالة	18
3-2- المواد الاضافية	20
4- بعض المركبات المرخصة محلياً	22
5- الجراثيم الفموية	24
5-1- الجراثيم الطبيعية	24
5-2- الجراثيم الممرضة	24
6- الآفات الفموية	28
6-1- التهاب اللثة	28
6-2- قرحات الفم المتكرره	29
6-3- الأدوية المسببة للآفات الفموية	29
6-4- المركبات التي تسبب التهاب اللثة والفم	29
الباب الثاني	30
1- المقدمة	31
2- الكلورهيكسيدين	32
2-1- لمحة تاريخية	32
2-2- الاسم العام والصيغ	33
2-3- الشكل المستعمل	34

2-4- الخصائص الفيزيوكيميائية	34
2-5- الثباتية	36
2-6- الشوائب	36
2-7- التنافرات	39
2-8- الأشكال التجارية للكلور هيكسيدين	39
2-9- الفعالية المطهرة وآلية التأثير	40
3- الخصائص الفارماكولوجية واستعمال الدواء	43
4- التحذيرات والسُمية	44
5- الاستخدام	45
6- معايرة و تحري الكلورهيكسيدين	47
6-1- مقدمة عامة عن الكروموتوغرافية	47
6-2- آلية عمل الكروموتوغرافية	47
6-3- الأدوات المستخدمة بشكل عام	47
6-4- التقنيات الكروموتوغرافية	48
6-4-1- تقنية الكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC	48
6-4-2- تقنية الكرموتوغرافيا السائلة HPLC	49
6-4-3- مقايسة الكلورهيكسيدين بالطريقة الحيوية	51

ثانياً :القسم العملي	52
الباب الأول	53
هدف البحث	53
الباب الثاني	54
- المواد و الطرائق	54
1- مقايسة الكلورهيكسيدين الموجود في الغسولات الفموية باستخدام طريقة الاستشراب السائل رفيع الانجاز(الكروماتوغرافيا).	55
1-1- الأجهزة و الأدوات	55
1--2- المواد	56
1--2-1- المادة العيارية	56
1--2-2- العينات المدروسة	56
1-2-3- الكواشف و المذيبات	56
1-2-4- تحضير المحاليل	56
1-2-4-1- تحضير المحليل الدارئة	56
1-2-4-2- تحضير الاطوار المتحركة	57
1-2-4-3- تحضير المحلول الام و المحاليل العيارية	57
1-2-4-3-1- تحضير المحلول الام	57
1-2-4-3-1- تحضير المحاليل العيارية	57

1-2-4-4- تحضير محاليل المصدوقية	57
1-2-4-5- تحضير محاليل العينات المدروسة	60
2- مقايسة الكلور هيكسيدين الموجود في الغسولات الفموية بالطريقة الحيوية	62
2-1- الأجهزة و الأدوات	62
2-2- مبدأ الاختبار	63
2-3- طرائق العمل	63
2-3-1- تحضير المعلق الجرثومي الأم	63
2-3-2- تحضير سلسلة التمديد الجرثومية	64
2-3-3- تحضير سلسلة المستحضرات المدروسة	65
الباب الثالث	69
الدراسات السابقة	70
الباب الرابع	73
مصدوقية الطرائق التحليلية و ملائمة النظام و تصنيفها	73
1- مصدوقية الطرائق التحليلية:	74
2- ملائمة النظام	77
3- تصنيف الطرائق التحليلية	77
الباب الخامس	79
النتائج	79

1- المقايسة بطريقة الاستشراب السائل رفيع الإنجاز :	80
1-1- الدراسة الكيفية و تعيين الشروط الكروماتوغرافية لمقايسة الكلورهيكسيدين في العينات المدروسة	80
1-2- نتائج مصدوقية طريقة الكروماتوغرافيا السائلة رفيعة الانجاز المطورة	81
1-2-1- ملائمة النظام	81
1-2-2- مصدوقية الطريقة	81
1-2-2-1- المضبوطية	81
1-2-2-2- التكرارية	83
1-2-2-3- الدقة الوسطى	84
1-2-2-4- النوعية	85
1-2-2-5- الخطية	86
1-2-2-6- المتانة	88
1-2-2-7- حد الكشف	90
1-2-2-8- حد القياس الكمي	90
1-3- نتائج دراسة الكلورهيكسيدين في المستحضرات المدروسة حسب بروتوكول العمل بالفترات الزمنية للدراسة	90
1-3-1- نتائج دراسة المستحضر المحلي X1	90
1-3-2- نتائج دراسة المستحضر المحليX2	91
1-3-3- نتائج دراسة المستحضر المحليX3	92

1-3-4- نتائج دراسة المستحضر المستوردX	93
2- نتائج الدراسة الحيوية (الميكروبيولوجية):	101
2-1- نتائج الدراسة الحيوية لمستحضر X1	101
2-2- نتائج الدراسة الحيوية لمستحضرX2	102
2-3- نتائج الدراسة الحيوية لمستحضرX3	103
2-4- نتائج الدراسة الحيوية لمستحضرX	104
2-5- نتائج الدراسة الحيوية لمستحضرالمعياري X ´	105
خلاصة النتائج	106
الباب السادس	108
الدراسة الاحصائية	108
- الدراسة الكيميائية	109
- الدراسة الميكروبيولوجية	122
دراسة العلاقة بين الدراسة الجرثومية والدراسة الكيميائية	132
المناقشة والاستنتاجات	135
التوصيات والمقترحات	137
الملخص	139
فهرس الجداول	143
فهرس الأشكال	145
قائمة الاختصارات	147
قائمة المصطلحات الأجنبية المستخدمة	148
المراجع	151

أولا: القسم النظري

First: Theoretical part

المقدمة:

INTRODUCTION

البـــاب الأول

1- المقدمة
2- الغسولات الفموية
3- مكونات الغسولات
4- الغسولات الفموية المرخصة محلياً
5- الجراثيم الفموية (الفلورا الفموية)
6- الآفات الفموية

الباب الأول

1-المقدمة| Introduction:[1]

طورت العديد من المواد الكيميائية على مر السنين للاستفادة من تأثيرها المضاد للميكروبات في التجويف الفموي لاحتوائه على جراثيم تعيش على سطوح الأسنان و اللثة و الشفتين و اللسان و الأغشية المخاطية و تكون بعض هذه الجراثيم مفيدة للصحة إذا وجدت في المكان و الزمان الصحيحين و بأعدادها الطبيعية، حيث إن الجسم بحاجة إلى الوظائف التي تقوم بها هذه الجراثيم الصديقة ، في حين تسبب جراثيم أخرى أضراراً و مشاكل للإنسان خاصة إذا وجدت لنفسها مكاناً على طبقة المينا المغطية لسطوح الأسنان مسببة نخوراً أوالتهابات باللثة و لأهمية هذه التأثيرات على صحة الفم وضعت جمعية أطباء الأسنان الأميريكيين ADA (America Dental Association)[18]في عام 1986 إرشادات للموافقة على المنتجات الفموية الحاوية على مضادات ميكروبية و دعمت إجراء دراسات سريرية لمعرفة المكونات العلاجية ، و قد حصلت منتجات البيريديكس Peridex و الليسترين Listrine وبعض النماذج الجنيسة لليسترين و [1] Colgate Totalعلى موافقة جمعية أطباء الأسنان الأميريكيين ADA .

وهناك العديد من المواد المتوفرة للاستخدام كغسول فموي مضاد للميكروبات تبعا للمجموعة الكيميائية (وكانت كل هذه المجموعات قابلة للتحرر بشكل مديد مما يعطي بقاء العامل الفعال بالتجويف الفموي ليتحرر بشكل بطيء و يبقى تأثيره المضاد للميكروبات) .

2- الغسولات الفموية| Oral Gargels:

2-1- تعريفها:

تعد الغسولات الفموية أو الغراغر Gargles شكلاً من الأشكال الصيدلانية السائلة يطبق موضعياً في التجويف الفموي و هي غير معدة للبلع تحتوي على مواد مطهرة لمعالجة آفات الأغشية المخاطية في جوف الفم و الحنجرة سواء كان من منشأ جرثومي أو فطري أو فيروسي، لنحصل بالنتيجة على فم سليم و نفس منتعش [5].

إن غسولات الفم أو شطوفات الفم Mouth Rinses أو حمامات الفم Mouth Bathes ، هي سوائل توضع في الفم و يتم تحركيها عن طريق التقبضات العضلية الفموية التي تؤدي الى إحداث فقاعات هوائية تضمن تحريك السائل [2] .

و قد تكون هذه الغسولات بشكل غراغر و يقصد بها إدخال السائل إلى الفم و رفع الرأس قليلاً و جعل السائل قدر الإمكان في البلعوم الفموي و من ثم يتم تحريك هذا السائل عن طريق إحداث فقاعات هوائية مع الحرص على عدم دخوله إلى الجوف[3].

و عادة ما تكون هذه الغسولات الفموية محاليل مطهرة و يكون الغرض منها إنقاص الحمل الجرثومي في التجويف الفموي ، و غالباً ما تكون هذه الغسولات محاليل مائية مركزة تحوي مكوناً فعالاً واحداً أو أكثر و قد تكون لهذه الغسولات أهدافاً أخرى كمسكن للألم Analgesic أو كمضاد للفطور Antifungal أو كمعطر للفم او كمضاد للإلتهاب Anti-inflammatory أو مضاد للنخر Anti-necrosis [4].

2-2- القوانين و التشريعات| Rules And Regulations:

صدر قرار من وزارة الصحة يتضمن الأسس العامة التي يجب اتباعها من أجل المنتجات الصيدلانية غير الدوائية و حمل رقم 24\ت و فيما بعد تم تغييره الى 11\ت و يعتبر المضامض شكلاً من الأشكال الصيدلانية التي تندرج تحت اسم الأشكال الصيدلانية غير الدوائية التي تؤثر على صحة الإنسان و تشمل مايلي:

المستهلكات و المستلزمات الطبية – المستحضرات العشبية- المنتجات الصيدلانية الصحية- المطهرات الجسدية و الغذائية – مبيدات الحشرات المنزلية – المنتجات الصيدلانية التجميلية و المنتجات الصيدلانية المستخدمة في العناية الشخصية – بالإضافة الى أغذية الأطفال دون العام.

1- تشمل المستحضرات الصحية المستخدمة في العناية الشخصية : البودرة الطبية – بودرة الأطفال – معاجين الأسنان العادية و الطبية – مضامض الفم – الشامبو و البلسم – كريمات الشعر – ماسك الشعر – جل الاستحمام .... التي تحمل إدعاءات طبية – صبغات الشعر المصنعة بدءاً من المادة الأولية – و الصبغات المستوردة – الصابون الطبي – محاليل العناية الخاصة بالعدسات اللاصقة – و المحاليل الحيوية المستخدمة في حفظ الأعضاء.

2- المستحضرات التجميلية :

مستحضرات العناية بالبشرة بكافة أشكالها و التي تحمل إدعاءات طبية و كريمات إزالة الشعر أغذية الأطفال لعمرأقل من السنة .

3- المستحضرات الصحية المصنعة بأشكالها الصيدلانية و التي تحمل إدعاءات طبية .

4- شرابات الطاقة .

5- المستحضرات العشبية من مساحيق خلطات الأعشاب وفق مايلي:

أ-المعبأة ضمن كبسول.

ب-المعبأة ضمن ظروف و التي تحمل إدعاءات طبية .

6- المعقمات و المطهرات الجسدية و المطهرات الغذائية(عدا معقمات السطوح و معقمات الأدوات الجراحية و المشافي).

7- تعبئة الكحول في عبوات مجزئة للاستخدام الشخصي .

8- مبيدات الحشرات المنزلية المعدة لإبادة الحشرات و القوارض الضارة بالصحة العامة و المسموح باستخدامها و بكافة أشكالها .

9- الزيوت (المعصورة على البارد) التي تؤخذ داخلاً و بكافة أشكالها الصيدلانية .

10- الزيوت التي تستعمل خارجياً و التي تحمل إدعاءات طبية .

3-2- لمحة تاريخية |Historical Overview :

وردت أول اشارة للغسولات الفموية في الطب الشعبي و الصيني حوالي 2700 قبل الميلاد لعلاج التهاب اللثة ، و من ثم ذكرت المضامض الفموية في الحقبة الإغريقية[8] و الرومانية بعد تنظيف الفم الميكانيكي و كان الأمر شائعاً لدى الطبقات العليا في المجتمع ، حيث نصح أبقراط Hippocrates بتحضير مزيج من الملح ، الشب ، الخل [8].

و قبل وصول الأوروبيين إلى أميركا استعمل الهنود الحمر الغسولات الفموية و كانت مصنوعة من النباتات مثل نبات Coptis Trifolia.

كما استعمل شعب الأميريكيتين الغسولات الفموية الملحية لعلاج آلام الحنجرة و بعض تقرحات الفم [8].

اكتشف عالم الجراثيم Anton Van Leeu Wenhoek في القرن السابع عشر وجود جراثيم في اللويحة السنية Bacterial Plaque ، و قد قام بتجربة صغيرة حيث أضاف محلول من الخل أو مشروب البراندي الكحولي Alcoholic Brandy إلى الماء فوجد أن جميع الكائنات الدقيقة في الماء قد قتلت أو تثبط نموها .

و من ثم قام بالمضمضة بالخل و البراندي لشخص آخر فوجد أن الجراثيم لاتزال موجودة في اللويحة السنية و عليه استنتج و بشكل صحيح أن المضمضة لم تصل إلى اللويحة أو أنها لم تكن على اتصال لمدة كافية مع اللويحة السنية كي تقوم بقتل المتعضيات التي فيها .

بقيت الحالة هكذا حتى عام 1960 عندما قام Herald Loe البروفيسور في الكلية الملكية لطب الأسنان في الدانيمارك ، بتوضيح أن مركب الكلورهيكسيدين يمكن أن يمنع من تكون اللويحة السنية.

و السبب في فعاليته هو أنه يلتصق بشكل قوي بسطح السن لذا يبقى وفق تراكيزه الفعالة لعدة ساعات[10].

أجريت بحوث مخبرية مستخدمة بعض أنواع الغسولات لتقييم تثبيط البكتيريا الفموية حيث كان هناك غسولات فموية تجارية تحتوي على أحد التراكيب التالية:

Cetyl pridinium chloride (CPC)

Phenolic compounds colgate plaxsr

Glycerine (triclosan)

تمت هذه الدراسات على 450 شخصاً بالغاً بحالة صحية جيدة و قد تم تقسيم الموضوعات إلى ثلاث مجموعات مع عيناتها اللعابية و قد تم تقييم العد الجرثومي عند بداية و نهاية مدة زمنية طولها 8 أسابيع باستعمال 10مل من الغسول الفموي مدة 15ثانية مرتين يوميا صباحاً و مساءاً بالإضافة لالتزامهم بالنظافة الفموية اليومية و التفريش و الخيط[13].

فأظهرت النتائج تغيرات واسعة بتأثيرها ، فأوضحت أن المضامض الفموية الحاوية على (CPC) قد أدت إلى انخفاض في الفلورا الفموية بشكل واضح أكثر من الصيغ المعتمدة على الفينولات Phenols و على تلك المعتمدة على الغليسيرين Glycerine .

فكانت المضامض الفموية الحاوية على(CPC)قد أحدثت إنقاص في الحمل الجرثومي في التجويف الفموي عندما استعملت بمشاركة النظافة الفموية اليومية .

و في عام 1986 اقترح العالم Corn Man بعمل تصنيف للمضادات الميكروبية الأساسية لنوعين أو جيلين بالإعتماد على الخواص الفارماكولوجية :

- الجيل الأول :العامل الفعال فيها يستطيع قتل البكتيريا بالتماس لكن قدرته محدودة على الفلورا الفموية بعد التقشع .
- الجيل الثاني: العامل الفعال فيها له تاثير آني و لكنه يبدي تاثيراً مطولاً أكثر على الفلورا الفموية مثل الكلورهيكسيدين [12].

2-4- الاستعمال الشائع |Common Use:

الآن أكثر الإستعمالات شيوعاً للغسولات الفموية هو كونها مطهرات حيث من المعروف أنها تقضي على اللويحات الجرثومية Bacterial Plaques التي تسبب النخور السنية Dental Caries و التهاب اللثة Gingivitis و النفس السيء Bad Breath .

بكل الأحوال من المعروف أن استخدام الغسولات لا يلغي استخدام الخيط و الفرشاة ، و يجب أن يستخدم الغسول الفموي بالمعالجة قصيرة الأمد فقط [14.2].

فقد أشارت منظمة طب الأسنان الإميريكية ADA إلى أن تفريش الأسنان بانتظام و الاستخدام الجيد للخيط السني يكون كافياً في معظم الحالات و ليس كلها لذا وافقت على العديد من الغسولات الفموية التي لا تحتوي على الكحول ، بالإضافة إلى الفحص الدوري عند طبيب الأسنان [13] .

و بما أن غسول الفم الحاوي على مواد مطهرة يخفض تطور أو حدوث اللويحة الجرثومية Bacterial Plaque بإبقاء الجراثيم القابلة للحياة بمستوى منخفض، عندئذ تقوم كل من المعالجة الكيميائية بهذه المطهرات ، ومركبات اللعاب بالعمل بشكل متزامن .

توفر مشاركة إجراءات صحة الفم المكيانيكية و الكيميائية تأثيراً كبيراً ،بسبب أن كتلة اللويحة السنية تنخفض ميكانيكياً، مما يبقي طبقة رقيقة جداً من اللويحة السنية غير منتظمة يمكن إزالتها بالوسائل الكيميائية .

5-2- أنواع الغسولات الفموية | Types Of Gargels:

2-5-1- الغسولات الفموية التجميلية : تعتبر رائحة الفم مشكلة اجتماعية و فيزيزلوجية رئيسية و هناك أسباب عديدة داخل و خارج الفم مسؤولة عنها منها التهاب اللثة –التهاب النسج حول السنية – التهابات الأنف و الجيوب – الداء السكري – اعتلالات الكبد – القصور الكلوي- السرطانات الرئوية [6]. لذلك تستخدم المضامض المضادة للجراثيم لمكافحة رائحة النفس الكريهة ، ومنح الفم رائحة زكية ومنعشة. لكنها ليست قادرة على مكافحة البكتريا أو إزالة اللويحة .لذلك لا تستخدم لحماية الأسنان من النخور[6].

2-5-2- الغسولات الفموية المطهرة: إضافةً إلى إخفائها الرائحة الكريهة فهي تكافح اللويحة وتحمي الأسنان من النخور ، حيث تخفف من اللويحة بنسبة 25%، لكنها لايمكن أن تحل محل تفريش الأسنان وتنظيفها بالخيط ، وقد توصف لمرضى اللثة أو السلاقThrush.[6]

ويكون الهدف من استعمالها أيضا معالجة الآفات الفطرية المتوضعة على الأغشية المخاطية الفموية حيث تكون المادة الفعالة التي يحملها الغسول الفموي بهذه الحالة من المضادات الفطرية التي تعطي نتائج موضعية .

2-5-3- الغسولات الفموية الفلورية: تستخدم لدى الأشخاص المعرضين لتنخر الأسنان، ولا ينصح باستخدام هذا النوع من الغسولات عندما يتلقى الشخص كميات كافية من الفلوريد سواء من الغذاء أو من المياه المفلورة .

كما تقسم الغسولات الفموية حسب طريقة التحضير إلى :

أ – الغسولات الفموية المحضرة ذاتيا.
ب – الغسولات الفموية المحضرة تجاريا.

أ – الغسولات الفموية المحضرة ذاتياً: يمكن أن نعتبر أن الماء والمحاليل الملحية أو محاليل بيكربونات الصوديوم محاليل عملية معقولة أكثر من باقي الغسولات الأخرى من ناحية الثمن والفعالية وتحقق النظافة الفموية، كما أنها تفيد في العناية التالية للعمل الجراحي.

ب – الغسولات الفموية المحضرة تجارياً: إن فوائد هذه المعالجة في التحكم باستقلاب اللويحة الجرثومية لا يلغي مساوئها من حيث الارتكاسات التحسسية، الآثار السمية، تداخلها مع الاستجابة المناعية الطبيعية.

إن تطور سلالات جرثومية مقاومة للدواء وإمكانية تطور انتانات ثانوية بسبب حدوث اضطرابات في الفلورا الجرثومية الطبيعية، قد يحدث نتيجة للاستعمال العشوائي لها[9].
توجهت الكثير من الشركات العلمية لتصنيع هده االمستحضرات لأهميتها العلاجية والتجارية لكونها تصنف ضمن المركبات التي تباع بدون وصفة (OTC)[6].

2-6- آلية عملها | Mechanism Of Action:

1. الفعل الميكانيكي لضغط المحلول المستخدم يخلصنا من البقايا الطعامية .
2. فعل المادة المنكهة يخفي الروائح غير المستحبة .
3. فعل المواد المضافة للحصول على التأثير المطلوب حيث يكمن دور الغسول أو الغرغرة في حمل المواد الدوائية إلى مكان تأثيرها فتحررها بلطف في التجويف الفموي أو البلعومي حيث تؤدي دورها المطلوب.

2-7- الاستخدام و الفوائد | Uses And Benifits:

يغسل الفم بـ 20 مل من المحلول بعد تفريش الأسنان لمدة ثلاثين ثانية مرتين يومياً حيث يقوم الشخص بالغرغرة بالمحلول نفسه بالأحوال العادية، تقترح بعض الشركات عدم تناول الماء مباشرة بعد الغرغرة لكن عندما يحتوي معجون الأسنان على الـ SLS (Sodium Loryl Sulfate) فينصح بإجراء غسيل الفم والغرغرة بعد ساعة على الأقل من تفريش الأسنان، لأن المكونات الأنيونية Anionic Compounds فيه يمكن أن تعطل عمل العوامل الكاتيونيةCationic Factors الموجودة بالغسولات الفموية[17]. .

<u>و من فوائد استخدام الغسولات الفموية:</u>

1.بعد الجراحة الفموية والأنسجة الداعمة.

2.بعد المعالجات اللثوية.

3.إزالة الفضلات الطرية عندما يكون الغسل أو المضمضة قوياً نشيطاً.

4.تمنح طعماً ساراً ورائحة طيبة وإحساساً منعشاً للتجويف الفموي.

5.تساعد على الكبح المؤقت لنخر الفم عندما تكون أسبابه موضعية.

2-8- مساوئ ومحاذير استخدامها | Disadvantages And Warnings:[9]

1. قد تؤدي إلى تخريش في اللثة إذا كانت حاوية على أوجينول بنسبة كبيرة.
2. مركبات الفلور فعالة و ذات مأمونية لكنها قد تؤدي أحياناً إلى فرط حساسية، وعلى المدى البعيد وعبر الاستخدام الدائم قد تؤدي إلى حدوث ميناء مبقّع.
3. بعض المركبات الداخلة في تركيبها قد تؤدي إلى تصبغ الأسنان مثل مركبات الكلورهيكسيدين Chlorhexidine.
4. الغسولات الحاوية على كحول قد تلعب دوراً بازدياد خطورة تطور سرطان الفم [14].

و قد أشارت الدراسات الحالية إلى ازدياد خطور الإصابة بالسرطان بمقدار خمس مرات لدى مستهلكي الغسولات الفموية الحاوية على الكحول و الذين لا يدخنون ولا يشربون الكحول)[16].

وقد ركزت هذه الدراسة أيضاً على التأثيرات الجانبية للعديد من الغسولات الفموية الشائعة و التي تتضمن تآكل السن و حوادث التسمم العرضي لدى الأطفال.

2-9- التخزين | Storage:[21]

لا تعبّأ هذه المنتجات في عبوات زجاجية لأن الباهاء أو درجة PH تصبح أكثر قلوية بالزجاج أما البلاستيك فهو المادة المستعملة عادةً بعبوات محكمة الإغلاق و بعيداً عن الضوء منعاً لتبخر المواد العطرية الطيارة و الكحول [20].

3- مكونات الغسولات| Contents of Gargles:

3-1- المواد الفعالة | Active Ingredients:

أ- <u>الكحول Alcohol</u>: نحتاج في بعض الأحيان لإدخال الكحول بنسبة 27% كحامل للمنكه أو توفير الحس اللاذع[8]. لقد اقترح نظرياً أن الكحول يساهم في إحداث سرطانات الفم ولكن لم يتم إثبات هذا من الناحية العملية وقد تم التأكيد على تلك النتيجة أيضاً في الدراسات اللاحقة المجراة في الأعوام 2003،1995،1985[48] 2012[49].

ب- <u>بنزيدامين Benzydamine</u>:[7] يستخدم في الحالات الالتهابية الشديدة كالتهاب الفم القلاعي تعمل الغسولات الفموية المسكنة للألم كالمحتوية على اللبنزيدامين على التخفيف من شعور الألم وخصوصاً قبل الوجبات.

ت- بيتاميتازون Betametazone: يستخدم في الحالات الالتهابية الشديدة التي تصيب مخاطية الفم كالتهاب الفم القلاعي يمكن استخدام المضامض الفموية الحاوية على البيتاميتازون[9].

ث-الكلورهيكسيدين غلوكونات Chlorhexidine digluconate : [9] مادة مطهرة تمتلك تأثيراً مقاوماً لتشكل اللويحة الجرثومية وتتواجد بعيارات من 0.12%-0.2% تمتلك تأثيراً مضاداً للجراثيم وخصوصاً العصيات الإيجابية وبعض التأثير ضد الفطور ويمكن أن يستخدم الكلورهيكسيدين كبديل مؤقت لباقي الأدوات المنظفة للفم[24]. كما يمكن أن يستخدم في منع نمو المبيضات البيض لدى الأفراد المثبطين مناعياً[59].

إن استخدام الغسولات الفموية المحتوية على الكلورهيكسيدين قبل قلع السن يقلل من خطر حصول حالة تدعى السنخ الجاف، وهي حالة مؤلمة يحصل فيها زوال للعلقة الدموية من موضع القلع فيصبح العظم معرضاً للجوف الفموي مباشرةً [24]

ج- الفلوريد Floreid :ويوضع بتركيز ppm1450 لتقوية السن ضد عملية التحلل.

ح- بيروكسيد الهيدروجين Hydogen peroxide : الماء الأوكسجيني يعد عاملاً مؤكسداً ويستخدم بتركيز 1.5%[27] فهو يقتل الجراثيم وله فعالية مطهرة ميكانيكية من حيث الرغوة التي يشكلها.

خ-المركبات الفينولية Phenolic Compounds :تمتلك الغسولات الفموية الحاوية على الفينول مثل مستحضر Listerine فعالية مضادة للويحات لا تسبب تصبغ الأسنان ولكنها أقل بقاء واستمرارية في الفم من الكلورهيكسيدين[10].

د- تريكلوزانTriclosan: معقم غير شاردي ثنائي الفينول. عندما يستخدم بتراكيز 0.03% يبدي فعالية مضادة للجراثيم واسعة الطيف وبعض التأثير المضاد للفطور وتأثير واضح ضد اللويحة السنية الجرثومية، خصوصاً عندما يتم مزجه مع الكوبوليمير Copolymer أو مع سيترات الزنك Zinc Citrate. لا يسبب تصبغ للأسنان لكن مأمونيته في موضع الاتهام[15].

ذ-الترانيكزاميك أسيد Tranexamic acid:[15] يمكن استخدام بعض المحاليل ذات التركيز 4.8% من المادة المذكورة لكي تقوم بدورها كعامل مضاد لانحلال الفيبرينFibrine ويمكن

استخدام الغسولات هذه بعد العمليات الجراحية الفموية لدى المصابين باعتلالات التخثر أو الذين يتناولون الأدوية المضادة للتخثر. كالوارفارين[48].

ر- <u>التتراسيكلين Tetracycline</u>: صاد حيوي يمكن في بعض الحالات استخدامه كغسول فموي. لكن الاستخدام المطول له يهدد بحصول فرط نمو للمبيضات البيض في الفم نتيجة غياب الجراثيم المنافسة للفطور .

2-3- المواد الاضافية | Additional Ingredients:[47]

أ- الماء المقطرDistilled Water و الكحول الإيتيليEthanol :بتراكيز 5- 25 % (بشرط أن يكون خالياً من الشوائب والميتانولMethanol) كمحلان رئيسيان بالإضافة إلى الغليسرين Glycerine والبروبيلين غليكول Propylene Glycol كمحلات مساعدة ومرطبة.

ب- منكهات Flavors: (0.5 – 1.5)% مثل حمض الفوماريك Fomaric acid وحمض الماليك Malic acid والمنتول Menthol والتيمولTimol.

ت- مرطبات Humactants:(5 – 20)%

ث- مواد حافظة Preservatives: لأنها تحوي طوراً مائياً وللحفاظ على الثبات الفيزيائي و الكيميائي مثل **.**حمض البنزوئيك Benzoic acid: (0.05 – 0.1)% فعال خاصة تجاه الفطور (pH:5– 4) ومثله تقريباً حمض السوربيك Sorbic acid.

- كلور البنزالكونيوم Benzalconium Chloride: (0.01 – 0.002)% من مركبات الامونيوم الرباعية Tetra ammoniumينخفض تأثيره بوجود المركبات سالبة الشحنة كما أن فعاليته تجاه إيجابيات الغرام أقوى منها تجاه سلبيات الغرام. وفعال ضد الفطور (pH= 4- 10).
- البارابيناتParabens: الميتيل بارابينMethyl Paraben (نيباجين)0.07% و البروبيل بارابين Probyl Paraben(نيبازول) 0.03%.

ج- الواقاءات Buffers : للحفاظ على باهاء المحلول ضمن حدود فعالية المواد الداخلة بالتركيب

.حمض الفوسفورPhosphoric acid: 1% و (PH=1.6) حمض قوي يتفاعل مع القلويات.

.بيكربونات الصوديوم Sodium bicarbonate:(PH=8.3) يتفاعل مع الحموض وأملاحها والعديد من المواد القلوية.

.حمض الليمون Citric acid أحادي الماء: 1% و (PH=2.2).

.سترات البوتاسيوم Potassium Citrate: (PH=8.5).

ح- عوامل فعالة على السطح Surfactants: وذلك لزيادة الانحلالية و النفوذية فهي تخفض التوترالسطحي مما يسهل إزالة اللويحة

خ- ملونات Colorents: وتتبع للطعم المضاف للغسول (اللون الأخضر للغسولات المنكهة بالنعنع، الأحمر للغسولات المنكهة بالفراولة.....ألخ)

4- بعض المركبات المرخصة محلياً [29]:

الجدول (1) يوضح بعض المركبات المرخصة محلياً

الاسم التجاري	التركيب العلمي	التاثير الدوائي	طريقة الاستعمال
ZAK	Chlorhexidine Gluconate 0.12%+Sodium Flouride 0.05%	تطهير الفم – التهابات اللثة –الوقاية من النخر- و الوقاية من تشكل اللويحات.	غسل الفم ب10مل 2-3 مرات يوميا
ORALFRESH-K	Chlorhexidine 0.12%+pro vitB50.5%	التهاب اللثة و التقليل من تشكل اللويحات	يطبق 2-3 مرات يوميا دون تمديد –مضمضة 30 ثانية
NEOZAK	Chlorhexidine Gluconate 0.12%+Sodium Flouride 0.05%	تطهير الفم – التهابات اللثة –الوقاية من النخر و الوقاية من تشكل اللويحات.	غسل الفم ب10مل 2-3 مرات يوميا
LASTRARIME	Benzoic acid 0.12%+Eucalyptol0.009%. Menthol 0.04% +Methyl salicylate 0.05%+Thymol 0.06%	معالجة التهاب اللثة و التقليل من تشكل اللويحات	مضمضة او غرغرة عدة مرات باليوم
HEXA FLOUR	Chlorhexidine gluconate 0.2% Sodium fluoride 0.1%	تطهير الفم – التهابات اللثة –الوقاية من النخر- و الوقاية من تشكل اللويحات.	غسل الفم ب10مل 2-3 مرات يوميا
OROFAR	Benzoxonium cChloride 5mg\10ml Lidocaine(as HCL) 5mg\10ml	مطهر موضعي و مسكن في التهابات الفم المترافقة بالالم و التهاب الاغشية المخاطية و القلاع و التقرحات	يغسل ب 15-20 مل من المستحضر لمدة 30-60 ثانية مرتين يوميا

HEXA	Chlorhexidine gluconate 0.2	تطهير الفم و الوقاية من تشكل اللويحات-معالجة التقرحات القلاعية	10مل بشكل مضمضة دون تمديد مرتين يوميا – و لتنظيف البدلة نقع في المحلول 51 دقيقة مرتين يوميا
DE-FLAM	Benzydamin (as HCL)0.15%	تسكين الالم الناتج عن الافات الفموية الالتهابية (كالقلاع و التقرحات) و الافات الفموية المرافقة للمعالجة الاشعاعية و المعالجة الكيميائية	مضمضة ب 15مل من المستحضر كل 1.5-3ساعات يمدد بالماء في حال حصول اصطباغ
PLEX	Menthol0.12%+sodium fluoride 0.01%+Triclosan0.03%	الوقاية من التهابات اللثة و تشكل اللويحات و ازالة الروائح الكريهة	البالغون و الاطفال ل فوق 6سنوات يغسل ب 10مل من المحلول 3 مرات يوميا
SINASEPTIC	Sodium borate 0.2% +Phenol 0.5% +Menthol 0.2%+glycerol 1%	مطهر التهابات الفم و الاغشية المخاطية و التهابا تاللثة و ازالة الروائح الكريهة.	مضمضة أوغرغرة عدة مرات يوميا
PHENPSEPTIC	Borax 1.5%+Phenol0.27%+Menthol0.12%+sodium bicarbonate1.5%	مطهر التهابات الفم و الاغشية المخاطية و التهابا تاللثة و ازالة الروائح الكريهة.	مضمضة او غرغرة عدة مرات يوميا
GERM-X	Povidone Iodine 7.5%	لعلاج التهاب الفم و الحنجرة –مطهر قاتل للجراثيم و الفطور و الروائح الكريهة	يفرغ محتوى عبوة 5مل في 50مل ماء و تستعمل غرغرة عدة مرات يوميا
STERIDINE	Chlorhexidine Gluconate 0.12%	الوقاية من التهابات اللثة و تشكل اللويحات و ازالة الروائح الكريهة	مضمضة أوغرغرة عدة مرات يوميا
POVIDONE	Iodine8.4%	لعلاج التهاب الفم و الحنجرة –مطهر قاتل للجراثيم و الفطور و الروائح الكريهة	يفرغ محتوى عبوة 5مل في 50مل ماء و تستعمل غرغرة عدة مرات يوميا

AMC	Phenyl –Phenol Brivanthol 1% +Menthol 0.05%+Lezopropanol 32%+Mentha oil 0.025	مطهر للفم قاتل للجراثيم ـمعطر للنفس	يفرغ محتوى عبوة 5مل في 50مل ماء و تستعمل غرغرة عدة مرات يوميا
GLORIOUS-H	Chlorhexidine 2%	تشكل اللويحات و ازالة الروائح الكريهة	بعد التمديد غرغرة عدة مرات
GLORIOUS-G	Ploy vidone Iodine 1%	لعلاج التهاب الفم و الحنجرة –مطهر قاتل للجراثيم و الفطور و الروائح الكريهة	بعد التمديد غرغرة عدة مرات

5- الجراثيم الفموية Oral Bacteria:[9]

5-1- الجراثيم الطبيعية Normal Bacteria:

هناك حوالي 30 جنس ميكروبي على الأقل تم التعرف عليها في الفلورا الفموية (أنظر الجدول). ولا تختلف طريقة تصنيف الفلورا الفموية عن تلك المستخدمة في تصنيف المتعضيات النامية على سطوح أخرى من الجسم، على أية حال لا تزال المعلومات حول التنوع ضمن العديد من الأجناس على مستوى الفصيلة محدودة. وبالأخص تلك الأجناس التي لا تشترك في الأمراض الفموية والتي تعتبر فلورا طبيعية.

5-2- الجراثيم الممرضة Pathogenic Bacteria:

في الحقيقة فإن جراثيم الجيب ماحول السن معقدة وذات تنوع كبير يصل إلى أكثر من 500 صنف وقد حددت إحدى الدراسات المجراة على البالغين أهم 47 نوعاً على المسببات الأكثر أهمية. بالرغم من التعقيد في الفلورا والصعوبات التشخيصية، فقد كان بالإمكان الربط بين فلورا الجيب ماحول السن والعديد من الآفات والأمراض اللثوية.

الجدول رقم (2) أجناس الجراثيم والفطور المكونة للفلورا الفموية

Bacteria			
Gram-positive rods and filaments	**Gram-negative rods and filaments**	**Gram-positive cocci**	**Gram-negative cocci**
Facultative/aerobic			
Actinomyces	*Actinobacillus*	*Streptococcus*	*Neisseria*
Corynebacterium	*Capnocytophaga*	*Stomatococcus*	*Branhamella*
Lactobacillus	*Eikenella*	*Enterococcus*	
Rothia	*Hemophilus*		
	Simonsiella		
Anaerobic			
Actinomyces	*Bacteroides*	*Peptostreptococcus*	*Veillonella*
Bifidobacterium	*Campylobacter*		
Eubacterium	*Centipeda*		
Propionibacterium	*Fusobacterium*		
	Leptotrichia		
	Mitsuokella		
	Porphyromonas		
	Prevotella		
	Selenonomas		
	Treponema		
	Wolinella		
Fungi			
Candida			

الجدول (3) أنواع منتقاة من المجتمع الجرثومي المكون للويحة الجرثومية فوق وتحت اللثوية

Interproximal supragingival plaque	Subgingival plaque in periodontal disease
Streptococcus S. sanguis biovars 1–4, S. gordonii biovars 1–3, S. mutans, S S. sobrinus, S. anginosus, S. intermedius, S. oralis, S. mitis	S. intermedius, S. oralis A. naeslundii, A. israelii, A. gerencseriae ، A. meyeri, A. georgiae, A. odontolyticus
Actinomyces A. naeslundii genomic species 1 and 2, A. israelii, A. gerencseriae, A. odontolyticus	L. uli P. proprionicus, P. acnes B. dentium
Lactobacillus L. casei, L. acidophilus, L. fermentum, I. plantarum, L. brevis, L. salivarius	E. alactolyticum, E. saburreum, E. timidum, E. nodatum, E. brachy P. anaerobius, P. micros
Propionibacterium P. proprionicus, P. acnes	V. parvula A. actinomycetemcomitans
Corynebacterium C. matruchotti	H. segnis C. concisus, C. curvus, C. rectus
Bifidobacterium B. dentium	P. melaninogenica, P. nigrescens, P. denticola, P. oris, P. oralis ، P. buccae, P. veroralis, P. tannerae
Leptotrichia L. buccalis	P. gingivalis. P. endontalis. “B. forsythus” (closely related to Porphyromonas)

Eubacterium E. alactolyticum, E. saburreum	F. nucleatum subsp. nucleatum‹ subsp. polymorphum, subsp. vincentii‹ subsp. fusiforme, F. periodontium, F. alocis
Peptostreptococcus	
Veillonella V. parvula, V. dispar, V. atypica	C. periodontii S. sputigena, S. noxia, S. infelix, S. dianae
Actinobacillus A. actinomycetemcomitans	T. socranskii, T. vincentii, T. denticola T. pectinovorum
Haemophilus H. segnis, H. paraphrophilus, H. aphrophilus	
Campylobacter	
Prevotella P. melaninogenica, P. nigrescens, P. buccae, P. oris, P. denticola, P. loescheii	
Porphyromonas	
Bacteroides	
Fusobacterium F. nucleatum subsp. polymorphum	
Centipeda	
Selenomonas	
Treponema	
Wolinella W. recta	

6- الآفات الفموية Oral Lesions:

6-1- التهاب اللثة Gingivitis:[3]

يعد التهاب اللثة عملية التهابية مقتصرة على النسج الظهارية المخاطية المحيطة بقسم عنق السن لقد تم تصنيف التهاب اللثة وفق المظاهر السريرية (مثال التقرح، النزف، التنخر) أو من حيث المسببات المرضية (دوائية، هرمونية، تغذوية، انتانية، محرض باللويحات) ومن حيث المدة (حاد، مزمن). إن أكثر الأنماط الالتهابية شيوعاً هو المزمن الناتج عن اللويحات.

يتضمن النمط االأكثر شيوعاً من التهاب اللثة تراجع حدود اللثة نتيجة تراكم اللويحات الجرثومية التي تشكلت نتيجة قلة النظافة الفموية. يستمر الالتهاب في التقدم إلى المرحلة البدئية فتتشكل لنا الآفات المبكرة والتي تتدهور فيما بعد لتصبح حالة مرضية متقدمة.

تبدأ المرحلة الأولى من الاستجابة الالتهابية الحادة النضحية خلال 4-5 أيام من تراكم اللويحة. ويزداد كل من السوائل اللثوية وهجرة العدلات. كما يتم ملاحظة تغير مواضع الفيبرين Fibrin وتدمر الكولاجين Collagen من خلال الرشح الأكبر للكريات الليمفاوية. يمكن أن تظهر الوحيدات والخلايا البلازمية. مع مرور الزمن، تصبح الآفات مزمنة وتتميز بوجود الخلايا البلازمية والخلايا البائية الليمفاوية. بينما تتطور الحالة الالتهابية لتتشكل جيوب تنفصل فيها اللثة عن السن. وتزداد هذه الجيوب عمقاً مما قد ينتج عنه نزيف دموي أثناء تفريش الأسنان، أو استعمال الخيط لتنظيف الأسنان، وحتى عند المضغ الطبيعي. وبينما تستمر هذه الحالة الالتهابية تبدأ الأربطة السنية بالتحطم ويتدمر السنخ العظمي الموضعي. ومن ثم يسقط السن.

عالمياً: تظهر الدراسات في أستراليا، السويد، بريطانيا، سويسرا، أن التهاب اللثة يصيب حوالي 48-85% من الأطفال بين عمر 3-6 سنوات، بينما معدل حدوث الإصابة حول العالم لدى البالغين عند المقارنة مع بيانات الولايات المتحدة يقدر ب 70-90%.

في الولايات المتحدة: يعتقد العديد من الأشخاص أن التهاب اللثة يبدأ في مرحلة مبكرة من الطفولة وأن حوالي 9-17% من الأطفال من عمر 3-11 سنة مصابون بالتهاب اللثة. عند البلوغ يزداد انتشار الإصابة ليصل إلى 70-90% من الأشخاص[1].

لقد تم ربط آفات ماحول السن عبر العديد من الدراسات كعامل مرتبط بالأمراض القلبية الوعائية والأمراض الوعائية الدماغية والسكتات حيث لوحظ انخفاض المؤشرات الالتهابية (مثل البروتين التفاعلي CRP) بعد معالجة التهاب اللثة وهذه العوامل ارتبطت بشدة

بالأمراض الوعائية. ولذا فإن معالجة التهاب اللثة قد يكون لديه نظرياً أثر إيجابي على السكتات الإقفارية. لكن مع هذا فلم يتم توضيح أي علاقة حقيقية بين هذه المعالجة وتحسن أمراض التصلب العصيدي [3].

لقد تم ربط أمراض التهاب ما حول السن أيضا بالولادة المبكرة لدى المرأة الحامل والنتائج السلبية على الحمل .لكن ومع هذا لم يثبت أن معالجتها أثناء الحمل قد يؤدي إلى نتائج إيجابية على الحمل[5].

2-6- قرحات الفم المتكررة Aphthous mouth ulcers:

القلاع أو تقرحات الفم النكاسة و المتكررة هو عبارة عن آفات تقرحية (حفرة صغيرة) تصيب غشاء الفم و الشفتين .

و هي قرحات مؤلمة و تنكس و تتكرر من وقت لآخر و هي تشفى لوحدها في أكثر الحالات خلال 10 -14 يوم .

و يخفف غسول الفم الحاوي على كلورهيكسيدين من الألم و يسرع شفاء قرحات الفم كما تمنع حدوث الإنتان الثانوي في تقرحات الفم القلاعية ولكنها لاتمنع ظهور تقرحات قلاع جديدة .

3-6- الأدوية المسببة للآفات الفموية ®Drugs Cause Oral Lesions[5]

هناك قائمة طويلة بالأدوية المسببة لالتهاب اللثة ونزيفها:

الأدوية التي تسبب نزيفاً لثوياً: مضادات التخثر، حالات الفيبرين

الأدوية التي تسبب التهاب اللثة: مثبطات البروتياز المستخدمة في معالجة الإيدز

(ساكوينافير)، فيتامين A ومشابهاته، ميزوبروستول، وأملاح الذهب.

4-6- المركبات التي تسبب التهاب اللثة والفم Compounds cause Gingivitis:

بسبب بعض الممارسات الطبيه الخاطئه لأطباء الاسنان لوحظ أن استخدام الزرنيخ ، البزموت ، الرصاص ، الزئبق ، النيكل .

الـــــبـــــاب الـــثـــانـــــي:

1- المقدمة

2- الكلور هيكسيدين

3-الخصائص الفارماكولوجية والاستعمال

الباب الثاني:

1-المقدمة Introduction:[58]

الكلورهيكسيدين CHX هو مُضاد جرثومي معروف Antimicrobial ينتمي إلى زمرة مركب البيغوانيد Biguanide Family يتميز بكبحه للالتهابات الجرثومية في الحفرة الفموية وهو يتخرب بأشعة الشمس.

يتوافر الكلورهيكسيدين بثلاثة أشكال :

1- ثنائي أملاح حمض الغلوكونيك(Digluconate) .

2- الخلات(Acetate) .

3- أملاح الهيدروكلوريد (Hydrohloride) .

معظم الدراسات ومعظم التراكيب والمنتجات الفموية استخدمت ثنائي أملاح حمض الغلوكونيك بتركيز 0.12% .

تنحل الأسيتات بشكل كافي و ينحل ثنائي الغلوكونات بنسبة أكبر حوالي 70% .

في حين لا تنحل أملاح هيدروكلورايد كلورهيكسيدين إلا بشكل ضئيل جداً .

يعتبر الكلورهيكسيدين مضاداً واسع الطيف فعالاً ضد الجراثيم إيجابية الغرام و سلبية الغرام و الفطريات و بعض أنواع الفيروسات .

و هو يقتل الكائنات الحية الدقيقة بطيف أوسع من المضادات الحيوية الأخرى و تعتمد آلية عمله عن طريق تأثيره على غشاء الخلايا .

الكلورهيكسيدين يقتل تقريبا 100% من جراثيم إيجابية الغرام و 100% من جراثيم سلبية الغرام خلال 30 ثانية.chlorhexidine fact.

يتصف الكلورهيكسيدين بكونه أساساً قوياً مع خواص ذات شحنة موجبة ، و يتوافر بشكلين أساس حر و أملاح مستقرة بلون أصفر أو أبيض :

- كلورهيكسيدين ثنائي أسيتات(CHA) .
- كلورهيكسيدين دي غلوكونات ، غلوكونات (CHG)
- CH .dihydrochloride
- CH.phosphanilate

الملحين الأخيرين سوائل شفافة عديمة اللون و الرائحة ، ذات طعم لاذع جداً .

بالنسبة للعناية بالصحة فإن الاستخدام المسوق هو CHG و هو الأكثر شيوعاً بشكل أملاح الكلورهيكسيدين ، و يمتاز بأن له القدرة على الإنحلال بالماء و إيصال الجزيئات بشكلها الفعال.

أما ال CHA فقد تم ربطه مع polyurenthane و أسطح أخرى للاستخدام في الأجهزة الطبية و أهمها القسطرة الوعائية .

الكلورهيكسيدين مركب آمن له تأثير مضاد جرثومي antibacterial و يستخدم للغسول الوعائي و تم استخدامه لعقود في الصناعة الدوائية كمعقم في العمليات الجلدية و محاليل التعقيم للجروح و العناية بصحة الفم .

2-الكلورهيكسيدين CHLORHEXIDINE:

2-1- لمحة تاريخية Historical Overview: [19.20]

ظهر الكلورهيكسيدين للمرة الأولى في مختبرات بريطانيا عام 1940 وتم تسويقه عام 1954 كمطهر للجروح الجلدية، واستعمل لأول مرة كمضاد إنتان عام 1956 وكمطهر في العديد من المجالات الطبية مثل العينية والجلدية والبولية والوقاية الفموية السنية حيث استعمل للمرة الأولى في طب الأسنان كمضاد إنتان قبل الجراحة وفي تطهير الأدوات اللبية .

تم البحث عن أثر الكلورهيكسيدين في كبح اللويحة للمرة الأولى عام 1962 لكن الدراسة الأولى التي سجلت آثاره كانت Loe and Schiott 1970 والتي أظهرت أن المضمضة لمدة 60 ثانية مرتين يومين ب 10 مل من 0.2 CHX % بغياب التفريش السني العادي يكبح تشكل اللويحة وتطور التهاب اللثة البدئي .

سجلت دراسات سريرية أخرى امتدت لعدة أشهر تراجعاً ملحوظاً في تشكل اللويحة بنسبة 45 - 61 % وبشكل أكثر أهمية تراجعاً ملحوظاً في الالتهاب اللثوي بنسبة 27 - 67 % .

يعتبر محلول الكلورهيكسيدين ذو النسبة 0.12 % متوفراً في الولايات المتحدة الأمريكية وهو العامل الأكثر فعالية في كبح تشكل اللويحة والتهاب اللثة .

الاستخدام الحالي:

لقد ظهر أن استعمال الكلورهيكسيدين مرتين في اليوم قد أنقص التعداد الإجمالي للجرائيم اللعابية حوالي 85-90%. كما أن استعمال مشاركة بين الفلور و الكلور هيكسيدين أحدث نقصا قدره 72% في النخور الملاصقة لكن لم يكن هناك نقصاً إحصائياً بارزاً في النخور الطاحنة ربما لأن الجزيئات المشحونة لم تستطع النفوذ إلى عمق الشقوق.

الآثار الجانبية غير المرغوب بها لمستحضرات الكلور هيكسيدين هي تلون الأسنان وحشوات الكمبوزيت وطعمها غير المستحب.

وقد طور Sandham فرنيش مضاداً للجراثيم حاوياً على الكلور هيكسيدين في صباغ النبزويم لدهن الأسنان بغرض إنقاص الانتانات بالعقديات الطافرة. وقد أدى ذلك إلى إنقاصها إلى كميات غير قابلة للكشف لمدة سنة كاملة بدون إعادة تطبيق لهذه المادة.

2-2 - الاسم العام و الصيغ Generic Name And Structure: [20]

1. الاسم العام Generic name:

كلور هيكسيدين غلوكونات Chlorhexidine Gluconate

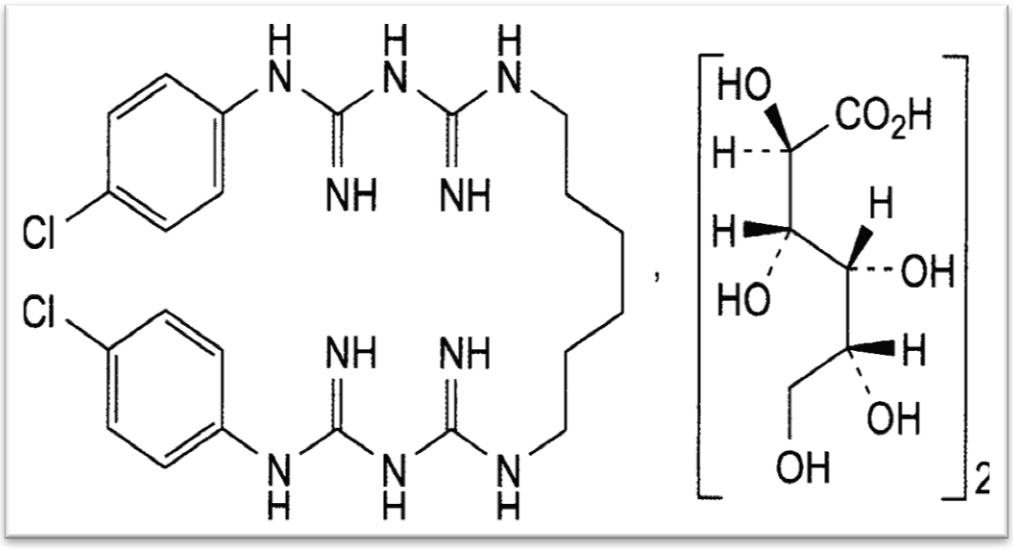
1,1 (hexane-1,6-diyl)bis[5-(4-chlorophenyl)biguanide] di-D- gluconate.

2. الصيغة الاجمالية | Generic structure:

$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10},2C_6H_{12}O_7 = 897.8$

3. الصيغة الكيميائية | Chemical structure:الشكل (1)

4. الصيغة المنشورة | Linear Structurer:الشكل (2)



3-2-الشكل المستعمل Dosage form:

- oral rinse

- كلورهيكسيدين غسول الفم يحتوي على 0.12% من كلورهيكسيدين غلوكونات

4-2- الخصائص الفيزيوكيميائية PHYSIOCHEMICA PROPERTIES: [20]

I. المظهر والوصف Appearance and characterization :

سائل عديم اللون تقريبا ويميل إلى الصفره وهو أساس مائي يحتوي على 11.6% كحول ، الغليسيرين ، PEG-40 ، سوربيتان

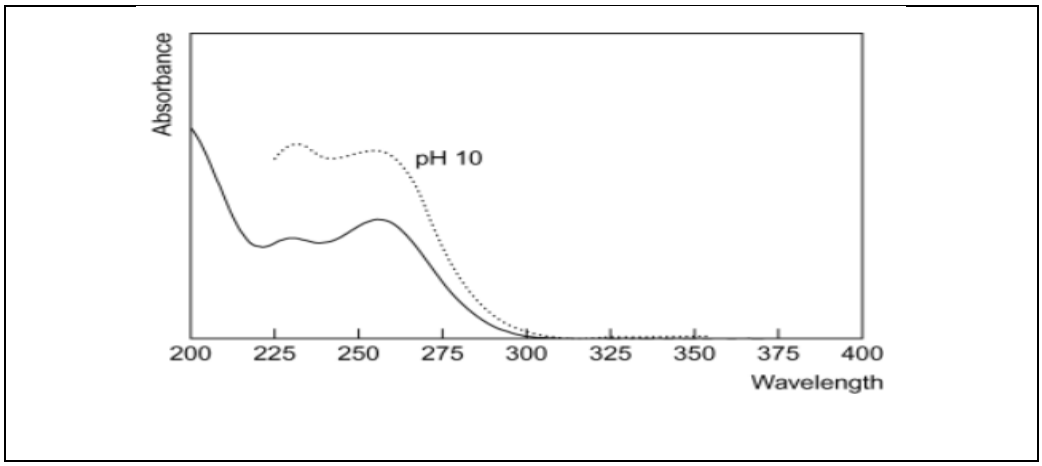
Diisostearate ، نكهة ، سكرين الصوديوم ، FD&Cالأزرق NO:1 .

منتج الكلورهيكسيدين غلوكونات محلول قريب للطبيعي (PH=5-7) و هو ملح من الكلورهيكسيدين و حمض الغلوكونيك .

A. **الانحلالية solubility** :قابل للامتزاج بالماء، مع الكحول ليس بأكثر من 5 أجزاء، ومع الاسيتون وليس بأكثر من 3 أجزاء.

B. **الامتصاصية Absorption** : 245UV nm في وسط محلول حمضي

الشكل (3) مخطط امتصاصية الكلورهيكسدين باستخدام جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية



C. **الكثافة النسبية**:تبلغ كثافته النسبية 1.06-1.07

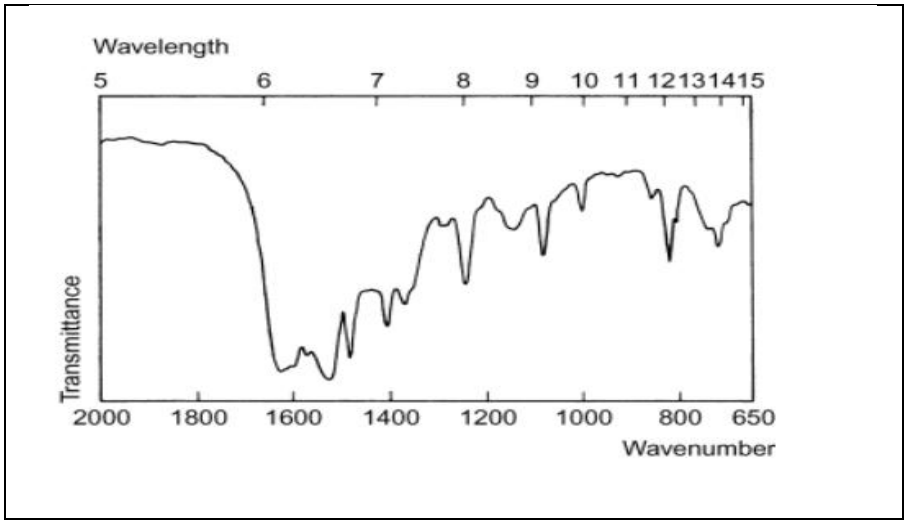
D. **باهاء المحلول** : يبلغ الpH لمحلول مائي بتركيز 5ح/ح من 5.5 إلى 7

E. **الذاتية**: يتم تحديد الذاتية وفق إحدى الطريقتين التاليتن :

وفق مطياف الأشعة تحت الحمراء IR.

حيث تظهر عصب الامتصاص الأساسية عند أطوال الأمواج التالية 1527، 1628، 1575، 1235، 820، 1080 (KBr disk) 1−cm.

الشكل (4) مخطط الأشعة تحت الحمراء لمادة الكلورهيكسيدين



1- كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقية TLC. وتكون معاير الكشف عن المادة بطريقة الTLC كالآتي:

System TA—Rf :33

system TB—Rf :00

system TE—Rf :13

system TAE—Rf: 01

2- باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC (وسيأتي تفصيله في القسم العملي) .

II. **المحتوى containing:** محلول مائي يحتوي على كلورهيكسيدين غلوكونات بمقدار 190غ/ل كحد أدنى وليس أكثر من 210غ/ل.

III. **الحفظ Storage:** لا تعبئ هذه المنتجات في عبوات زجاجية لان PH الباهاء تصبح اكثر قلوية بالزجاج.

أما البلاستيك فهو المادة المستعملة عادة بعبوات محكمة الإغلاق و بعيداً عن الضوء منعاً لتبخر المواد العطرية الطيارة أو الكحول .

يمكن تخزين ممدات محاليل الكلورهيكسيدين بدرجة حرارة الغرفة و صلاحيتها تبقى لمدة سنة شريطة أن تكون العبوة جافة مع تجنب التعرض الطويل لدرجات حرارة مرتفعة أو الضوء لأنها تؤثر بشكل قوي على ثبات هذه المحاليل .

كل ممدات هذه المحاليل المخزنة يجب أن تعالج بالحرارة (تعقيم او بسترة) أو كيميائياً بإضافة isopropanol %4 أو ethanol %7 للتخلص من إحتمالية التلوث الجرثومي و تعقيم المحاليل بالـ auto-clave بالدرجة 115C لمدة 30 دقيقة ، أو 121C لمدة 15 دقيقة .

اختيار الحاويات البلاستيكية أفضلها polypropylene و الزجاج الطبيعي هوالأفضل ، منعاً للارتشاح للمادة القلوية التي ترتشح من الزجاج الصناعي .

2-5-الثباتية stability: [50]

يكون الكلورهيكسيدين وأملاحه ثابتاً في درجات الحرارة الاعتيادية ولكن عندما تسخن يمكن أن تحلل لتنتج كميات ضئيلة من ال4-كلوريدأنيلين Chloride aniline يمكن لهذا التفكك أن يزداد عند وجود وسط ذي pH قلوية.

المحاليل المائية للكلورهيكسيدن تكون غالباً مستقرة و ثابتة في مجال7 -pH:5

أما عندما يكون ال pH >8 يترسب أساس الكلورهيكسيدين و في جو حامضي أكثر يحدث تخرب تدريجي للفعالية لأن المركب يكون أقل استقراراً ، أما ناتج التخرب الذي ينتج عن عملية الإماهة فهو p-chloraniline ، ينتج كمية قليلة منه.

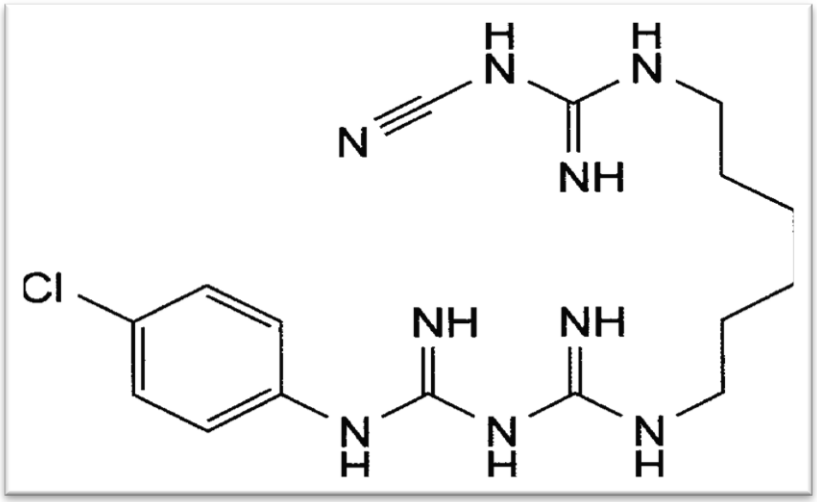
2-6- الشوائب Impurities:[58]

تكون الشوائب قليلة جداً في درجة حرارة الغرفة لكنها ترتفع عندما ترتفع الحرارة نتيجة التسخين خاصة بالوسط القلوي .

يكون الكلورهيكسيدين منحل بالماء بنسبة حتى 50 (w/v) ولكنه يشكل محلول لزج جداً.

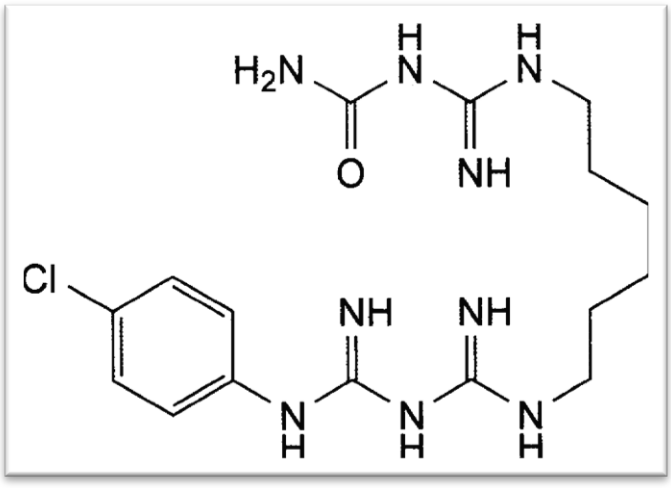
يمكن تعقيم المحاليل المددة من المحاليل التجارية المركزة بواسطة الموصدة Autoclave.

الشكل (5) الشوائب الدستورية



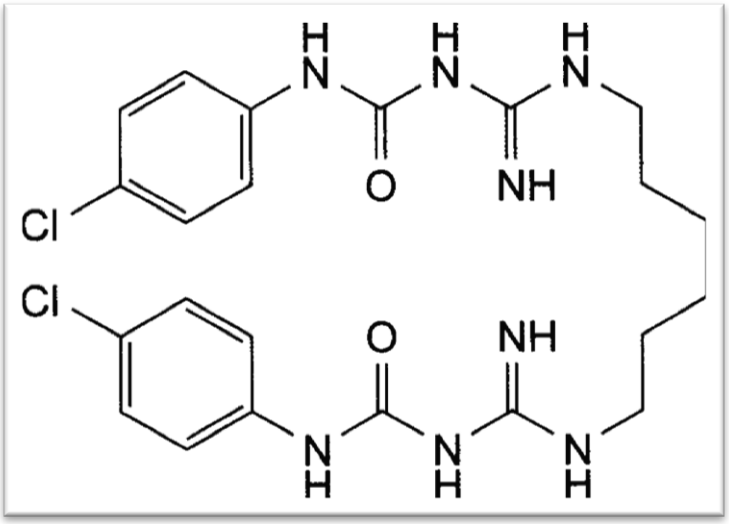
1-(4-chlorophenyl)-5-[6-[(cyanocarbamimidoyl)amino]hexyl]biguanide

الشكل (6) الشوائب الدستورية



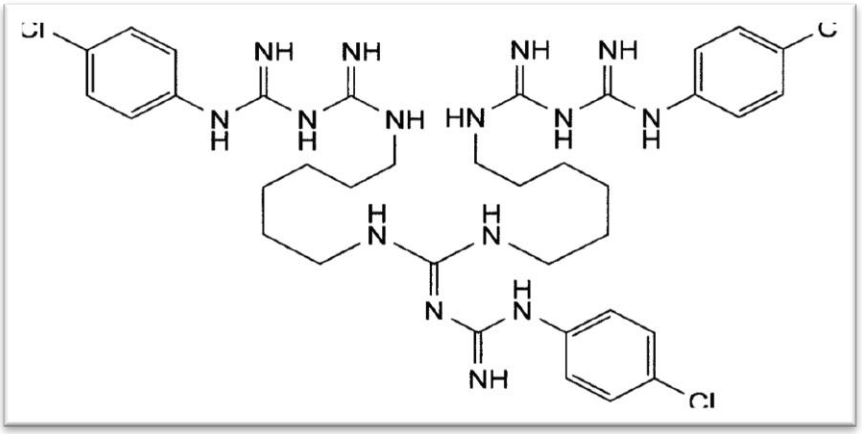
[[6-[[[(4-chlorophenyl)carbamimidoyl]carbamimidoyl]amino]hexyl]carbamimidoyl]urea

الشكل (7) الشوائب الدستورية



1,1□-[hexane-1,6-diylbis(iminocarbonimidoyl)]bis[3-(4-chlorophenyl)urea]

الشكل (8) الشوائب الدستورية



1,1□- (4-chlorophenyl)carbamimidoyl]imino]methylene]bis[imino(hexane-1,6- diyl)]]bis[5-(4-chlorophenyl)biguanide]

2-7- التنافرات[52] Repulsion:

تتنافر أملاح الكلورهيكسدين مع الصوابين والمواد الأنيونية. يمكن أن تنخفض الفعالية بوجود العوامل المعلقة مثل الألجينات وصمغ الكثيراء، والبودرة غير القابلة للانحلال مثل الكاؤلين، والمواد غير المنحلة من الكالسيوم والمعنزيوم والزنك.

بتركيز 0.05% تتنافر أملاح الكلورهيكسيدين مع البورات، البيكربونات، الكاربونات، الكلوريدات، السيترات، النترات، الفوسفات، والسلفات، وتشكل أملاحاً قليلة الانحلال يمكن أن تترسب في المحلول.

عند التركيز 0.01% تكون هذه الأملاح عادة ذوابة. كما يمكن أن تتشكل الأملاح غير الذوابة عند استخدام الماء القاسي.

كما تفقد أملاح الكلورهيكسدين فعاليتها عند استخدام الفلين.

لوحظ التداخل بين غلوكونات الكلورهيكسيدين و الهلامة المائية لعديد (2-هيدروكسي متيل ميتاكريلات) و التي هي المكون لبعض العدسات اللاصقة المحبة للماء .

2-8- الأشكال التجارية للكلورهيكسيدين Commercial Forms:

تم تسويق الكلورهيكسيدين بأشكال تجارية عديدة.

2-8-1- المضامض Gargles :

محلول مائي / كحولي لـ 0.2 % من الكلورهيكسيدين وهو أول منتج ظهر في أوروبا وتوفر كمضامض فموية يستعمل مرتين يومياً . كما أن محلول بـ 0.2 % أصبح متوفراً أيضاً لكن الأسئلة ظلت مطروحة حول فعاليته في بعض المناطق.

فيما بعد ظهر في الولايات المتحدة الأمريكية شكل تجاري يحتوي على مضامض 0.12%.

لكن للحصول على التأثير المطلوب كانت جرعة المضمضة تساوي 15 ml .

وقد كشفت الدراسات أن تأثيره مساوٍ لتأثير التركيز 0.2 % عند استعماله بالجرعة المطلوبة.

2-8-2- الجل أو الهلام Gel:

1% كلورهيكسيدين جل كان الشكل التجاري الثاني المتوفر لل CHX ويمكن استعماله بالتفريش أو بوضع طبقة منه على الأسنان .

إن توزيع الجل في أنحاء الفم يبدو ضعيفاً ولا بد للمستحضر من ملامسة كل السطوح السنية حتى يكون فعالاً حالياً يوجد جل بتركيز 0.2 % و 0.22 %.

2-8-3- البخاخ Sprays:

يتوافر بخاخ CHX في بعض البلدان الأوروبية وأظهرت الدراسات على بخاخ الكلورهيكسيدين 0.2 % أن جرعة ضئيلةً منه تتراوح حوالي 2-1mg تصل لجميع السطوح السنية وتؤدي لكبح لويحة مشابه لتأثير المضامض 0.2 % .

يبدو البخاخ مناسباً للاستعمال لدى الأشخاص المعاقين عقلياً وجسدياً ويظهر قبولاً جيداً عندهم .

2-8-4- معاجين الأسنان Toothpastes :

من الصعب تشكيل الكلورهيكسيدين كمعجون أسنان بسبب عدم التأكد من ملامسته لكامل السطوح السنية.

بالرغم من أن الدراسات السريرية أظهرت بأن هذا الشكل فعال جداً وحالياً يوجد العديد من المعاجين الحاوية على CHX والتي أظهرت إثباتات على فعاليتها

2-8-5- الفرنيش Varnishes :

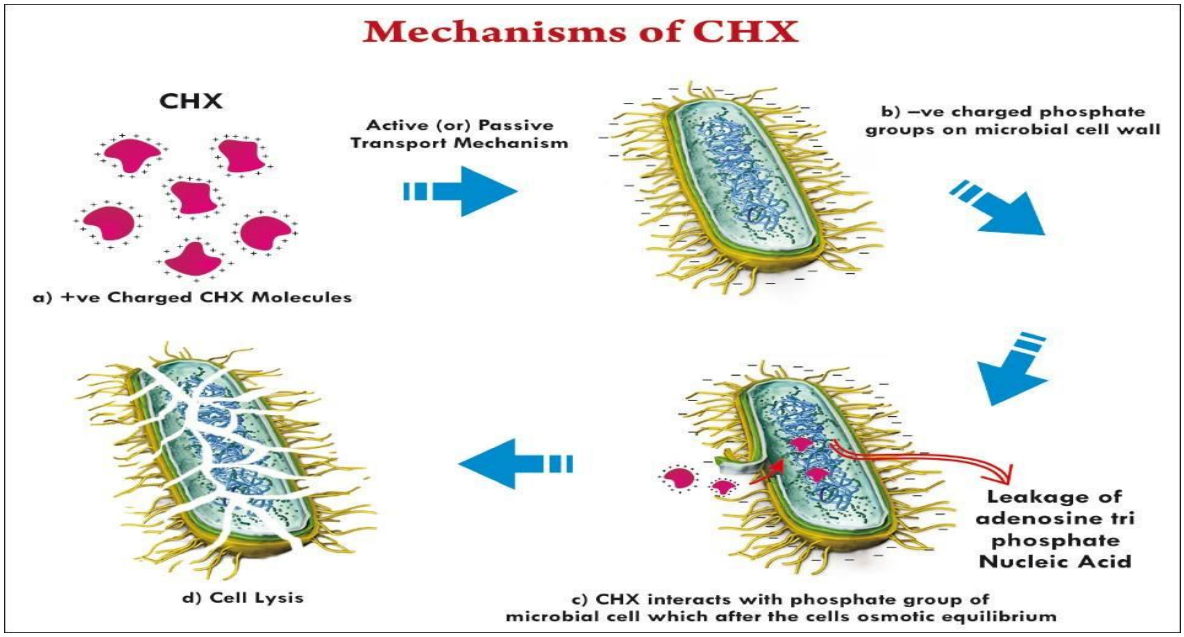
يستعمل فرنيش الكلورهيكسيدين بشكل رئيسي للواقية من نخور الجذور والأعناق بدلاً من تطبيقه على كامل الفم.

إن جميع الأشكال السابقة فعالة إذا ما تم استعمالها بالطريقة الصحيحة وتبدي تأثيراً متشابهاً أيضاً للسطوح السنية، إلا أن تغيرات الذوق وتقرحات المخاطية الفموية لم تذكر مع استعمال البخاخ والجل ومعجون الأسنان.

2-9- الفعالية المطهرة و آلية التأثير Antiseptic Activity and mechanism of action:[10]

يعتبر الكلورهيكسيدين العامل الأكثر فعالية من المواد المستخدمة كغسولات فموية مضادة للبكتريا، وهو مادة كاتيونية تلتصق بكثير من السطوح في الفم سواء الأسنان أو النسج المخاطية وسطوح معظم البكتريا التي تكون عادة سلبية الشحنة أنيونية،[13] وقد بينت الدراسات طويلة الأمد المجراة على 700 مادة تناقص معدل تشكل اللويحات بمقدار 55% وتناقص معدل حدوث التهاب اللثة بمقدار 45%[2]، ويساعد في الحفاظ على الصحة الفموية بعد إجراءات تنظيف الأسنان العميقة[3]

الشكل (9)آلية تاثير الكلورهيكسيدين على البكتيريا



مفعوله المديد ؛ يتبقى 30% من كلورهيكسيدين غلوكونات في الفم بعد المضمضة [1]، وبعض الدراسات تشير إلى بقاء مفعوله لمدة 12 ساعة [13] فالكلورهيكسيدين يملك تأثيراً فورياً قاتلاً للبكتريا وتأثيراً مديداً موقفاً لنموها نتيجة التصاقه على السطوح [4].

وعند تحليل اللويحة الجرثومية تبين حدوث انخفاض في التعداد العام للبكتريا المدروسة سواء كانت هوائية أو لا هوائية بمجال 54-97% خلال فترة استعمال ستة أشهر، ولم يسفر استعمال الغسول لمدة ستة أشهر في تغيرات مهمة على المقاومة البكترية أو نمو لميكروبات انتهازية مهمة أو أي تغيرات خطرة في نظام بيئة الفم البكتيري، وبعد التوقف لثلاثة أشهر عادت اللويحة الجرثومية لمستوياتها الأولى من عدد البكتريا ولم تتغير نسبة مقاومة البكتريا للكلوهيكسيدين عن بداية العلاج [1] تتعلق آلية التفاعل للكلورهيكسيدين بمكافحته لتشكل الجُليدة (غشاء رقيق) Pellicle وتعديلها لامتصاص الخلية الجرثومية و التصاقها بالسن و تعديلها أيضاً لجدار الخلية الجرثومية ليحدث الانحلال Lysis [10] وتأثيره على البكتريا الإيجابية الغرام أقوى من البكتريا السلبية الغرام.

يمتلك الكلورهيكسيدين فعالية تجاه الجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام والخمائر والفطور، الجراثيم اللاهوائية والهوائية وبعض الفيروسات مثل (HBV, HIV) و يمتلك الكلورهيكسيدين فعالية مبيدة.

إلا أن الاستعمال الطويل للـ CHX يؤدي لتبدل في تركيبة الفلورا الفموية لكن هذا التبدل يزول مباشرة بعد إيقاف الاستعمال.

تمتد فعالية CHX حتى 12 ساعة مع بقاء آثار له حتى 24 ساعة ويعمل CHX في pH قريب للاعتدال لكنه يبقى فعالاً حتى pH = 3.5 .

قد يُضاف للـCHX مواد أخرى بهدف زيادة فعاليته كما يمكن أن يكون ضمن مستحضرات خالية أو حاوية على الكحول.

• بالنسبة للتراكيز الضعيفة |Low concentrations:

يرتبط الكلورهيكسيدين بقوة إلى غشاء الخلايا الجرثومية حتى بالتراكيز الضعيفة وهذا يؤدي إلى زيادة نفوذية الجرثوم .

• بالنسبة للتراكيز العالية | High concentrations:

تؤدي إلى تخثر السيتوبلاسما الجرثومية Bacterial Cytoplasm وبالتالي موت الجرثوم.

بعكس بعض المواد الأخرى فإن ال CHX يظهر فعلاً متواصلاً مضاداً للجراثيم يمتد حتى 12 ساعة.

تظهر الدراسات تحريراً ضعيفاً لل CHX من السطوح التي امتصته ولذا فهي تقترح أن هذا هو سبب امتداد زمن البيئة غير الملائمة لنمو الجراثيم.

في العديد من الدراسات الحالية اقترح بأن كبح اللويحة يتم فقط بسبب امتصاص الكلورهيكسيدين ضمن السطوح السنية. يبدو أن كبح CHX للويحة يتأثر بمقدار جرعته وتركيزه .

إلا أنه من الممكن الحصول على نفس تأثير التركيز العالي باستعمال ضعف الكمية من سائل المضمضة.

3-الخصائص الفارماكولوجية واستعمال الدواء | Pharamcological ropperties and uses:

الحرائك الدوائية | Pharmacokinetics:[19]

الامتصاص: إن دراسات حركية الدواء لغسول الفم كلورهيكسيدن تشير إلى أنه يتم الاحتفاظ بحوال 30% من المكون الفعال للغلوكونات في تجويف الفم بعد شطفه و يتم تحرير هذا الدواء ببطئ في سوائل الفم .

و قد أثبتت الدراسات التي أجريت على عدد من الأشخاص و الحيوانات أن امتصاص الكلورهيكسيدين ضعيف من قبل الجهاز الهضمي .

وقد بلغت ذروة مستوى الكلورهكيسيدين 0.206µg بعد 30 دقيقة من تناول جرعة 300mg من الدواء .

و كانت المستويات التي يمكن اكتشافها من الكلورهيكسيدين لم تكن موجودة في البلاسما لهذه المادة بعد 12 ساعة من إعطاء المركب .

زمن الوصول للتركيز البلازمي: لا يمكن التقاط أي تركيز بلازمي بعد 12 ساعة من استخدامه.

الاطراح: يتم طرح الكلورهيكسيدين في الدرجة الأولى من خلال البراز 90% تقريبا و في البول أقل من 1%.

الحمل[20]:

يعد من الأدوية المنتمية لجدول التصنيف الحملي C ولذا يجب استخدامه عندما تفوق الفائدة منه الأضرار .

في حال ابتلاع المستحضر:

إن الأثر الوحيد هو تخريش المخاطية وتعد السمية الجهازية نادرة نظراً لضعف امتصاصه من السبيل الهضمي. وقد تم اقتراح استخدام الغسيل المعدي مع الملينات في حالة الابتلاع الكثير.[3]

4- التحذيرات و السمية | Cautions and Toxicity:

أ- فرط التحسس Hypersensitivity للمستحضر.
ب- تلون السطح الفموي (الأسنان، اللسان، المخاطية،) و تبقعات الكلورهيكسيدين Chlorhexidine Ctaining. ويمكن أن تظهر بعد أسبوع من العلاج ويكون التصبغ أشد عندما يتواجد تراكم شديد للويحات غير المزالة وعندما يكون للحشوة السنية سطح خشن.
ليس للتصبغ أي أثر سريري ضار .
إن الشوارد المعدنية والمطهرات التي ترتبط موضعياً على المخاطية الفموية والأسنان يمكنها أن تتفاعل مع عديدات الفينولات في المواد الغذائية المولدة للأصبغة وينتج بذلك تبقعات لونية مختلفة.
المشروبات وبشكل خاص القهوة والشاي والنبيذ الأحمر هي مولدات صباغ ولكن حتى الأطعمة الأخرى والمشروبات تتفاعل مع الغسول الفموي و ينتج عنها تبقعات لونية مختلفة .

سيكون التأثير السلبي أكثر وضوحاً عند المرضى الذين لديهم طبقة أسمك من البلاك غير المزالة، إن ظهور البقع الناتجة عن استخدام هذا المستحضر لا تؤثر سلباً على صحة اللثة أو الأنسجة الأخرى في الفم و يمكن إزالة هذه البقع من معظم أسطح الأسنان من خلال تقنيات وقائية تخصصية . إذاً يجب استبعاد استخدام غسول الكلورهيكسيدين للمرضى الذين لديهم استعداد لتشكل البقع بشكل دائم .

ج- أثر التبقعات: [18]

ليس للتصبغ أي أثر سريري ضار لكن بسبب عدم القدرة لاحقاً على إزالته يجب أن يخبر المريض باحتمالية دوام الأثر الملون للسن .

تفسيرها: إن الشوارد المعدنية و المطهرات التي ترتبط على المخاطية الفموية و الأسنان يمكنها أن تتفاعل مع عديدات الفينولات الموجودة في المواد الغذائية المولدة للصبغة و ينتج بذلك تبقعات لونية مختلفة فالمشروبات و بشكل خاص القهوة و الشاي و النبيذ الأحمر هي مولدات صباغ ، حتى الأطعمة الأخرى و هذه المشروبات تتفاعل مع الغسول الفموي و ينتج عنها تبقعات لونية .

إن استعمال غسول الكلورهيكسيدين عند بعض المرضى قد يؤدي إلى تغير في قدرة تحديد الطعم و المذاق أثناء مدة علاجهم بهذا المستحضر ، و قد تم الإبلاغ عن حالات نادرة حدث عندهم تغير دائم في قدرة تحديد الطعم و المذاق .

يمتلك الكلورهيكسيدين سمية جهازية منخفضة جداً لدى الإنسان كما لم تتطور ضده أية مقاومة مكتسبة تستحق الذكر من قبل العوامل الممرضة داخل الفموية وهو لم يترافق بأية تغيرات ماسخة للأجنة . إن التركيبة مزدوجة الكهرسلبية (مزدوجة الروابط السالبة) للـ CHX تقلل من امتصاصه عبر الجلد والغشاء المخاطي بما في ذلك مخاطية المعدة والأمعاء لذلك

فإن التسمم الجهازي من جراء التطبيق الموضعي لم يُذكر فيما عدا حالات تحسسية نادرة جداً ظهرت على الحيوانات، لكنه كان مركباً جيد التحمل حتى عند الحيوانات وقد تم تطبيقه سلفاً على الإنسان دون اختبارات سابقة.

LD50 (mouse,IV) = 0.02 g/kg

LD50 (rat,IV) = 0.02 g/kg

LD50 (mouse,SC) = 0.63 g/kg

LD50 (rat,oral) = 9.2 g/kg

إن استعمال غسول كلورهيكسيدين عند بعض المرضى قد يؤدي إلى تغير في قدرة تحديد الطعم و المذاق أثناء مدة علاجهم بهذا المستحضر.[1].

قد تم الإبلاغ عن حالات نادرة حدث عندهم تغير دائم في قدرة تحديد الطعم و المذاق ،تهيج جلدي وفموي، تصبغ الأسنان، التهاب القصبات الهوائية، تغير في حس الذوق، ألم سني ، تهيج جلدي وفموي، تصبغ الأسنان، التهاب القصبات الهوائية، تغير في حس التذوق، ألم سني.

5-الاستخدام Usage: [19]

يستخدم غسول الفم كلورهيكسيدن مرتين يومياً كجزء من البرنامج المخصص لعلاج اللثة الذي يعرف باحمرار و تورم اللثة بما في ذلك نزف اللثة.

1- عامل مساعد في إجراءات الصحة الفموية وعامل وقائي :

يعمل الكلورهيكسيدين على تحسين الصحة الفموية من خلال السيطرة على اللويحة وخاصة

بشكل وقائي بعد التخلص من اللويحة .

2- بعد العمل الجراحي الفموي متضمناً الجراحة اللثوية وتسوية الجذور :

يمكن أن يستخدم الكلورهيكسيدين بعد العمل الجراحي حيث أن التنظيف الميكانيكي بعد الجراحة يكون صعباً .

إن استخدام الكلورهيكسيدين مع وجود ضماد لثوي يحد من فعالية الكلورهيكسيدين حيث أنه لا ينفذ تحت الضماد .

3- المرضى ذوي التثبيت الفكي :

إن إجراءات الصحة الفموية عند هؤلاء المرضى تكون صعبة التطبيق وبالتالي نستخدم الكلورهيكسيدين للسيطرة على اللويحة .

4- عند المرضى ذوي الاحتياجات الخاصة جسدياً وعقلياً :

وخاصة الإرذاذ بتركيز 0.2% .

5- الأشخاص المعرضون للإنتانات الفموية :

وهم المرضى الذين يتلقون معالجة كيميائية أو شعاعية أو المصابين بالاعتلالات الدموية ومرضى زرع النقي .

هؤلاء الأشخاص مؤهبين للإصابة ببعض الإنتانات الفموية وخاصة المبيضات.

أظهر الكلورهيكسيدين فعالية في هذا المجال وعلى الأخص عندما يستعمل مع أدوية مضادة للفطور مثل النيستاتين Nystatin والأمفوتريسين "B" AmphotericinB.

ويكون الكلورهيكسيدين ذا تأثير كبير جداً عندما يبدأ استخدامه قبل نشوء الاختلاطات الفموية أو الجهازية .

6- المرضى المعرضين للإصابة العالية بالنخور :

إن استخدام مضامض أو جل الكلورهيكسيدين يمكن أن ينقص بشكل جيد أعداد العقديات الطافرة في الأفراد المعرضين للنخور .

والكلورهيكسيدين يتآزر مع الفلور حيث أن الجمع بين مضامض الكلورهيكسيدين و الفلور مفيد لمثل هؤلاء الأشخاص .

7- القرحات الفموية الناكسة :

هناك دراسات متعددة أظهرت بأن مضامض وجل الكلورهيكسيدين تنقص مدة وشدة القرحات القلاعية الصغيرة الناكسة . آلية العمل غير واضحة ولكن يمكن أن تكون بإنقاص التلوث بالبكتريا الفموية.

ويكون ذلك باستخدام الكلورهيكسيدين 3 مرات في اليوم لعدة أسابيع.

8- المرضى الذين لديهم أجهزة تقويم ثابتة أو متحركة :

يمكن أن يوصف الكلورهيكسيدين خلال 4-8 أسابيع الأولى من المعالجة .

بالإضافة إلى أنه يمكن أن ينقص عدد وشدة القرحات المرضية خلال أربع أسابيع الأولى من المعالجة التقويمية الثابتة .

6- معايرة و تحري الكلورهيكسيدين Assay And Identification:

6-1- مقدمة عامة عن الاستشراب (كروماتوغرافية): [31]

هي عملية تحليلية يجري من خلالهاتفريق مزيج مواد منحله ضمن جملة طورين أو أكثرنتيجة لفعل مايسمى الهجرة التفاضلية الديناميكيةحيث يتحرك أحد أطوارالجملةبشكل مستمر في اتجاه محدد،بينما تأخدكل مادةمن مزيج المواد المذابة تحركا متباينا‌عن المواد الأخرى تحت تأثير عاملاو بعض العوامل التالية

الامتزاز .التوزع،الذوبانية،الضغط البخاري،الحجم الجزيئي،كثافة الشحنة الايونية.

6-2-آلية عمل الكروماتوغرافية

توصف الأنظمة المستخدمة في الكروماتوغرافيا عادة بأنها تتبع إحدى الآليات الأربع الأساسية وهي:

- الادمصاص. التبادل الشاردي.
- التوزع. الاستبعاد الحجمي.

6-3- الأدوات المستخدمة بشكل عام:

مخزن يحوي الطور المتحرك.

مضخة تدفع الطور المتحرك خلال جملة فصل بضغط عالي.

حاقن يقدم العينة الى الطور المتحرك .

عمود. مكامل.

مكشاف. المتحري

مجموعة جمع المعطيات(حاسوب) مسجل.

وتتضمن:

Refractive index detector

Photodiode array detectors

Fluorescence detector

Electrochemical detectors

Hyphenated techniques

6-4- التقنيات الكروماتوغرافية Chromotography Technique:

6-4-1- تقنية كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة TLC:

مقدمة : [32]

تعد تلك التقنية من التقنيات الشائعة الاستخدام لفصل والتعرف على الأدوية [32] القابلة للتطبيق سواء كانت المادة نقية أو مستخلصة من الصيغ الصيدلانية، أو من العينات البيولوجية. لقد استحدثت تقنية الTLC التي نعرفها اليوم في خمسينيات القرن الماضي مع تقدم الطرق المعيارية التي حسنت من أداء عمليات الفصل وتكراريتها ومهدت لها الطريق للنزول إلى الأسواق التجارية.

آلية العمل: [28]

يتم إجراء هذه التقنية على صفيحة من الزجاج أو البلاستيك أو الألمينيوم مغطاة بطبقة رقيقة من مادة مدمصة عادة ما تكون السليكاجل Silica Gel أو أكسيد الألمينيوم Aluminum Oxide أو السليلوز Cellulose وتعرف بالطور الساكن[31].

يتم تطبيق المادة المراد فصلها ومن ثم توضع الصفيحة بالتماس مع مزيج محل يتحرك عبر الطور الساكن بسبب الخاصية الشعرية ، ولأن المكونات المختلفة تتحرك على الصفيحة بسرعات مختلفة فهذا ما يسبب فصل المواد عن بعضها البعض.

لقد تم إجراء العديد من التحسينات فأصبحت بعض الخطوات مأتمتة مما زاد من الحساسية والدقة الكمية الخاصة بالطريقة وأصبحت تسمى بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء HPTLC أو TLC "high performance" .

طريقة التحليل: [28]

من الممكن أن لا تكون المواد ملونة بعد أن تنفصل عن بعضها البعض ولذا فهناك العديد من التقنيات لإظهارها نذكر منها:

إضافة مادة متفلورة مثل المنغنيز إلى سليكات الزنك المنشط مما يجعل من الطور الساكن يلمع عند تعرضه للأشعة فوق البنفسجية UV بطول موجة nm254 وتبقى بقع المواد التي ارتحلت على الصفيحة خافتة الفلورة.

- أبخرة اليود تعد من الكواشف اللونية العامة وغير النوعية.
- الكواشف اللونية النوعية[32] يمكن أن توجد في الطور السائل الذي وضعت الصفيحة على التماس معه أو أن يتم إرذاذها على الصفيحة ونذكر منها:

. برمنغنات البوتاسيوم

. اليود.

- في حالة المواد الليبيدية، من الممكن أن يحول المخطط الكروماتوغرافي إلى غشاء PVDF (Polyvinylidene Fluoride) ومن ثم تجرى عملية تحليل لاحقة على سبيل المثال عبر مطياف الكتلة أو تقنية تعرف ب Far-Eastern Plotting.

حالما تظهر البقعة يتم تحديد قيمة ال Rf أو معامل التأخر، من أجل كل نقطة يمكننا أن نقسم المسافة التي قطعها المركب عن نقطة البداية إلى المسافة التي قطعها المحل عن خط البداية.

6-4-2- تقنية الكروماتوغرافيا السائلة HPLC: [31]

الاستشراب الكروموتوغرافي هو تقنية لفصل مكونات مزيج ما كل على حدة و عادة تفضل طرق الاستشراب السائل رفيع الإنجاز High Performance Liquid Chromatography (HPLC) على الطرق المتبعة الأخرى في التحليل الكمي و ذلك لنوعيتها المثالية للحليلة Analyte أو الحلائل المراد فصلها ، بحيث نحصل على فصل نوعي و دقيق لمكونات المزيج المراد التعرف عليها .

لقد تطور استخدام ال HPLC بشكل كبير خلال العقود الماضية ففي الستينات تم وضع الأسس و المبادئ النظرية لهذه التقنية ، و شهدت تقنية الHPLC في تسعينيات القرن الماضي نمواً عظيماً جعل منها الطريقة التحليلية الأكثر شيوعاً وفقاً لمبيعات أدواتها وأيضا للأهمية العلمية التي قدمتها، وقد جاءت شعبيتها نتيجة قيامها بعمليات فصل جيدة لطيف واسع من أنواع

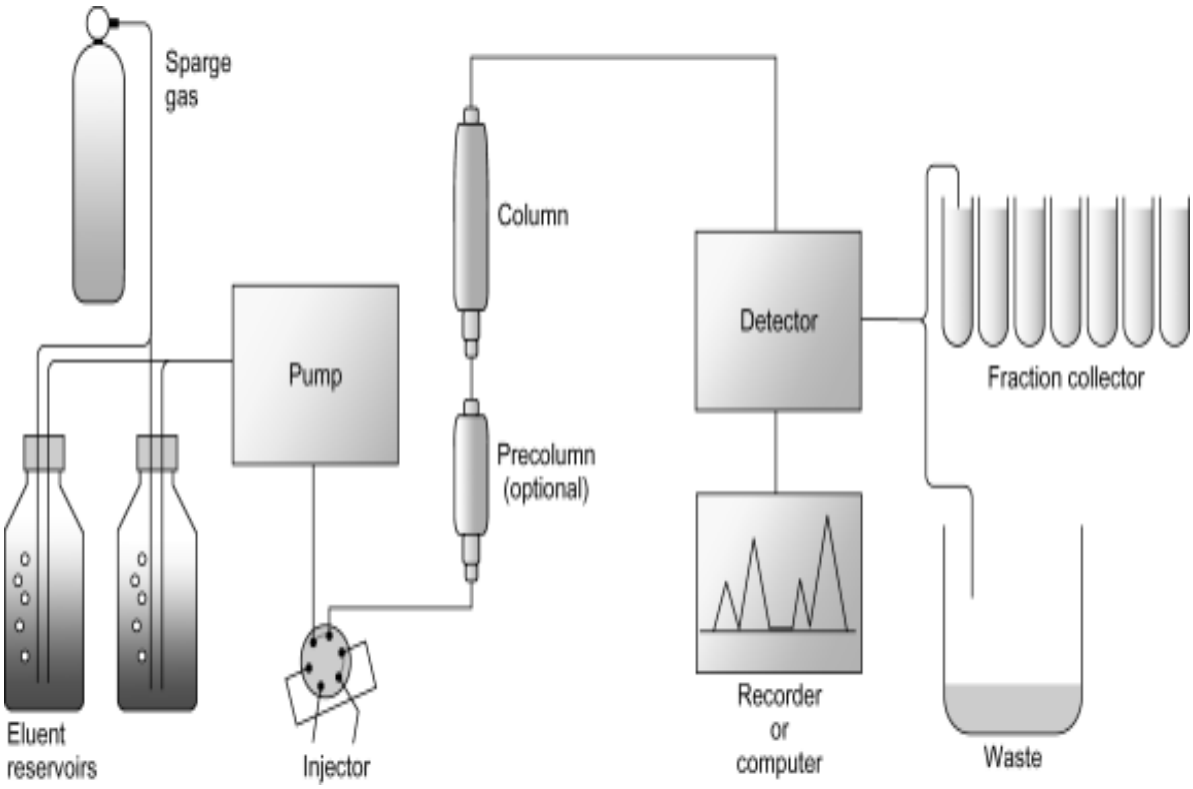
العينات، سرعة أدائها وحساسية الكشف التي وصلت إلى نانومولnmol. يتم استخدامها حالياً في البحوث الصيدلانية والتطوير لأجل:

- تنقية المنتجات المصطنعة أو الطبيعية.
- لتحديد المستقلبات.
- لمعايرة المركبات الفعالة، الشوائب، نواتج التخرب.
- في الدراسات الفارماكوديناميكية والحرائكية.

يشمل التطور الحاصل على طريقة الHPLC في السنوات الأخيرة كل من :

- التعديل على مواد التحميل، مثل أجزاء أصغر حجماً، تقنيات ومواد تحميل للعمود جديدة.
- التعديل على سرعة الفصل.
- Micro-HPLC، وتشمل التحسينات الحاصلة من خلال الأتمتة والحوسبة.
- التحسن في تقنيات الكشف، من بينها التقنية المدعوة أنظمة الكشف الموصلة
- Hyphenated Detection Systems.

الشكل (10) نظام الHPLC النمطي [27.26]



3-4-6- مقايسة الكلورهيكسيدين باستخدام الطريقة الحيوية Biological assay:[36]

وضعت السلطات الناظمة المختلفة في أوروبا لاختبارات الفعالية المضادة للجراثيم التي يملكها المطهر في أوروبا (المعايير الأوربية أو المعايير الإنكليزية، أو المعايير الألمانية أو الفرنسية) وفي أمريكا الشمالية (كمنظمة الغذاء والدواء الأمريكية FDA و EPA سلطات حماية البيئة أو AOAC رابطة الكيميائيين التحليلين) والتي ارتبطت بمحاولات انتاج بعض المعايير لاختبارات التعقيم. ربما تكون طريقة Kampf و colleagues (2002)الأكثر سهولة والمعدة لاستبيان القدرة القاتلة التي يمارسها المطهر على الجراثيم والفطور والفيروسات

و هي طريقة دستورية تعتمد على تقييم الفعالية القاتلة للكلورهيكسيدين على الجراثيم عند العمل على تراكيز معلومة من الكلورهيكسيدين و من المادة المعيارية و هي مادة تم تحديد تركيزها وفعاليتها مسبقاً، ويتم إجراء المقايسة بطريقة معلق الاختبار حيث يتم إجراء معلقات معيارية للجراثيم ثم تطبيق التمديدات الملائمة من المطهر و تم اختيار الفترات الزمنية الفاصلة بحسب بروتوكول الدراسة و من ثم تم العد الحيوي بعد إيقاف عمل المطهر بواسطة التمديد أو إضافة مادة تبطل مفعوله كالعوامل الفعالة على السطح.

و من المعروف أن المطهر المقبول الذي يقتل 99.999% من الجراثيم أو خمس دورات قتل لوغاريتمية يكون قد حقق المقاييس الدستورية .

ثانياً:القسم العملي

Second: Practical Part

الباب الأول

هدف الدراسة | Aim of study:

و باعتبار أن هذه المنتجات تصنف ضمن مجموعة OTC الأدوية التي تباع على الرف، ولكون الغراغر (الغسولات الفموية) من الأشكال الصيدلانية الشائعة الاستخدام في المجتمع ويعد الكلورهيكسيدين من أهم المواد الفعالة المستخدمة في هذه الغراغر.

كان هدف البحث إيجاد برنامج دراسة متكامل (برتوكول) للوصول الى الأهداف التالية:

1- اجراء مسح ودراسة تراكيز كلورهيكسيدين الموجودة في بعض الغسولات الفموية أو الغراغر لبعض الأصناف الموجودة في السوق الدوائية المحلية باستخدام طريقة الاستشراب السائل رفيع الانجاز .

2- مراقبة نسبة المادة الفعالة (الكلورهيكسيدين) في هذه الغسولات الفموية المفتوحة و دراسة تغيير تراكيزالمادة الفعالة بعد فتح العبوات خلال فواصل زمنية تبدأ من الصفر من تاريخ الفتح و لمدة ثمانية أسابيع و ذلك بالطريقة التحليلية الكروموتوغرافية(الاستشرابية السابقة) و الطريقة المعتمدة هي طريقة الاستشراب السائل رفيع الإنجاز.

3- دراسة و مراقبة فعالية المادة الفعالة (الكلورهيكسيدين)حيوياً في هذه الغسولات اعتباراً من تاريخ الفتح و خلال الفواصل الزمنية السابقة..

4- المقارنة بين نتائج المقايسة بالطريقتين التحليلية الكروماتوغرافية والطريقة الحيوية الجرثومية.ودراسة العلاقة بين النتائج بهاتين الطريقتين.

الباب الثاني: المواد و الطرائق

Methods And Materials:

1- **مقايسة مادة الكلورهيكسيدين الموجودة في الغسولات الفموية باستخدام طريقةالاستشراب السائل رفيع الإنجاز**

2- **مقايسة مادة الكلورهيكسيدين الموجودة**

<u>أولاً:</u> مقايسة مادة الكلورهيكسيدين الموجودة في الغسولات الفموية باستخدام طريقة السائل رفيع الانجاز .

1-1-الأجهزة و ألأدوات:

- جهاز كروموتوغرافيا سائلة رفيعة الإنجاز HPLC من نوع Jasco ألماني الصنع مزود بما يلي :

1- مضخة L-2130 Pumpخاصة بالكروماتوغرافيا.

2- حاقن آلي L-2200 Auto Samplerخاص بالكروماتوغرافيا.

3- مكشاف / UV photo diode array detector L-2455 من شركة Japan – Hitachi

4- نازع غازات Degasser

5- EZ chrom ELITE software لمعالجة البيانات.

*جهاز أمواج فوق صوتية Ultrasonic لشركة Daihon -Korea

* عمود الفصل C18 (micron10×ml4.6×cm25) octa decyl silane لشركة Germany Knour

*جهاز قياس حموضة PH-meter من شركة Germany-Sartorius.

* مراشح إلكترونية من نوع HPLC من شركة Germany-Sartorius.

*ميزان حساس نوع ED2245حساسيته 0.001 mg من شركة Germany-Sartorius.

*دوارق معايرة حجمية لها الحجوم (100مل-50مل-10مل) و ممصات معايرة بحجوم (5مل-4مل-2مل-1مل-0.5مل) و زجاجيات ذات حجوم مختلفة و Micropipette مدرج من (1إلى100ميكرون).

1-2- المواد:

1-2-1-المادة العيارية:

تم الحصول على المادة العيارية من مخبر الرقابة الدوائية في وزارة الصحة في الجمهورية العربية السورية و المصنع من قبل شركة Unipharma للصناعات الدوائية و المصنع من قبل شركة Bire و كان رقم المستحضر 23792 وكان رقم التحضيرة G100061 وكان تركيزه 20.6g/100ml.

حضرت محاليل عيارية بتراكيز مختلفة حسب ضرورة العمل بتمديد العياري في محلول الطور المتحرك المكون من مزيج (ميتانول +اسيتونتريل+ماء) و تم المزج بمساعدة الأمواج فوق الصوتية بالحمام المائي

1-2-2-العينات المدروسة:

العينات تم أخذ عينات من الغراغر الموجودة في السوق الدوائية السورية الحاوية على المادة الفعالة للكلورهيكسيدين بشكل ملح غلوكونات تحت أسماء تجارية مختلفة تم الحصول عليها من عدة صيدليات و عدة مستودعات و من صيدلية المجتمع .

تم الحصول على مستحضر أجنبي مستورد على شكل غسول فموي

يحوي المادة الفعالة للكلور هيكسيدين أيضاً بشكل ملح غلوكونات.

1-2-3-الكواشف و المذيبات:

*ميتانول Methanol خاص بجهازHPLC من شركة Merk الماني الصنع.

*أسيتونتريل Acetonitrile خاص بجهاز HPLC من شركة Merk الماني الصنع.

*ماء Water خاص بجهازHPLC .

*صوديوم تيو سولفاتSodium Thiosulfate خاص بجهازHPLC.

* حمض الخل الثلجي Glacial Acetic acid خاص بجهازHPLC.

1-2-4- تحضير المحاليل:

1-2-4-1- تحضير المحاليل الدارئة:

يوزن 2غ من صوديوم ثماني السولفات و تنقل إلى دورق سعة 1000مل و تحل ب ماء خاص بجهاز الكروماتوغرافيا ، ويكمل الحجم حتى خط العيار و يمزج جيداً بالاستعانة بجهاز الأمواج فوق الصوتية ، يرشح المحلول الناتج على مراشح خاصة بجهاز HPLC.

1-2-4-2- تحضير الطور المتحرك:

فقد جرى تحضير طور متحرك مزيج من 730 ml ميتانول HPLC+270mlماء HPLC+120mlحمض الخل الثلجي+2g صوديوم ثماني السولفات و تم الحصول على محلول5.3=PH .

و بعد أن تم مزج هذه المذيبات وضع المحلول في حمام للأمواج فوق الصوتية لمدة خمس دقائق لزوم المزج الجيد ثم تركت هذه المذيبات بدرجة الحرارة العادية لمدة ساعة على الأقل قبل الاستعمال ، ثم غطي الوعاء بورق الألمينيوم بشكل محكم حتى الاستعمال.

ان افضل استعمال للطور المتحرك يكون خلال اسبوع من تحضيره .

و عند بداية العمل يتم تمرير الطور المتحرك لمدة نصف ساعة داخل العمود المستخدم.من أجل ملائمة النظام.

1-2-4-3-تحضير المحلول الأم و المحلول العياري:

1-2-4-3-1- تحضير المحلول الأم :

لتحضير المحلول الأم من العياري ذو التركيز المطابق للعينات المدروسة:

من المحلول العياري الأساسي ذو التركيز20% كما ورد في شهادة التحليل قمنا بتحضير محلول ذو تركيز 120ميكروغرام/مل من خلال أخذ 1مل من المحلول العياري و تمديده بالطور المتحرك إلى 100مل ليصبح التركيز 2000ميكروغرام/مل و هو التمديد رقم 1

ثم أخذنا 0.6مل من التمديد رقم 1 و أكملنا الحجم في بالون معاير سعة 10 مل بالطور المتحرك فأصبح التركيز 120 ميكروغرام/مل

وهو التركيز المساوي للتركيز الموجود في العينات المدروسة.

1-2-4-3-2- تحضير المحلول العياري:

لتحضير المحلول العياري ذو التركيز 60 ميكرو غرام /مل من المحلول الام نأخذ بممص معاير من المحلول الام 5 مل وتوضع في بالون معايرة سعة 10 مل ويضاف لها من الطور المتحرك لاكمال الحجم لخط العيار ويمزج جيدا وبذلك يكون تركيزه 60 ميكرو/مل

1-2-4-4- تحضير محاليل اختبارات المصدوقية

1-2-4-4-1-محاليل المضبوطية.

أولا تحضير محلول بعيار 80% بطريقة spike: من المحلول الأم للعينة ذو التركيز 120ميكروغرام/مل. أخذنا 4مل وأكملنا الحجم إلى 10 مل فحصلنا على تركيز يساوي 48ميكروغرام /مل.

ثانيا. تحضير محلول بعيار 100% بطريقة Spike: أخذنا 5 مل من المحلول 80% المحضر سابقا والحاوي على 240ميكروغرام/5مل، ومن ثم قمنا بتحضير محلول أم من الشاهد ذو التركيز 20% ومددناه للوصول إلى تركيز مقداره 120ميكروغرام/مل.

أخذنا من محلول الشاهد الأم 3مل وأضفناها إلى 5 مل من المحلول المحضر سابقا ذو التركيز 80% في بالون معاير ذو حجم 10 مل ومن ثم أكملنا الحجم بالماء المقطر بتركيز نهائي قدره 600ميكروغرام/10مل. أي 60ميكروغرام/مل وهو التركيز المساوي لل100% من المادة.

ثالثا. تحضير محلول 120% بطريقة Spike :قمنا بأخذ 5مل من المحلول ذو العيار 80% والمحضر من العينة ومن ثم أضفنا 4 مل من المحلول الام للشاهد في بالون معايرة سعة 10 مل فأصبح التركيز النهائي 720ميكروغرام/10 مل أي 72 ميكروغرام/مل.

1-2-4-4-2- محاليل الدقة التكرارية.

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول معياري للكلور هيكسيدين لاجراء ملائمه النظام وحساب الRSDفكان اقل من 2%

ثم تم حقن محاليل العينات التسعه ذات التراكيز80%100%120% من تراكيز المحلول العياري بايام مختلفه ومحلل مختلف وتم حساب وسطي النسبه المئويه للاستعاده والانحراف النسبي لقيم الاستعادة.

انطلاقا من محلول الشاهد قمنا بتحضير محلول أم بتركيز 120ميكرغرام/مل ومن ثم حضرنا محلول بالتمديد لنحلصل على تركيز قدره 60ميكروغرام/مل واصطلحنا على أنه المحلول الممثل للتركيز 100%. ومن ثم قمنا بتمريره على جهاز الHPLC ثمان مرات لنحصل على القراءات الموضحة في الجدول أدناه وفق الشروط الاختبارية ذاتها من حيث الطور المتحرك، معدل التدفق، الكاشف ....الخ

1-2-4-4-3- محاليل الدقة الوسطي:

وفي دراستنا قمنا بتغيير شرط المحلل فاخترنا 3 محللين من مخبر الرقابة الدوائية لإجراء المقايسات التحليلية على جهاز الHPLC للمحاليل المحضرة وفق الشروط المحددة مسبقا للاختبار. كانت تراكيز المحاليل المختبرة.

أولا. محلول ذو عيار مكافئ ل 80% من المحلول الذي اصطلحنا على أنه المحلول ذو التركيز 100% والبالغ (60ميكروغرام/مل)،

ثانيا. المحلول ذو العيار 100% وذو التركيز(60ميكروغرام/مل)

ثالثا. المحلول ذو العيار 120% من المحلول الذي اصطلحنا على أنه المحلول 100%.

1-2-4-4-4- محاليل الانتقائية:

تم تحضير اربع محاليل بحيث يحتوي المحلول الاول على السواغات الداخلة في تركيب غسول الكلورهيكسيدين ،بينما تحتوي المحاليل الثلاثة الباقية على الكلورهيكسيدين بتركيز 100%من تركيز المعياري و تضاف لها السواغات السابقة.

تم تحضير محلول معياري تركيزه 100% من المحلول الأم المعياري للشاهد. قمنا بأخذ 5 مل من المحلول الأم المعياري ومددت إلى 10ل مل ببالون عياري فأصبح التركيز 60ميكروغرام/مل. ثم أجرينا ثلاث قراءات للمحلول على جهاز الHPLC.

تم حقن خمس عينات متتالية من محلول معياري للكلورهيكسيدين لاجراء اختبار ملائمة النظام و حساب ال RSD و كان <2%.

حقنت العينة التي تحتوي على السواغات فقط فلم تظهر أي استجابة مكان ظهور قمة المادة الفعالة ، ثم حقنت العينات الثلاث المحضرة بتراكيز 100% من محلول عياري و تم حساب و سطي النسبة المئوية للاستعادة من العينات الثلاث.

1-2-4-4-5- محاليل المتانة:

تحضر ثلاث عينات ذات تركيز 100% من تركيز المعياري .

1-2-4-4-6- محاليل الخطية:

تحضير المحلول الأم من العياري ذو التركيز المطابق للعينات المدروسة:

من المحلول العياري الأساسي ذو التركيز 20% (كما ورد في شهادة التحليل). قمنا بتحضير محلول 120 ميكرو غرام/مل من خلال أخذ 1مل من المحلول العياري وتمديده إلى 100مل ليصبح التركيز 2000ميكروغرام/مل وهو التمديد رقم 1. ثم اخذنا 0.6 مل من التمديد رقم 1

و أكملنا الحجم في بالون معاير سعة 10 مل بالطور المتحرك فاصبح التركيز 120ميكروغرام/مل (وهو التركيز المساوي للتركيز الموجود في العينات المدروسة).

تحضير السلسة العيارية انطلاقا من المحلول الأم:

تحضير محلول ذو تركيز 80% : قمنا بأخذ 4 مل من المحلول الأم ووضعت في بالون معاير سعة 10 مل وأكملنا الحجم بالطور المتحرك.

تحضير محلول ذو تركيز 90% : قمنا بأخذ 4.5 مل من المحلول الأم ووضعت في بالون معاير سعة 10 مل وأكملنا الحجم بالطور المتحرك.

تحضير محلول ذو تركيز 100% : قمنا بأخذ 5 مل من المحلول الأم ووضعت في بالون معاير سعة 10 مل وأكملنا الحجم بالطور المتحرك.

تحضير محلول ذو تركيز 110% : قمنا بأخذ 5.5 مل من المحلول الأم ووضعت في بالون معاير سعة 10 مل وأكملنا الحجم بالطور المتحرك.

تحضير محلول ذو تركيز 120% : قمنا بأخذ 6 مل من المحلول الأم ووضعت في بالون معاير سعة 10 مل وأكملنا الحجم بالطور المتحرك.

تحضير محلول ذو تركيز 130% : قمنا بأخذ 6.5 مل من المحلول الأم ووضعت في بالون معاير سعة 10 مل وأكملنا الحجم بالطور المتحرك.

1-2-4-5- تحضير محاليل العينات المدروسة:

تم التحضير وفق ما نص عليه الدستور البريطاني اصدار عام 2013 على أن يتم تمديد العينة المختارة من الغسول الفموي بالطور المتحرك حتى الوصول إلى تركيز 0.01 (وزن/حجم) أي 0.1ميكروغرام/ مل ، وتم التمديد كما يلي:

1-2-4-5-1-تحضير محلول المستحضر المحلي X1 :

في هذا المستحضر كان تركيز الغرغرة 0.12غرام/100 مل أي 1.2 مغ/1 مل

لذلك أخذنا بممص معايرة 1مل من محلول الغرغرة ووضع في دورق حجمي ذي سعة 10مل و أضفنا لها من الطور المتحرك حتى خط العيار و تم المزج جيداً و بذلك أصبح التركيز لدينا 0.12مغ/1مل

1-2-4-5-2-تحضير محلول المستحضر المحلي X2:

في هذا المستحضر كان تركيز الغرغرة 0.12غرام/100 مل أي 1.2 مغ/1 مل

لذلك أخذنا بممص معايرة 1مل من محلول الغرغرة ووضع في دورق حجمي ذي سعة 10مل و أضفنا لها من الطور المتحرك حتى خط العيار و تم المزج جيداً و بذلك أصبح التركيز لدينا 0.12مغ/1مل

1-2-4-5-3-تحضير محلول المستحضر المحلي X3:

في هذا المستحضر كان تركيز الغرغرة 0.12غرام/100 مل أي 1.2 مغ/1 مل

لذلك أخذنا بممص معايرة 1مل من محلول الغرغرة ووضع في دورق حجمي ذي سعة 10مل و أضفنا لها من الطور المتحرك حتى خط العيارو تم المزج جيداً و بذلك أصبح التركيز لدينا 0.12مغ/1مل.

1-2-4-5-4- تحضير محلول المستحضر المستورد X:

في هذا المستحضر كان تركيز الغرغرة 2مغ/مل و لذلك تم أخذ 5مل بممص معايرة ووضع في دورق حجمي ذي سعة 100مل و أضفنا لها من الطور المتحرك حتى خط العيار و تم المزج جيداً و بذلك أصبح التركيز لدينا 0.1مغ/مل .

ثانياً: مقايسة مادة الكلورهيكسيدين الموجودة فى الغسولات الفموية بالطريقة الحيوية

2-1- الاجهزة و المواد Apparatus and Materials الخاصة بالمعايرة الحيوية:

- الموصدة Autoclaveمن نوع (Systec V-150)
- الحاضنة الجرثومية من نوع MMM-Group GmbH Incucell
- فرن التعقيم بالحرارة الجافة Memmert
- أطباق بتري بلاستيكية معقمة سماكتها 2 سم وقطرها 10 سم
- ملاقط وممصات وأدوات زجاجية معقمة لزوم العمل (تعقم الأدوات السابقة بفرن التعقيم بالحرارة الجافة بدرجة 180 سيليزيوس مدة ساعتين) كما تم تعقيم الأنابيب قبل الزرع بالموصدة مدة 15 دقيقية درجة 121 سيليزيوس.
- معياري الكلوهيكسيدين تم الحصول عليه من مخابر الرقابة الدوائية من وزارة الصحة من معمل يونيفارما و المصنع من قبل شركة باير رقم المستحضر 023792 و كان رقم التحضيرة G100061 و كان تركيزه 20.6 غرام /100مل.
- الوسط المغذي Nutrient

وسط مولر هنتون من شركة Himedia ذو رقم التحضيرة و تاريخ الصلاحية JAN-2017 / 0000161186 – الهند.

- مستعمرات جرثومية من نوع ***Staphylococos epidermides***، تم الحصول عليها من المخبر الجرثومي من مخابر الرقابة الدوائية بوزارة الصحة.

تم إجراء المعايرة الحيوية في المخبر الجرثومي وذلك للتأكد من الفعالية القاتلة للتراكيز المختلفة والمتبقية بعد مرور الفواصل الزمنية المحددة بشكل مسبق لدراسة العبوات المفتوحة.

تكمن أهمية العمل الجرثومي في التحقق من فعالية المستحضرات بعد مرور فترات زمنية من فتح العبوة وعدم الاعتماد فقط على التحليل الكيميائي.

تم الحصول على زمرة جرثومية يعرف الكلورهيكسيدين بتأثيره النوعي عليها و تم تكثير المستعمرة التي حصلنا عليها و بعدها أجرينا معلق جرثومي لها و أجرينا تمديدات خاصة به ثم تم العمل على آخر خمس تمديدات و هي التمديدات القابلة للقراءة بحيث أخذنا 1مل من كل منها مع 1مل من المادة المدروسة و بعد انتظار 30 ثانية و هي المدة الزمنية الكافية للمطهر

ليقضي على الجراثيم تم ابطال مفعوله بالتمديد أو اضافة المواد الفعالة على السطح و من ثم تم اخذ 1مل من المحلول الناتج و زرعه في مستنبت Mueller hinton agar و تم الحضن حسب الشروط الدستورية من ناحية درجة الحرارة و المدة الزمنية و من ثم تم عد المستعمرات التي نمت على سطح المستنبت لقييم فعالية المطهر المدروس

وقد تمت معايرة الكلورهيكسيدين باستخدام طريقة المعلقات(التمديد)

2-2- مبدأ الاختبار بواسطة المعلقات:[30]

بالرغم من بعض التباينات الموجودة في الطرائق المقترحة لإجراء هذا الاختبار إلا أن هناك ميلا لإجراء معلقات معيارية للجراثيم ومن ثم تطبيق التمديدات الملائمة من المطهر والذي يدعى معلق الاختبار.

يتم اجراء الاختبارات في درجة حرارة الغرفة (20 مئوية) ويتم اختيار الفترات الزمنية الفاصلة ومن ثم يطبق العد الحيوي بعد إيقاف عمل المطهر بواسطة التمديد أو إضافة مادة ما موقفة له (كالعوامل الفعالة على السطح).

باستخدام العد الحيوي يمكننا أن نحسب تركيز المطهر المطلوب لقتل 99.999% من الجراثيم أو 5 دورات قتل لوغاريتمية.

يمكننا أن نعبر عن التأثير القاتل للمطهر من خلال حساب الفارق بين لوغاريتم عدد المستعمرات الجرثومية في المعلق الجرثومي الأساسي و عدد المستعمرات الجرثومية المتنامية في المحلول الحاوي على المادة المطهرة[33].

$$BE=\log NC-\log ND$$

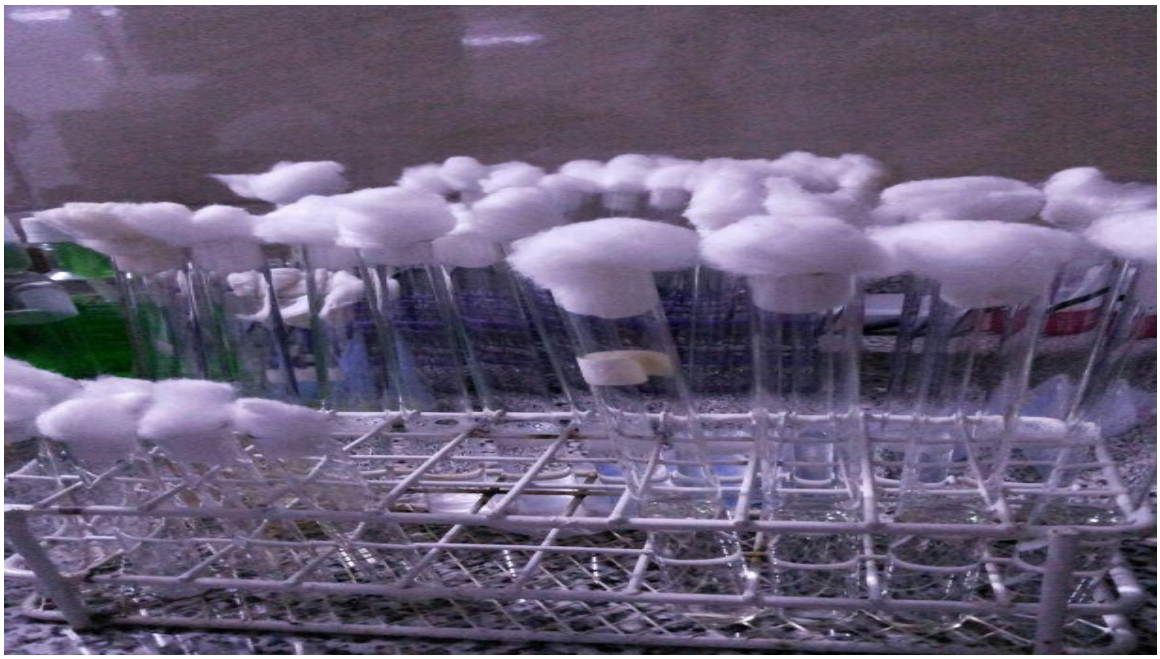
2-3- طرائق العمل:

2-3-1- تحضير المعلق الجرثومي الأم:

تم تحضير المعلق الجرثومي في اليوم السابق ليوم الاختبار وذلك بإضافة مستعمرة جرثومية من جراثيم العنقودية البشروية إلى المرق المغذي المعقم مسبقا ثم قمنا بحضن المستنبت الجرثومي في الحاضنة الجرثومية مدة 16-18 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية.

في اليوم التالي قمنا بتحضير سلسلة تمديدات عشرية من 9 انابيب من المعلق الجرثومي المحضر مسبقا، ثم قمنا بزراعة التمديدات الخمسة الأخيرة على أطباق بتري مرقمة بنفس التسلسل. وذلك بوضع 1مل من كل تمديد إلى طبق بتري موافق له. ثم قمنا بصب وسط Mueller Hiton Agar المعقم و المبرد للدرجة 50-55 مئوية ومن ثم تمت مجانسة المعلق الجرثومي مع الوسط. ثم حضنت بدرجة 37 مئوية مدة 24 ساعة ومن ثم تم اختيار طبق بتري من السلسلة القابلة للعد لمعرفة عدد المستعمرات الجرثومية فيه. وكان ذلك من خلال ضرب عدد المستعمرات بعامل التمديد الموافق فنحصل على عدد الجراثيم البدئي.

الشكل(11)يوضح تحضير السلسلة العيارية الجرثومية



2-3-2 -تحضير سلسلة التمديد الجرثومية:

- قمنا بأخذ 1 مل من المعلق الجرثومي الأم وتم تمديدها إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، ومن ثم قمنا بالمزج الجيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 1.
- قمنا بأخذ 1 مل من الأنبوب رقم 1 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10مل بواسطة المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم الأنبوب بالرقم 2
- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 2 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 3.
- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 3 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 4.

- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 4 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 5.
- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 5 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 6.
- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 6 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم7.
- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 7 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 8.

وبذلك نكون انتهينا من تحضير سلسة التمديد الجرثومية.

- قمنا بأخذ1مل من الأنبوب رقم 8 وتم تمديديها في أنبوب جديد إلى 10 مل بواسطة الماء المعقم، تم مزجها بشكل جيد، ورقم هذه الأنبوب بالرقم 9.

وبذلك نكون انتهينا من تحضير سلسة التمديد الجرثومية.

2-3-3- تحضير محاليل المستحضرات المدروسة:

تحضيرالمستحضرات المحلية X1، X2، X3:

كان تركيز الكلورهيكسيدين فيها 1.2مغ/مل وهو التركيز المعتمد في دراستنا وهو جاهز للاختبار.

تحضيرالمستحضر المستورد X:

بالنسبة المستحضر المستورد X كان تركيز المادة الفعالية فيه 2مغ/مل لذلك قمنا بأخذ 0.6 مل منه بممص معاير وأضفنا لها 0.4 مل ماء عقيم أيضا بممص معاير

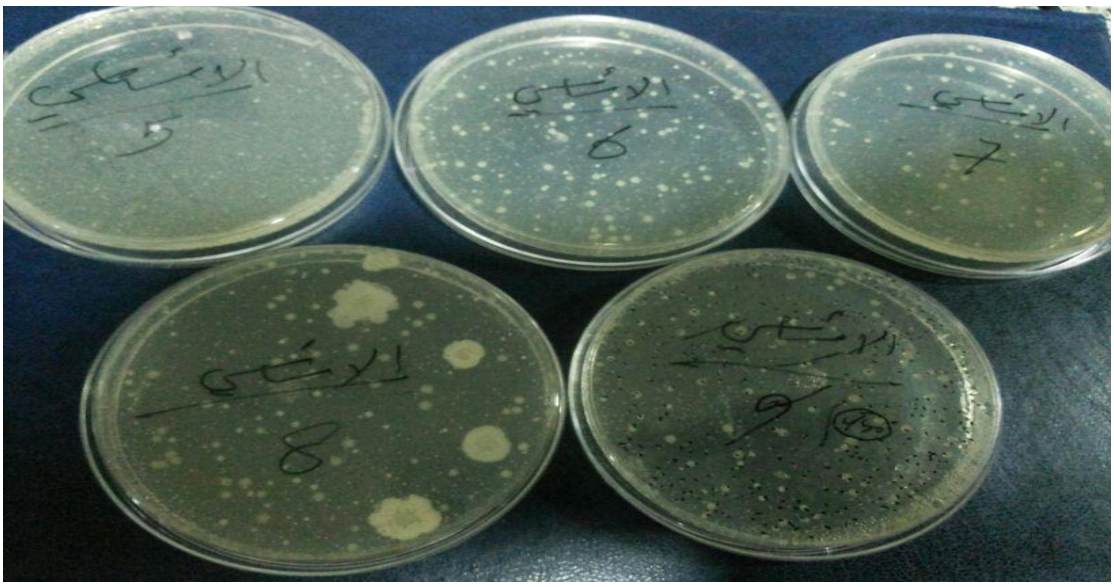
.وبذلك يصبح تركيزه1.2مغ /مل وهو التركيز المعتمد في دراستنا.وهو جاهز للاختبار

تحضيرالمعياري X´ :

بما أن تركيزه 200مغ/مل لذا أخذنا منه 6 ميكروليتر وتم إضافتهاإلى 996 ميكروليتر من الماء العقيم وبذلك أصبح الحجم 1مل وأصبح تركيزه 1.2 مع/مل وهو التركيز المعتمد في دراستنا.

وبذلك أصبحت محاليل المستحضرات المدروسة كلها بذات التركيز وجاهزة للدراسة .

الشكل (12) يوضح المستعمرات الجرثومية المزروعة في المعلق الجرثومي الأساسي



2-3-3-1- تحضير المستحضر المحلي الأول X1:

- تم أخذ أنبوب عقيم وضعنا فيه 1مل من المعلق الجرثومي الأم. وتمت إضافة 1مل من محلول X1 ثم قمنا بالمزج لمدة 30 ثانية وبعدها ابطلنا مفعول المادة المطهرة من خلال:
- التمديد بسلسلة التمديد بالماء المعقم.

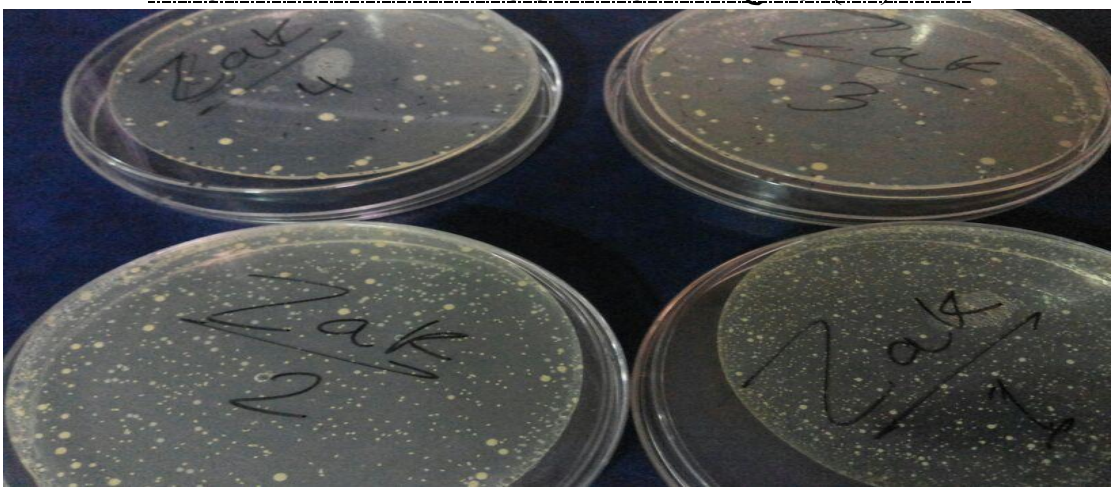
-إضافة مادة فعالة على السطح إلى الماء المعقم بسلسلة التمديد (توين80 يضاف بتركيز 3%)

بعد انتهاء 30ثانية تم أخذ 1 مل من مزيج المادة المطهرة مع المعلق الجرثومي وتم تمديدها إلى جحم 1000مل .

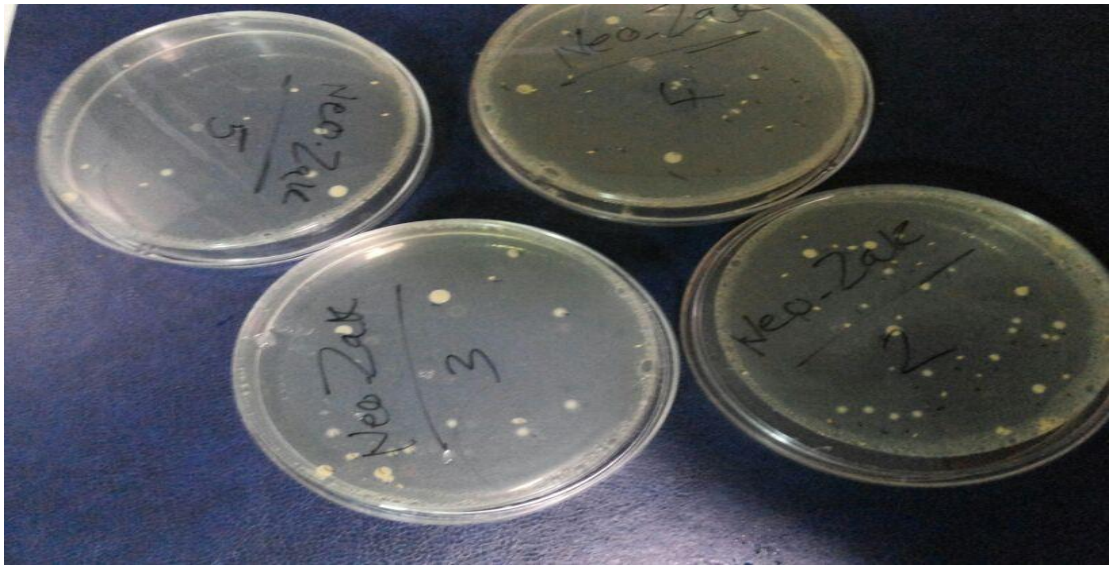
- ثم أخذ 1 مل من المحلول ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 وأعطي الرقم **1**
- ثم أخذ 1 مل من المحلول ذي التمديد رقم 1 ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 ومن ثم أعطي الرقم **2**
- ثم أخذ 1مل من المحلول ذي التمديد رقم 2 ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 ومن ثم أعطي الرقم **3**
- ثم أخذ 1مل من المحلول ذي التمديد رقم 3 ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 ومن ثم أعطي الرقم **4**

- ثم أخذ 1مل من المحلول ذي التمديد رقم 4 ووضعت في أنبوب عقيم يحوي 9مل ماء معقم مضاف له توين 80 ومن ثم أعطي الرقم **5**
- قمنا بعدها بأخذ 1 مل من كل أنبوب ووضع في طبق بتري مرقم بشكل مسبق ومزج مع الآغار المعقم والمبرد للدرجة 50-55 درجة مئوية.وتم الحضن لمدة 17 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية.
- **و تم العمل بنفس الطريقة على المستحضر X2,X3,X و المعياري.**

الشكل (13) يوضح المستعمرات الجرثومية بعد تطبيق المستحضر X1



الشكل (14) يوضح المستعمرات الجرثومية بعد تطبيق المستحضرX2



الشكل (15) يوضح المستعمرات الجرثومية بعد تطبيق المعياري

البـــاب الـــثـالـــث:

الدراسات السابقة

LAST STUDIES

الدراسات السابقة:

أجريت في السنوات السابقة العديد من الدراسات لتعيين كمية مادة الكلور هيكسيدين في الأشكال الصيدلانية التي تحويها المطروحة في الأسواق العالمية لاعتباره هو المكون الذي يحتل المرتبة الأولى في الغراغر(الغسولات الفموية).

أيضاً تمت العديد من الدراسات لتحديد نسبته في الأشكال التي يتوافرفيها سواءًكان غسولاًفموياً أو بشكل معقم للايدي او كريم موضعي

الدراسات السابقة التي تخص المعايرة الكيميائية

كانت أغلب الطرق الفيزيوكيميائية القياسية لتحديد الكلورهيكسيدين في دساتير الأدوية التالية (USP 2008,BP 2010, EP 2011) كل هذه الطرق تعتمد على HPLC[31]

(USP 2008,BP 2010, EP 2011) أو المعايرة اللونية 0.1M perchloric acid .

و الطرق المشروحة في الأدبيات العلمية للمعايرة تبين معايرة نواتج التخرب و المواد المتعلقة بالكلورهيكسيدين بطرق HPLC و الاختبارات اللونية (USP 2008,BP 2010, EP2011) طرق الفلورة ، Spectroscopy, Spectrophotometer وجهاز الكتلة المتشردة ، الكروموتوغرافيا الغازية السائلة .[36]

وقد اعتمدت الدراسات الحديثة على معايرة الكلور هيكسيدين في محاليله المائية بطريقة HPLC وقد كانت طرق HPLC المنشورة غير قادرة على تحديد نواتج الإماهة الممكنة لـ CHX مع توقعات P-Chloraniline و هذا ما أدى إلى زيادة القلق بخصوص ثباتية الكلورهيكسيدين التي تشير إلى مقدرة HPLC للمعايرة بالإضافة إلى ذلك فإن دقة هذه الطريقة تأثرت بامتصاص غير عكوس على طبقة السيليكا على عمود الطور العكوس و هذا ما يستدعي الإنتباه الخاص للطور المتحرك أو مصفوفات العينة لكي نحصل على نواتج معاير دقيقة .[34]

هذه الدراسة تتحدث عن طريقة Polymer R-P-HPLC مشيرة إلى موضوع الثباتية حيث تطرقت هذه الطريقة نواتج إماهة ممتصة لل UV ل CHD .

و وضحت هوية هذه النواتج بال UV و التحليل الطيفي الكتلي حيث أظهرت أنها متلائمة مع طريقة الإماهة المقترحة لل CHD .

لوحظت المشاكل الكمية مع طبقة السيليكا و بشكل تمهيدي المعلومات تشير إلى أن طريقة HPLC الجديدة يمكن تطويرها إلى معايرة دقيقة و ثابتة لـ CHD

طريقة الطور العكوس طريقة حساسية و سريعة و بسيطة.

طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الإنجاز طورت و تم التحقق من صحتها و أهم مزاياها أنها حددت بالتزامن كمية Chlorhexidine و P-Chloraniline في أشكاله الصيدلانية المتنوعة حيث تم فصل المواد بأقل من عشر دقائق باستعمال عمود Xbridge - C18 و تم العمل بدرجة حرارة 40C .[31.32]

أما الطور المتحرك فهو يتألف من 32:68 (V/V) من acetonitril و وقاء فوسفاتي PH=3.0 و محلول صوديوم فوسفات أحادي الأساس 0.05 M يحوي 0.2% Triethylamin و تم العمل بالتحليل بسرعة تدفق 2ml/min و المتحري wavelength=249 nm .

أظهرت الطريقة أنها نوعية و خطية و دقيقة ، أما عن متانة الطريقة فقد أظهرت أن التغيرات ضئيلة بسرعة التدفق و درجة حرارة العمود و نسبة الاسيتونتريل في الطور المتحرك .

الطريقة حساسة لل PH وقاء الطور المتحرك و قد تمت بنجاح باتباع الخطوات المذكورة في ICH .

الدراسات السابقة التي تخص المعايرة الميكروبيولوجية:[34]

اعتمدت الدراسات السابقة لمعايرة الكلورهيكسيدين غلوكونات في محاليله المائية طريقة المعايرة الميكروبيولوجية على استخدام العد الكمي باعتمادها طريقة انتشار الآغار حيث تستند المعايرة على القدرة التثبيطية للكلورهيكسيدين لسلالة ***Staphylococus aureous ATCC25923.***

التصميم 3x3 parallel line حيث عولجت النتائج بشكل احصائي بتباين المتغيرات ANOVA و تبين أنها جيدة من حيث الخطية r=0.9999 معبرة عن تراجع معين تمثل العلاقة بين مساحة تثبيط النمو و لوغاريتم التركيز ، و كانت النتائج التي أعطتها هذه الدراسة دقيقة حيث كانت الدقة 99.03 حيث أثبتت هذه الطريقة أنها مفيدة للمعايرات الميكروبيولوجية للـ CHX-D و يمكن اتباعها أيضا بمعايرة الأدوية الروتينية خلال المراقبة الكمية في الصناعات الصيدلانية .

من الدراسات الأخرى المذكورة في الأدبيات العلمية أعطت العديد من التقارير التي نصحت باستخدام المعايرة الميكروبيولوجية لتقييم قوة أي مضاد حيوي امتازت هذه المعايرة بأنها تستطيع كشف الستار عن تغيرات دقيقة لا يمكن اثباتها بالطريقة الكيميائية [36.37].

المعايرة الحيوية هي طريقة صديقة للبيئة لا تتطلب محلات و لا تعطي نواتج سامة ولا تتطلب معدات نوعية و تمتاز بكونها اقتصادية و سهلة التطبيق ، هذه العوامل جعلت من المعايرة الحيوية بديل جيد لتقييم القوة القاتلة للجراثيم في المطهرات و مضادات الالتهاب في مخابر الرقابة الدوائية ، إضافة إلى ذلك فإن السواغات المستخدمة في الطرق الفيزيوكيميائية عادة تكون مكلفة و صعبة الحصول عليها .

لذلك كان الهدف من هذه الدراسة تطوير مصدوقية طريقة بسيطة حساسة دقيقة باستخدام انتشار الآغار كبديل بدئي عن الطريقة الفيزيوكيميائية .

طريقة Kampf و colleagues (2002)الأكثر سهولة والمعدة لاستبيان القدرة القاتلة التي يمارسها المطهر على الجراثيم والفطور والفيروسات[38]

و هي طريقة دستورية تعتمد على تقييم الفعالية القاتلة للكلورهيكسيدين على الجراثيم عند العمل على تراكيز معلومة من الكلورهيكسيدين و من المادة المعيارية و هي مادة تم تحديد تركيزها وفعاليتها مسبقاً، ويتم إجراء المقايسة بطريقة معلق الاختبار حيث يتم إجراء معلقات معيارية للجراثيم ثم تطبيق التمديدات الملائمة من المطهر و تم اختيار الفترات الزمنية الفاصلة بحسب بروتوكول الدراسة و من ثم تم العد الحيوي بعد إيقاف عمل المطهر بواسطة التمديد أو إضافة مادة تبطل مفعوله كالعوامل الفعالة على السطح.

و من المعروف أن المطهر المقبول الذي يقتل 99.999% من الجراثيم أو خمس دورات قتل لوغاريتمية يكون قد حقق المقاييس الدستورية

باستخدام العد الحيوي يمكننا أن نحسب تركيز المطهر المطلوب لقتل 99.999% من الجراثيم أو 5 دورات قتل لوغاريتمية.

يمكننا أن نعبر عن التأثير القاتل للمطهر من خلال حساب الفارق بين لوغاريتم عدد المستعمرات الجرثومية في المعلق الجرثومي الأساسي و عدد المستعمرات الجرثومية المتنامية في المحلول الحاوي على المادة المطهرة[11].

BE=logNC-logND

الـبـــاب الـــرابـــع:

مصدوقية الطرائق التحليلية وملائمة النظام و تصنيفها

أولاً :مصدوقية الطرائق التحليلية :

-المضبوطية
-الدقة
-النوعية و الانتقائية
-حد الكشف
-حد القياس الكمي
-الخطية و المجال
-المتانة

ثانياً:ملائمة النظام :

ثالثاً:تصنيف الطرائق التحليلية

أولاً:مصدوقية الطرائق التحليلية

(24.25)Validation of analytical procedures :

مصدوقية الطريقة التلحلية هي العملية التي تثبت من خلالها أن أداء الطريقة يلبي المتطلبات التحليلية المقصودة ، و يستخدم في هذه العملية مجموعة من المتثابتات التحليلة و تتضمن المضبوطية ، الدقة ، النوعية ، حد الكشف ، وحد الكم ، الخطية و المجال المتانة.

1- المضبوطية |Accuracy:

و هي مدى تقارب نتائج الاختبار المنفذ بالطريقة التحليلية الى القيمة الحقيقية و يمكن إثبات المضبوطية لطرائق مقايسة المادة الدوائية باحدى الطرق التالية :

أ- طريقة الاستعادة من السواغات spiked-placebo recovery method:

و في هذه الطريقة تضاف كميات معروفة من المادة الدوائية الى مزائج من مكونات المستحضر الداوئي غير المادة الفعالة ثم يعاير المزيج الناتج مع القيم المتوقعة .

ب- طريقة الاضافة المعيارية Standard addition method:

و في هذه الطريقة تعاير عينة من المستحضر الدوائي ، ثم يضاف اليها كمية معروفة من المادة الدوائية و تعاد معايرة العينة ، ويقارن الفرق بين نتيجتي المعايرتين مع القيم المتوقعة [50].

و تقييم المضبوطية باستخدام تسع مقايسات على الأقل عند ثلاثة تراكيز على الأقل مغطية المجال المحدد كإجراء المقايسة عند ثلاثة تراكيز بثلاث تكرارات عند كل تركيز .

و يعبر عن المضبوطية بنسبة الاستعادةو التي هي نسبة القيمة الناتجة عن استخدام الطريقة التحليلية الى القيمة المتوقعة كنسبة مئوية ، و تعتبر الطريقة ذات المضبوطية اذا كانت نسبة الاستعاد 89%- 102% في مقايسة مادة دوائية ضمن مستحضر و 95% -105%في اختبار الذوبان [50].

2- الدقة| Precision:[27]

و هي درجة التوافق بين نتائج الاختبار عند تطبيق الطريقة بشكل متكرر على أجزاء متعددة من عينة متجانسة و تحدد عند ثلاثة مستويات : التكرارية ، الدقة المتوسطة ، و التناتجية .

أ- الدقة التكرارية Repeatability(intra-assay precision):

و تعبر عن الدقة عند تطبيق الطريقة ضمن نفس شروط التشغيل خلال فاصل زمني قصير .

ب- الدقة الوسطى intermediate precision(inter-assay precision):و تعبر عن الاختلاف ضمن نفس المخبر و ذلك عند تطبيق الطريقة في أيام مختلفة ، من قبل محللين مختلفين ، أو استخدام أجهزة مختلفة .

ج- التناتج Reproducibility :

و تعبر عن الدقة بين المخابر .

و تحدد دقة طريقة تحليلية باجراء تسع مقايسات على الأقل مغطية مجال الطريقة ، لاجزاء من عينة متجانسة ابتداءاً من تحضير العينة كاجراء المقايسة عند ثلاثة تراكيز بثلاث تكرارات عند كل تركيز ، ضمن مختبر واحد خلال فترة زمنية قصيرة من قبل محلل واحد لإثبات التكرارية أو إجرائها في أيام مختلفة أو من قبل محللين مختلفين بالنسبة للدقة المنوسطة و ثم حساب الإنحراف المعياري النسبي RSD% للنتائج .

3- النوعية و الانتقائية | Specificity and selectivity:[25]

النوعية هي قدرة الطريقة على تقييم المادة الدوائية بوجود مكونات يتوقع أن تكون موجودة مثل الشوائب ، منتجات التخرب ، مكونات المستحضر ، مما يسمح بالنسبة لطرايق المقايسة بتحديد دقيق لمحتوى أو تركيز المادة الدوائية في العينة و لإثبات النوعيةعن استخدام الطرائق الكرورموتوغرافية تستخدم المخططات الكرورموتوغرافية وكذلك يستخدم اختبار نقاوة القمة peak purity في حال استخدام مكشاف مصفوف الديودات diode array لاظهار أن قمة المادة الدوائية في المخطط الكروموتوغرافي غير ناتجة عن أكثر من مكون واحد.

4- حد الكشف | Detection limit:

و هي الكمية الأقل من المادة المحللة في العينة التي يمكن كشفها و لكن ليس بالضرورة تحديد كميتها باستخدام الشروط التجريبية المحددة .

و يعبر عن حد الكشف عادة بتركيز المادة المحللة (مثل نسبة مئوية ، اجزاء من بليون) في العينة و يتم تحديديها في حالة الاجراءات التحليلية الالية التي تبدي ضجيج عند خط القاعدة ، اعتمادا على نسبة الاشارة الى الضجيج و ذلك بمقارنة الاشارات المقاسة من عينات بتراكيز منخفضة معروفة من المادة المحللة مع تلك المقاسة من عسنات ناصع و إثبات التركيز الأقل

الذي يمكن عنده كشف المادة المحللة بثقة ، و تقبل نسبة الاشارة الى ضجيج بين 1:3و 1:2 كحد للكشف .

5- حد القياس الكمي | Quantization limit:[26]

و هي الكمية الأقل من المادة المحللة في العينة التي يمكن تحديدها بدقة و مضبوطية مقبولة ، باستخدام الشروط التجريبية المحددة ، و يعبر عن حد الكم عادة بتركيز المادة المحللة (مثل ، نسبة مئوية ، أجزاء من بليون) في العينة و يتم تحديده في حالة الاجراءا ت التحليلية الآلية

التي تبدي ضجيجاً عند خط القاعدة ، إعتماداً على الاشارة إلى الضجيج ، وذلك بمقارنة الإشارات المقاسة من عينات بتراكيز منخفضة معروفة من المادة المحللة مع تلك المقاسة من عينات ناصع و اثبات التركيز الاقل الذي يمكن عنده تحديد كمية الحليلة بثقة و تقبل نسبة اشارة الى ضجيج 1:10 كحد للقياس الكمي .

6-الخطية و المجال | Linearity and Range: [27]

خطية طريقة تحليلة هي قدرة الطريقة ضمن مجال محدد على إعطاء نتائج تكون متناسبة طرداً مع ترميز الكمية المادة المحللة في العينة ، أما مجال الطريقة التحليلة فهو الفاصل بين التركيز الأعل و الاقل من المادة المحللة في العينة متضمنة هذه التراكيز و الذي ثبت عنده بأن الطريقة تملك مستوى مناسب من الدقة و المضبوطية و الخطية و يعبر عنه بنفس وحدات نتائج الاختبار

مثل،نسبة،أجزاء من مليون.

و تثبت خطية الطريقة ضمن مجال محدد بتحضير محاليل من المادة الدوائية عند خمس تراكيز على الاقل تغطي المجال المطلوب بتمديد محلول معياري ام ثم رسم منحني التراكيزمقابل الاستجابة وحساب معادلة خط الارتداد حيث يحسب معامل الارتباط...نقطةالتقاطع

مع محور ...وميل خط الارتداد وتعتبر الطريقة ذات خطية ضمن مجال محدد إذا ماكان معامل الارتباط[28].

يتم اثبات الخطية بالنسبة للاختبارات التالية ضمن المجالات التالية على الاقل:

أ-مقايسة المواد الفعالة في الأشكال الصيدلانية :80% حتى 120%.

ب-موجودية المحتوى : 70%حتى 130% من تركيز الاختبار .

7- المتانة| Robustness:

متانة طريقة تحليلية هي قياس قدرتها على البقاء غير متأثرة بالتغيرات الصغيرة المتعمدة في متثابتات الطريقة و تؤمن دليل على ملائمتها خلال الاستخدام الاعتيادي و من الامثلة على هذه التغيرات باهاء PH الطور المتحرك ، تركيب الطور المتحرك ، درجة الحرارة ، معدل التدفق ، و طول موجة المكشاف [26].

ثانياً:ملائمة النظام | System suitability:[25.27]

يعتبر اختبار ملائمة النظام جزءاً متكاملاً مع الطرائق الكروموتوغرافية و يستخدم للتتحقق من أن النظام الكروموتوغرافي ملائم للتحليل المقصود ،ولاتعبتر تحليل العينات مقبول إلا إذا كانت متطلبات هذا الإحتبار ضمن حدود القبول و يطبق بإجراء حقنات متكررة من محلول معياري قبل حقن عينات التحليل أو بين حقن هذه العينات ثم حساب متثابتات معينة من قمة المادة المحللة و من متطلبات هذا الاختبار :

أ- الدقة: و التي يعبر عنها بحساب الانحراف المعياري النسبي RSD% للاستجابات الناتجة من الحقنات المتكررة للمحلول المعياري و يجب أن يكون أقل من 2% لخمس حقنات متكررة .

ب- عدد الصفائح النظرية N: و هو مقياس لكفائة العمود و يعبر عن حدية القمة و يجب أن يكون أكبر من 2000 .

ج- الميزR: و هو مقياس انفصال قمتين عن بعضهما و يجب أن تكون قيمتهم أكبر من 2 حتى تعتبر قيمتين منفصلتين بشكل جيد و الذي يعتبر أمراً ضرورياً للتحديد الكمي .

ث-معامل التذيلT: و هو مقياس لتناظر القمة و يجب أن تكون قيمته أقل من 2 . [50-55]

ثالثاً:تصنيف الطرائق التحليلية : [23]

1- طرائق تحليلية للتعيين الكمي (مقايسة) للمركبات الرئيسية مثل مادة دوائية صرفة أو مادة فعالة في شكل صيدلاني جرعي .
2- طرائق تحليلية لتحديد نسبة الشوائب في المواد الدوائية الصرفة أو نواتج التخرب في شكل صيدلاني جرعي و تتضمن هذه الطرائق عادة مقايسات كمية و اختبارات حدية .
3- طرائق تحليلية لبيان خاصيات أداء شكل صيدلاني ما.
4- اختبارات الاستعراف(تعيين هوية).

جدول (5) يوضح خصائص الأداء التحليلي وفق USP 35[58]

المتثابت	فئة1	فئة2		فئة3	فئة4
		مقايسة	فحص حدي		
المضبوطية	نعم	نعم	-	-	لا
الدقة	نعم	نعم	لا	نعم	لا
الانتقائية\النوعية	نعم	نعم	نعم	-	نعم
حد الكشف	لا	لا	نعم	-	لا
حد القياس الكمي	لا	نعم	لا	-	لا
الخطية	نعم	نعم	لا	-	لا
المجال	نعم	نعم	-	-	لا

الـــبـــاب الـخــامــس:

الـنـتـائـج

RESULTS

1-المقايسة بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة رفيعة الإنجاز.

1-1- الدراسة الكيفية و تعيين الشروط الكروماتوغرافية الملائمة لمقايسة الكلورهيكسيدين.

1-2- نتائج مصدوقية طريقة الكرماتوغرافيا السائلة رفيعة الإنجاز المطبقة.

1-3- نتائج دراسة الكلورهيكسيدين في المستحضرات المدروسة حسب بروتوكول العمل بالفترات الزمنية للدراسة.

2-المقايسة بالطريقة الحيوية .

3- خلاصة النتائج

1 - المقايسة بطريقة الاستشراب السائل رفيع الإنجاز HPLC

1-1- الدراسة الكيفية و تعيين الشروط الكروماتوغرافية الملائمة مقايسة الكلورهيكسيدين في العينات المدروسة:[25.28.27]

1-1-1 - أختيار طول موجة القياس:

تم العمل على طول الموجة المحددة بالدستوروكان طول الموجة المختار 254 نم

1-1-2- إختيار العمود المستخدم و باهاء الطور المتحرك :

تحوي طبيعة الكلور هيكسيدين على مجموعات قطبية لذا يجب أن يكون الطور المتحرك المستخدم ذو طبيعة قطبية بينما يكون الطور الثابت غير قطبي لذلك تم إختيار عمود الفصل C18 كطور ثابت

1-1-3- إختيار درجة الحرارة :

كانت درجة الحرارة حلال كامل مراحل تطوير طريقة الفصل 35 درجة

1-1-4- حجم الحقنة :

كانت 20ميكرو لتر .

1-1-5- تطوير طريقة الكروموتوغرافيا السائلة رفيعة الإنجاز لفصل المادة في العينات المدروسة:

2-1-نتائج ملائمة النظام و مصدوقية طريقة الاستشراب السائل رفيع الإنجاز المطورة:

1-2-1- ملائمة النظام:[27.28]

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول كلور هيكسيدين المعياري وفق الشروط الدستوريه للمقايسة وحساب الانحراف المعياري النسبي.RSD فكان أقل من2%.

وأهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي تظهر بالجدول التالي :

الجدول(6) يوضح المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي

Standard no.	Area	Retention time (min)	Tailing factor	Theoretical plate		
1	1728182	5.6	1.9	2102		
2	1726345	5.4	1.92	2113		
3	1723567	5.45	1.89	2100	**Average Area**	1723645
4	1725555	5.5	1.95	2130	**SD**	0.7386543
5	1724435	5.35	1.94	2100	**RSD**	0.74

2-2-1- مصدوقية الطريقة:[25.23]

1-2-2-1- المضبوطية |Accuracy:

هي مدى تقارب نتائج اختبار الطريقة المدروسة من القيم الحقيقية.

و تحسب المضبوطية على شكل نسبة مئوية بالاستعادة (Recovary) .

ملائمة النظام sestem suitability:

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول معياري للكلور هيكسيدين لاجراءاختبار ملائمه النظام وحساب RSDفكان اقل 2%

وأهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي موضحة بالجدول(7)

الجدول(7) يوضح المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي

Standard no.	**Area**	**Retention time (min)**	**Tailing factor**	**Theoretical plate**		
1	1719982	5.55	1.88	2200		
2	1725461	5.67	1.82	2151		
3	1727756	5.33	1.89	2145	**Average Area**	1721132
4	1724008	5.21	1.96	2099	**SD**	0.74566
5	1718435	5.44	1.92	2101	**RSD**	0.72

ثم حقن محاليل العينات التسعة التي تم تحضيرها بالتراكيز (120-100-80) لاجراء المضبوطية وحساب وسطي النسبه المئويه للاستعاده فكانت ضمن معايير القبول والطريقه المستخدمه تتمتع بالمضبوطيه كما في الجدول (8)

الجدول(8) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة المضبوطية

Standard No.	concentration		Area	Con.observed	Recovery%
	%	mg/ml			
1	80	48	1215162	48.1516	100.32
2	80	48	1209373	48.02023	100.04
3	80	48	1212258	48.0856	100.02
4	100	60	1728086	59.7811	99.88
5	100	60	1726483	59.7450	99.76
6	100	60	1724589	59.7020	99.85
7	120	72	2217888	70.8864	98.45
8	120	72	2220128	70.9400	98.52
9	120	72	2221513	70.9710	98.75
				Average	99.41
				RSD	0.74

1-2-2-2- الدقة التكرارية|Repeatability (قابلية تكرار النتائج):

هي مدى تكرار النتائج نفسها ضمن المختبر نفسه بعد فترة زمنية قصيرة لكن مع المحلل نفسه والاجهزة نفسها و بنفس الشروط.

ملائمة النظام sestem suitability:

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول معياري للكلور هيكسيدين لاجراءاختبار ملائمه النظام وحساب RSDفكان اقل 2%

وأهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي موضحة بالجدول التالي(9)

الجدول(9) يوضح المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي

Standard no.	Area	Retention time (min)	Tailing factor	Theoretical plate		
1	1728154	5.6	1.9	2101		
2	1726457	5.4	1.91	2116		
3	1723451	5.55	1.89	2100	**Average Area**	1726545
4	172565	5.5	1.90	2145	**SD**	0.7320543
5	1720012	5.45	1.94	2110	**RSD**	0.69

تم حقن محاليل العينات التسعة التي تم تحضيرها بالتراكيز(120-100-80)وحساب وسطي النسبه المئويه للاستعاده فكانت ضمن معايير القبول والطريقه المستخدمه تتمتع بالتكرارية كما في الجدول (10)

الجدول رقم (10)يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة التكرارية

Standard No.	concentration		Area	Con.observed	Recovery%
	%	mg/ml			
1	100	60	1700512	59.156	98.6
2	100	60	1701237	59.172	98.68
3	100	60	1719271	59.581	99.33
4	100	60	1728597	59.79	99.65
5	100	60	1718988	59.57	99.29
6	100	60	1708127	59.17	98.88
7	100	60	1707999	59.32	98.87
8	100	60	1724322	59.68	99.49
9	100	60	1724550	59.69	98.75
				Average	99.08
				RSD	0.4021

1-2-2-3- الدقة الوسطى| intermediate precision:

هي مدى توافق نتائج تحليل قياس عدة عينات مقتطعة من عينة متجانسة عند تكرار الطريقة التحليلية على العينة ذاتها باختلاف أحد الشروط على الأقل (ايام مختلفة او اجهزة مختلفة او محللين مختلف) .

ملائمة النظام sestem suitability:

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول معياري للكلور هيكسيدين لاجراءاختبار ملائمه النظام وحساب RSDفكان اقل 2%

وأهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي موضحة بالجدول التالي(11)

الجدول(11) يوضح المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي

Standard no.	**Area**	**Retention time (min)**	**Tailing factor**	**Theoretical plate**		
1	1728182	5.6	1.9	2102		
2	1726345	5.4	1.92	2113		
3	1723567	5.45	1.89	2100	**Average Area**	1723645
4	1725555	5.5	1.95	2130	**SD**	0.7386543
5	1724435	5.35	1.94	2100	**RSD**	0.74

تم حقن محاليل العينات التسعة التي تم تحضيرها بالتراكيز(120-100-80)وحساب وسطي النسبه المئويه للاستعاده فكانت ضمن معايير القبول كما في الجدول (12)

الجدول (12) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بالدقة الوسطي

Standard No.	Analysts	Concentration		Area	Con.observed	Recovery%
		%	mg/ml			
1	A	80	48	1203472	74.886	99.76
2	A	80	48	1207769	47.984	99.97
3	A	80	48	1208242	47.994	99.99
4	B	100	60	1742541	60.109	100.2
5	B	100	60	1737621	59.997	99.99
6	B	100	60	1757621	60.32	100.5
7	C	120	72	2251828	71.656	99.5
8	C	120	72	2238453	71.352	99.1
9	C	120	72	2218498	70.99	98.47
					Average	99.72
					RSD	0.6186

1-2-2-4- النوعية Specificity :

هي قدرة الطريقة التحليلية لمقايسة المادة المراد تحليلها بدقة و مضبوطية مناسبتين بالرغم من وجود مركبات محتملة اخرى مثل نواتج التدرك والسواغات والملوثات.

ملائمة النظام sestem suitability:

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول معياري للكلور هيكسيدين لاجراءاختبار ملائمه النظام وحساب RSDفكان اقل 2%

وأهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي موضحة بالجدول التالي(13)

الجدول(13) يوضح المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي

Standard no.	Area	Retention time (min)	Tailing factor	Theoretical plate		
1	1727482	5.65	1.9	2102		
2	1726655	5.4	1.92	2144		
3	1723887	5.40	1.88	2125	**Average Area**	1723645
4	1725215	5.5	1.95	2150	**SD**	0.7386543
5	1724035	5.35	1.88	2130	**RSD**	0.74

تم حقن العينة الحاوية على السواغات فقط فلم تعطي أي استجابةمكان ظهور قمة المادة الفعالة وعند حقن العينات الثلاث المحضرةبتركيز 100% من المعياري وحساب وسطي النسبة المئويةللإستعادة للعينات الثلاثة فكانت ضمن معايير القبول كما في الجدول (14)

الجدول (14) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة النوعية

Standard No.	Concentration		Area	Con.observed	Recovery%
	%	µg/ml			
excipient	0	0	0	0	0
1	100	60	1716191	59.511	99.20
2	100	60	1708342	59.333	98.89
3	100	60	1712276	59.420	99.04
				Average	98.632
				RSD	0.480

1-2-2-5- الخطية |Linearity :[24.25]

هي قابلية الطريقة لاعطاء نتائج متناسبة طردا مع تركيز المادة المحللة في العينة ضمن المجال المعطى لها .

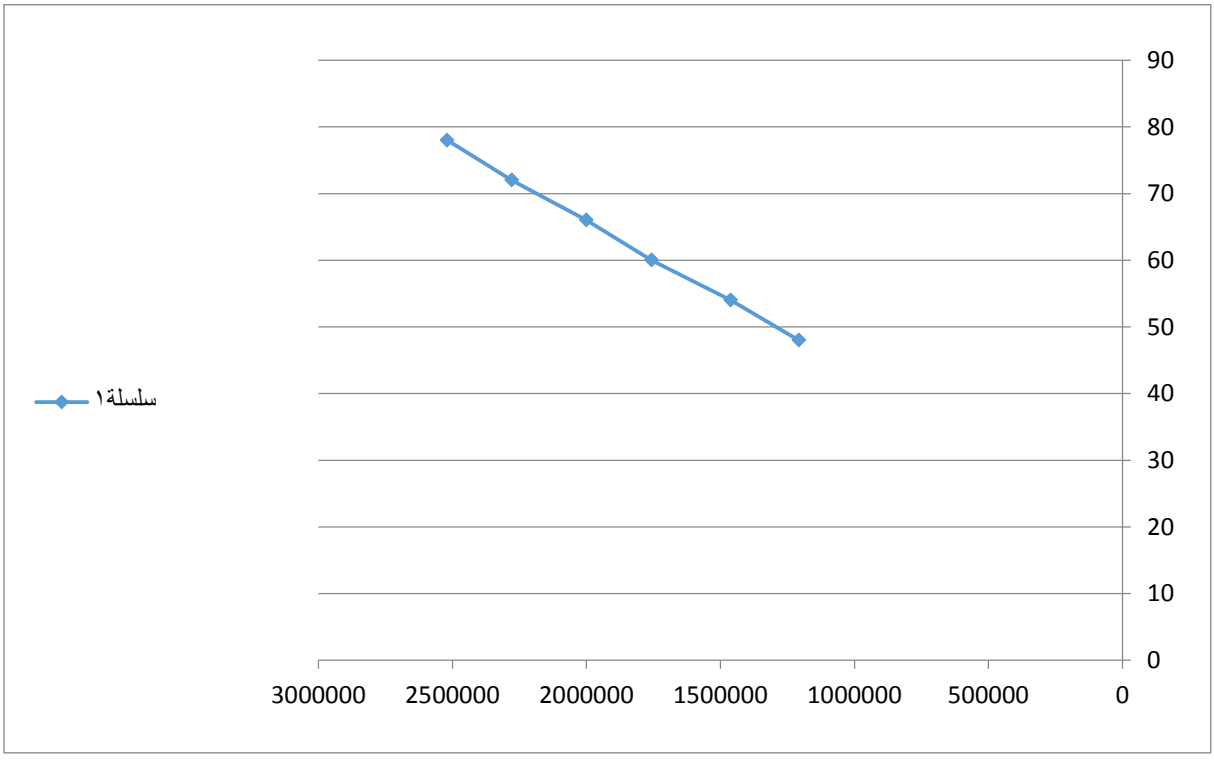
اعتمدنا على حقن ثلاث حقنات من كل محلول من محاليل الخطية ذات التراكيز (80-90-100-110-120) من محلول المعياري و تسجيل الاستجابة الحاصلة و حساب المتوسط الحسابي الموافق لكل تركيز ثم رسم الخط البياني الموافق بغية تحديد معادلة الارتداد الخطية و حساب معامل الارتباط R^2 حيث ووجد انه يساوي كما في الشكل (15)

فكانت ضمن معايير القبول كما في الجدول (15)

الجدول (15) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة الخطية

Standard No.	concentration		Area
	%	µg/ml	
1	80	48	1207225
2	90	54	1460851
3	100	60	1756797
4	110	66	1999719
5	120	72	2278483
6	130	78	2519256
Correlation factor			0.999670955
Slope			2.26731E-05
Intercept			20.59244959

الشكل(16)يوضح الخط البياني للسلسة العيارية ومعادلة الارتداد الخطي



وكانت معادلة خط السلسة العيارية : y=2.26731E-05*X+20.59244959

1-2-2-6- المتانة :[27.23]

ملائمة النظام sestem suitability:

تم حقن خمس عينات متتاليه من محلول معياري للكلور هيكسيدين لاجراءاختبار ملائمه النظام وحساب RSDفكان اقل 2%

وأهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي موضحة بالجدول التالي(16)

الجدول(16) يوضح المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي

Standard no.	area	Retention time (min)	Tailing factor	Theoretical plate		
1	1729582	5.6	1.88	2200		
2	1722215	5.66	1.92	2113		
3	17265877	5.50	1.90	2100	**Average Area**	1765645
4	17244155	5.45		2200	**SD**	0.7388543
5	1724665	5.41	1.93	2099	**RSD**	0.56

تم حقن محلول المعياري خمس مرات متتالية على ثلاث دفعات عند معدلات تدفقة مختلفة وهي (1,8 - 2 - 2,2)مل بالدقيقة ثم تم حساب الانحراف المعياري النسبي عند كل معدل تدفق،ثم حقنت عند كل معدل تدفق عينة ذات التركيز 100% من تركيز محلول العياري ثم حساب النسبة المئوية للاستعادة وحساب زمن الاحتباس النسبي(وهو زمن احتباس المادة في الشكل الصيدلاني/زمن الاحتباس الوسطي للمادة المعيارية)

الجدول(17)يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة المتانة

كلورهيكسيدين	معدل التدفق (مل/الدقيقة)		
رقم العينة	1,8	2	2,2
1	1965895	1904801	2099497
2	1952222	1888978	2109034
3	1899999	1911258	2144553
4	1900054	2011115	2133779
5	1886909	1999954	2099996
المتوسط الحسابي	1921015	1943227	2117371
RSD	0.45	0.66	0.39
العينة	1965487	2062544	2155669
الاستعادة%	98.35	99.11	101.22
زمن الاحتباس للمعياري	5.65	5.75	5.90
زمن الاحتباس للعينة	5.58	5.82	5.86
زمن الاحتباس النسبي	0.987	1.01	0.993

1-2-2-7- حد الكشف:

تم تحضير سلسلة من عياري الكلورهيكسيدين بتراكيز متناقصة و اعيد قياس المحلول الذي يعطي استجابة واضحة و مقبولة 6 مرات و حسب RSD

فكان حد الكشف DL=X□+(3xSD)

1-2-2-8- حد القياس الكمي:

يتم تحضير سلسلة من المعياري بتراكيز متناقصة و قياس كل تركيز ست مرات ، فكان حد القياس الكمي QL=X□+(SDx10).

حيث X□ هي و سطي الاستجابة لاقل تركيز عندما يكون RSD<2%.

1-3- نتائج دراسة الكلورهيكسيدين في المستحضرات المدروسة حسب بروتوكول العمل بالفترات الزمنية للدراسة:

1-3-1- نتائج دراسة المستحضر الأول X1 حسب بروتوكول الدراسة:

تم حقن محلول العياري ذو التركيز المماثل لتركيز المحلول المدروس ثلاث مرات ثم حقن محلول العينة الأولى X1ثلاث مرات و حسب وسطي مساحات القمم العائدة لكل من العياري و العينة ثم تم حساب النسبة المئوية للمادة الفعالة لهذه العينة .

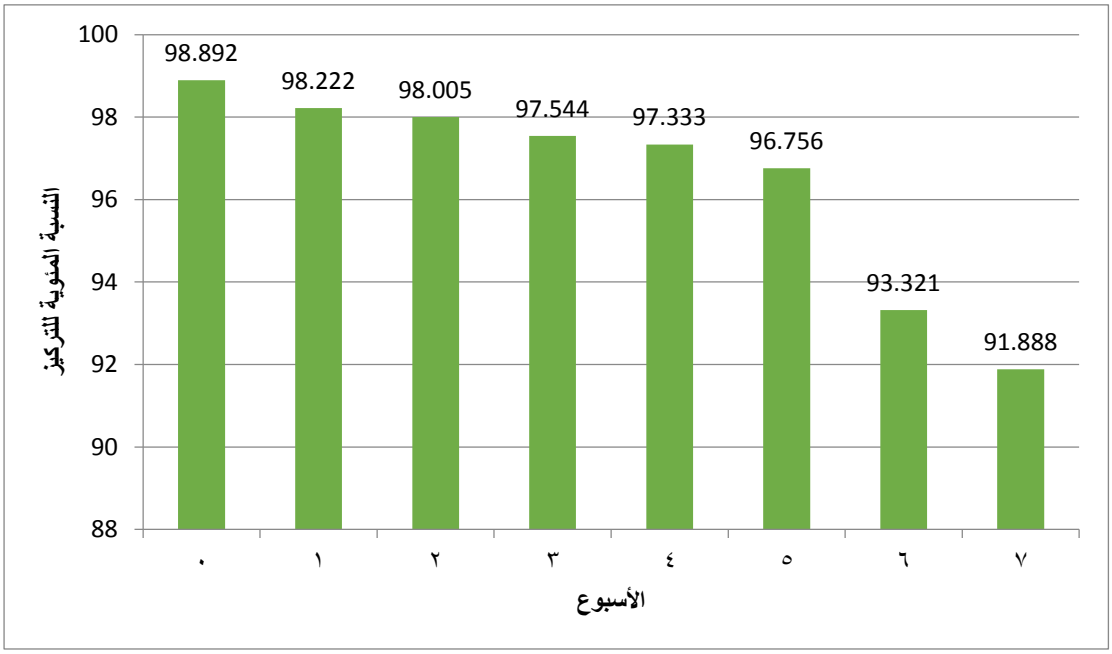
تمت خطوات العمل هذه على محلول العينة X1 باللحظة 0 من تاريخ الفتح.

و كررت هذه العملية على مدى ثمان أسابيع بفاصل زمني قدره أسبوع فكانت نتائج نسبة المادة الفعالة كما في الجدول التالي:

الجدول (18) يوضح نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X1

المدة الزمنية	وسطي ثلاث قراءات	النسبة المئوية للتركيز	RSD%
لحظة الفتح	2499858	98.892	0.672
الأسبوع الأول	2477632	98.222	0.275
الأسبوع الثاني	2442298	98.005	0.295
الأسبوع الثالث	2392709	97.544	0.487
الأسبوع الرابع	2371895	97.333	0.359
الأسبوع الخامس	2327689	96.756	0.892
الأسبوع السادس	2195816	93.321	0.711
الأسبوع السابع	2058777	91.888	0.652

الشكل(17) مخطط يوضح انخفاض تركيز الكلور هيكسيدين في مستحضر X1 خلال المدة الزمنية المدروسة



1-3-2- نتائج دراسة المستحضر الثاني X2 حسب بروتوكول الدراسة:

تم حقن محلول العياري ذو التركيز المماثل لتركيز المحلول المدروس ثلاث مرات ثم حقن محلول العينة االثانية X2 ثلاث مرات و حسب وسطي مساحات القمم العائدة لكل من العياري و العينة ثم تم حساب النسبة المئوية للمادة الفعالة لهذه العينة .

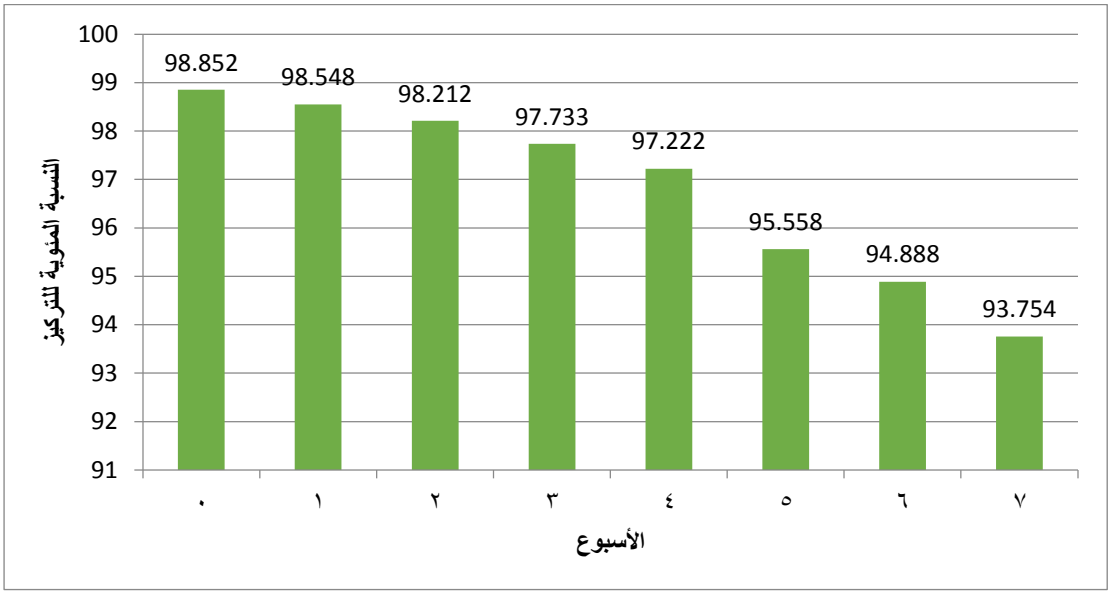
تمت خطوات العمل هذه على محلول العينةX2 من اللحظة 0 من تاريخ الفتح.

و كررت هذه العملية على مدى ثمان أسابيع بفاصل زمني قدره أسبوع فكانت نتائج نسبة المادة الفعالة كما في الجدول التالي:

الجدول (19) يوضح نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X2

المدة الزمنية	وسطي ثلاث قراءات	النسبة المئوية للتركيز	RSD%
لحظة الفتح	2462689	98.852	0.587
الأسبوع الأول	2425891	98.548	0.968
الأسبوع الثاني	2375895	98.212	0.555
الأسبوع الثالث	2295897	97.733	0.647
الأسبوع الرابع	2215584	97.222	0.478
الأسبوع الخامس	2158745	95.558	0.888
الأسبوع السادس	1895842	94.888	0698.
الأسبوع السابع	1754735	93.754	0.776

الشكل(18) **مخطط يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في مستحضرX2 خلال المدة الزمنية المدروسة**



1-3-3- نتائج دراسة المستحضر الثالث X3 حسب بروتوكول الدراسة:

تم حقن محلول العياري ذو التركيز المماثل لتركيز المحلول المدروس ثلاث مرات ثم حقن محلول العينة االثانية X3 ثلاث مرات و حسب وسطي مساحات القمم العائدة لكل من العياري و العينة ثم تم حساب النسبة المئوية للمادة الفعالة لهذه العينة .

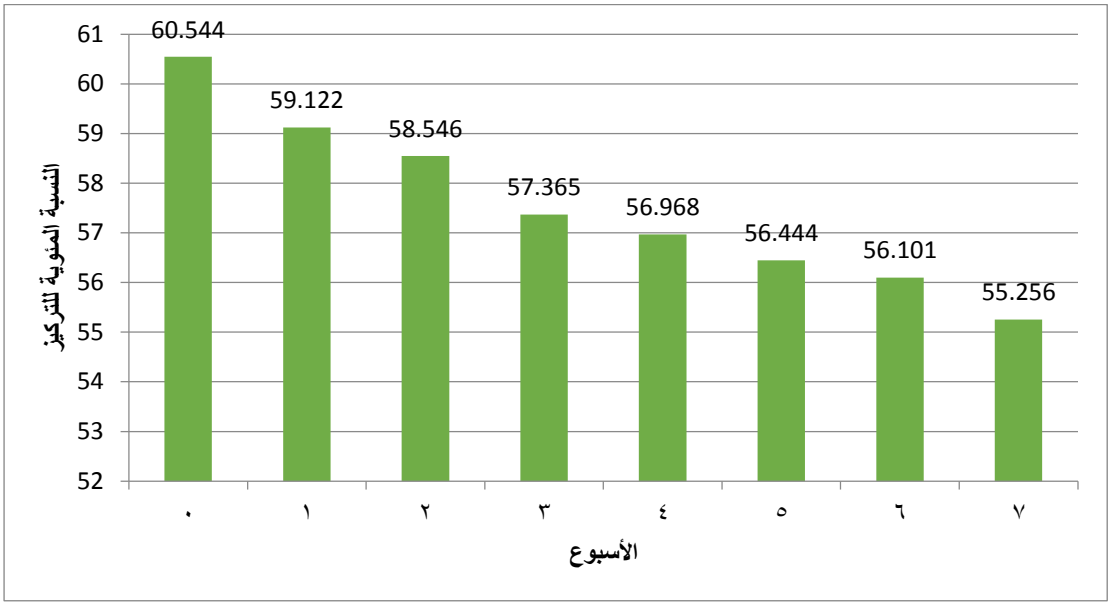
تمت خطوات العمل هذه على محلول العينة X3اللحظة 0 من تاريخ الفتح.

و كررت هذه العملية على مدى ثمان أسابيع بفاصل زمني قدره أسبوع فكانت نتائج نسبة المادة الفعالة كما في الجدول التالي:

الجدول (20) يوضح نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X3

المدة الزمنية	وسطي ثلاث قراءات	النسبة المئوية للتركيز	RSD%
لحظة الفتح	1459343	60.544	0.156
الأسبوع الأول	1397283	59.122	0.344
الأسبوع الثاني	1293122	58.546	0.658
الأسبوع الثالث	1210006	57.365	0.630
الأسبوع الرابع	1194514	56.968	0.698
الأسبوع الخامس	1153637	56.444	0.452
الأسبوع السادس	1112589	56.101	0.865
الأسبوع السابع	1088857	55.256	0.254

الشكل(19) **مخطط يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في مستحضرX3 خلال المدة الزمنية المدروسة**



1-3-4- نتائج دراسة المستحضر الرابع المستورد X حسب بروتوكول الدراسة.:

تم حقن محلول العياري ذو التركيز المماثل لتركيز المحلول المدروس ثلاث مرات ثم حقن محلول العينة االثانية X ثلاث مرات و حسب وسطي مساحات القمم العائدة لكل من العياري و العينة ثم تم حساب النسبة المئوية للمادة الفعالة لهذه العينة .

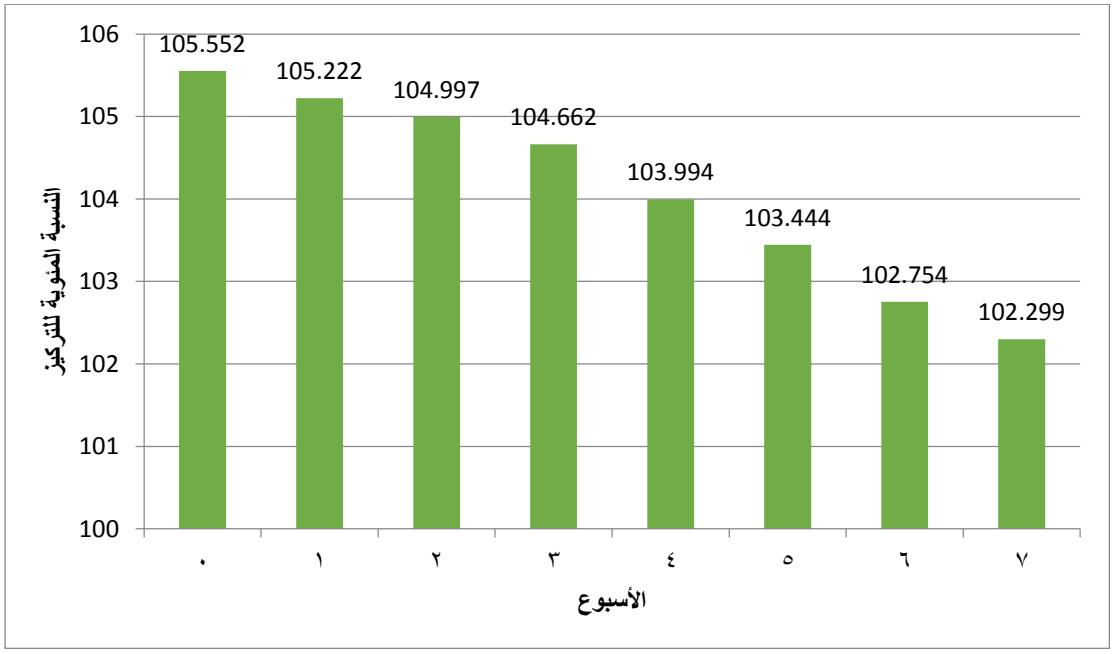
تمت خطوات العمل هذه على محلول العينة Xاللحظة 0 من تاريخ الفتح.

و كررت هذه العملية على مدى ثمان أسابيع بفاصل زمني قدره أسبوع فكانت نتائج نسبة المادة الفعالة كما في الجدول التالي:

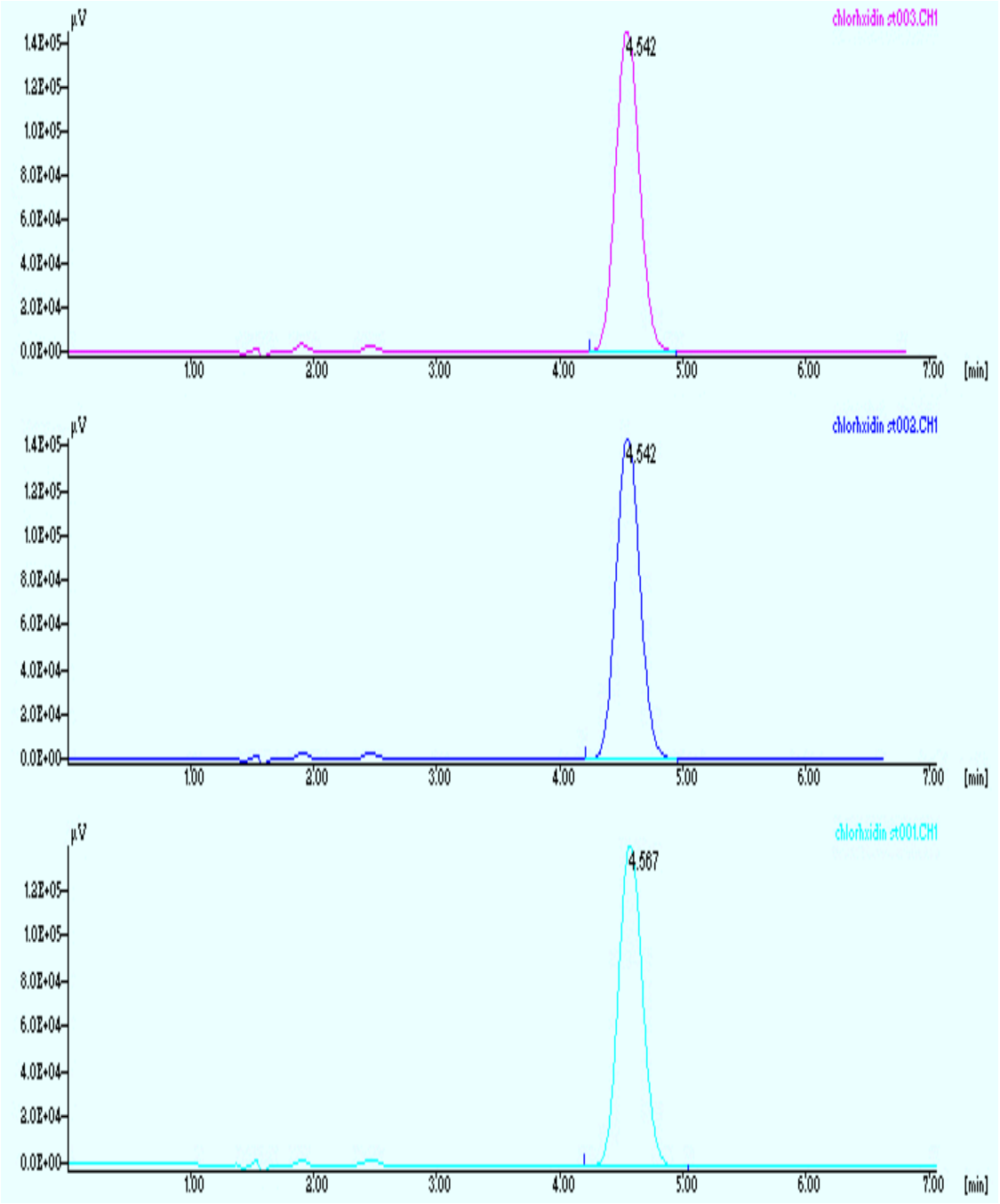
الجدول (21) يوضح نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X

المدة الزمنية	وسطي ثلاث قراءات	النسبة المئوية للتركيز	RSD%
لحظة الفتح	2654211	105.552	0.822
الأسبوع الأول	2654555	105.222	1.102
الأسبوع الثاني	2598989	104.997	0.965
الأسبوع الثالث	2522100	104.662	0.655
الأسبوع الرابع	2500080	103.994	0.748
الأسبوع الخامس	2456522	103.444	0.235
الأسبوع السادس	2417543	102.754	0.456
الأسبوع السابع	2388654	102.299	1.100

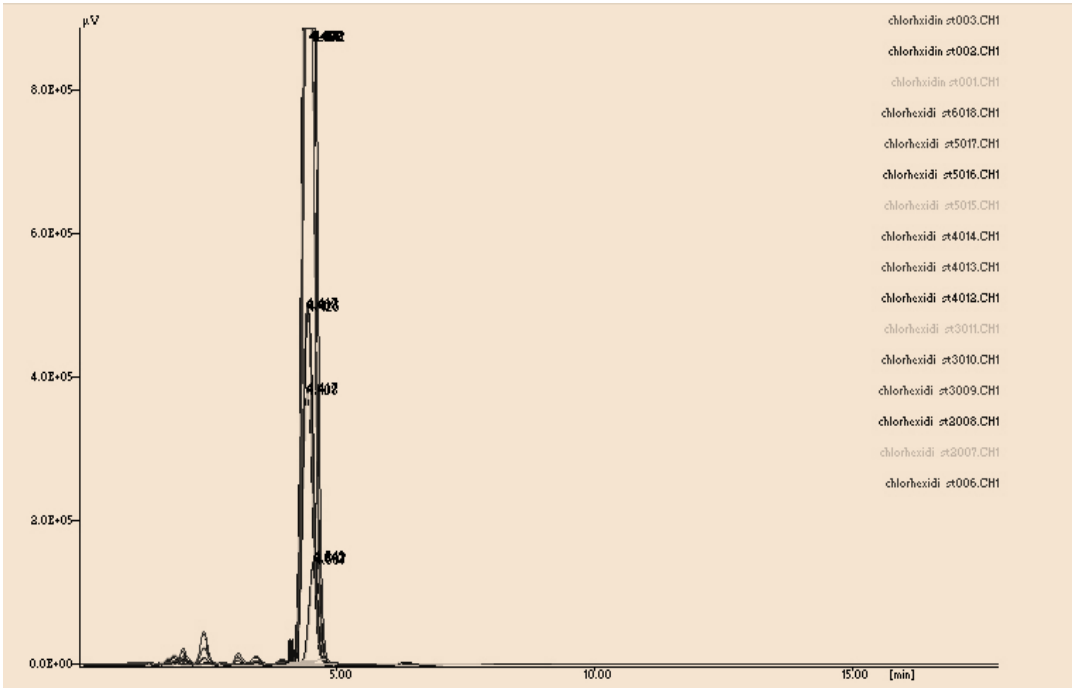
الشكل(20) مخطط يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في مستحضرX خلال المدة الزمنية المدروسة



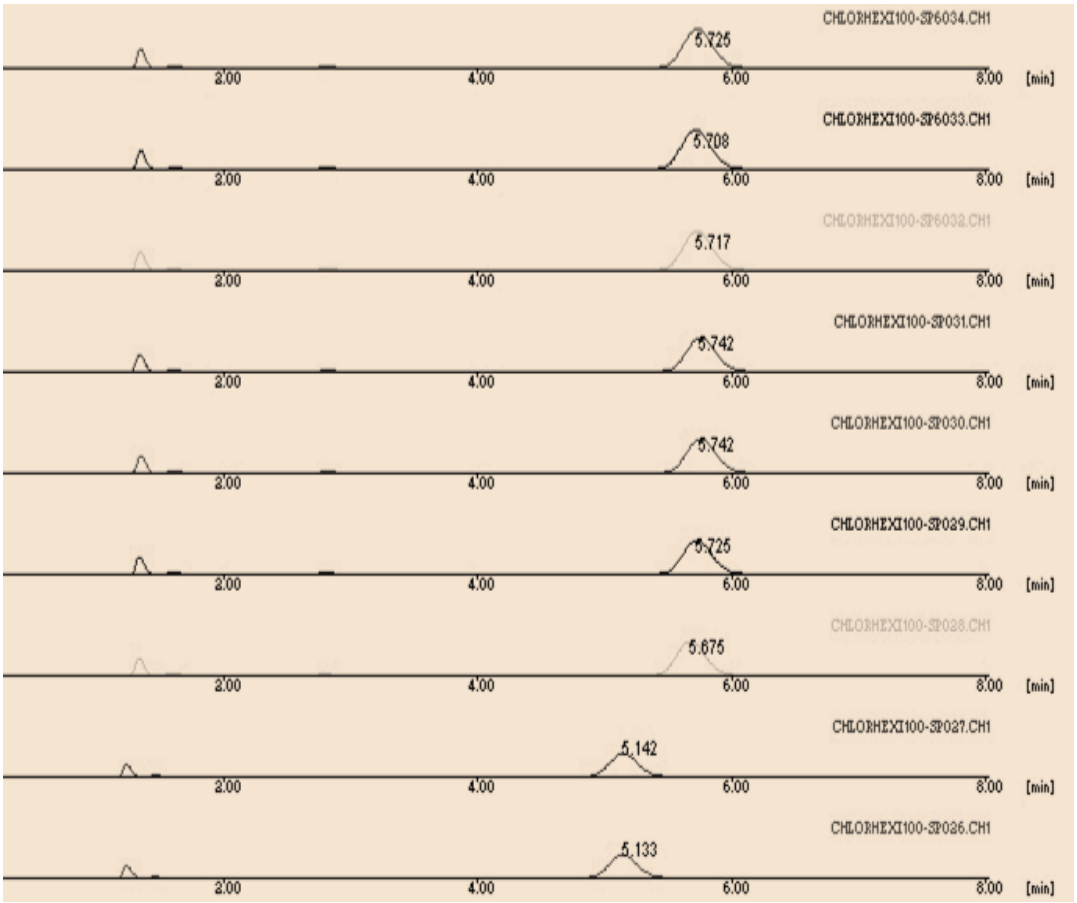
الشكل (21) و تمثل ثلاث حقنات متتالية من العياري



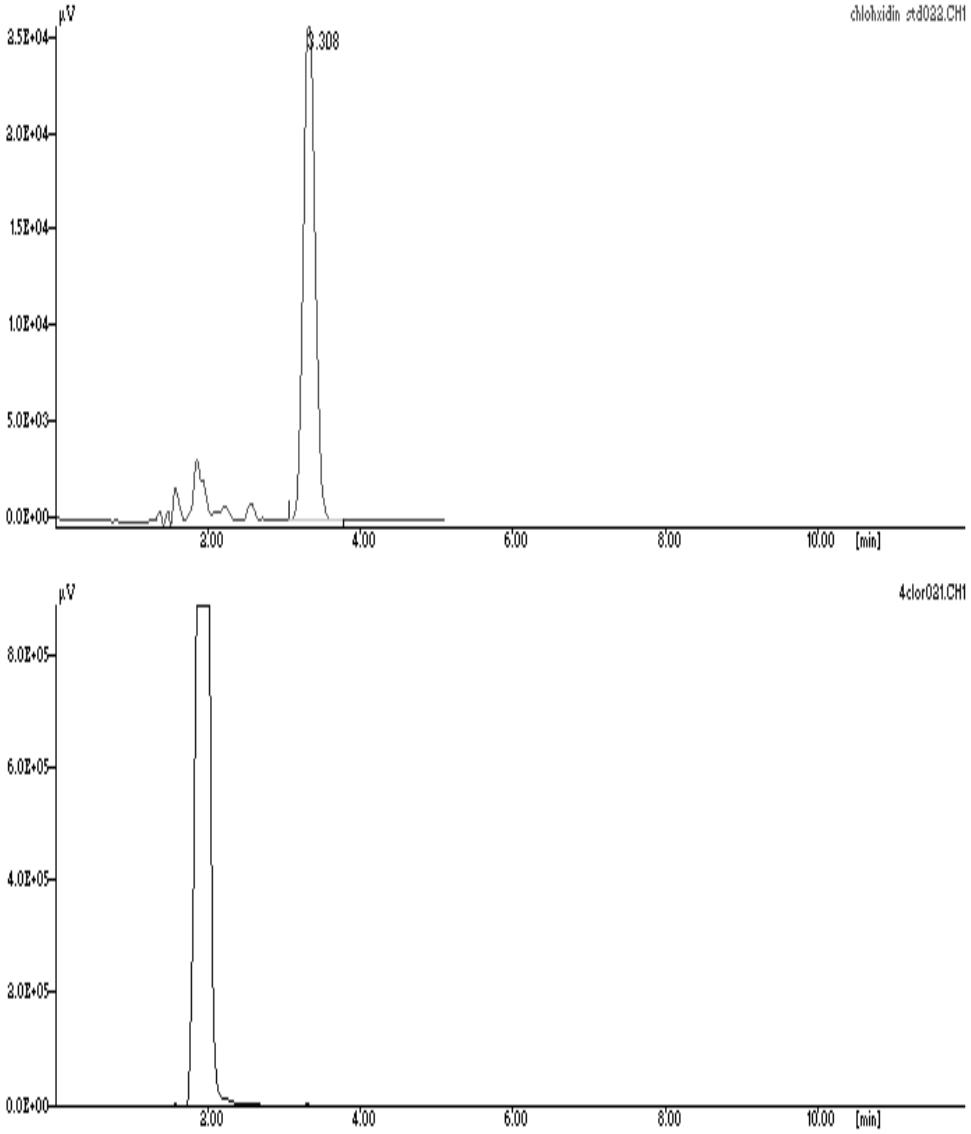
الشكل (22) يوضح المخطط الكروماتوغرافي لمادة المعياري عند الحقن بتراكيز متدرجة



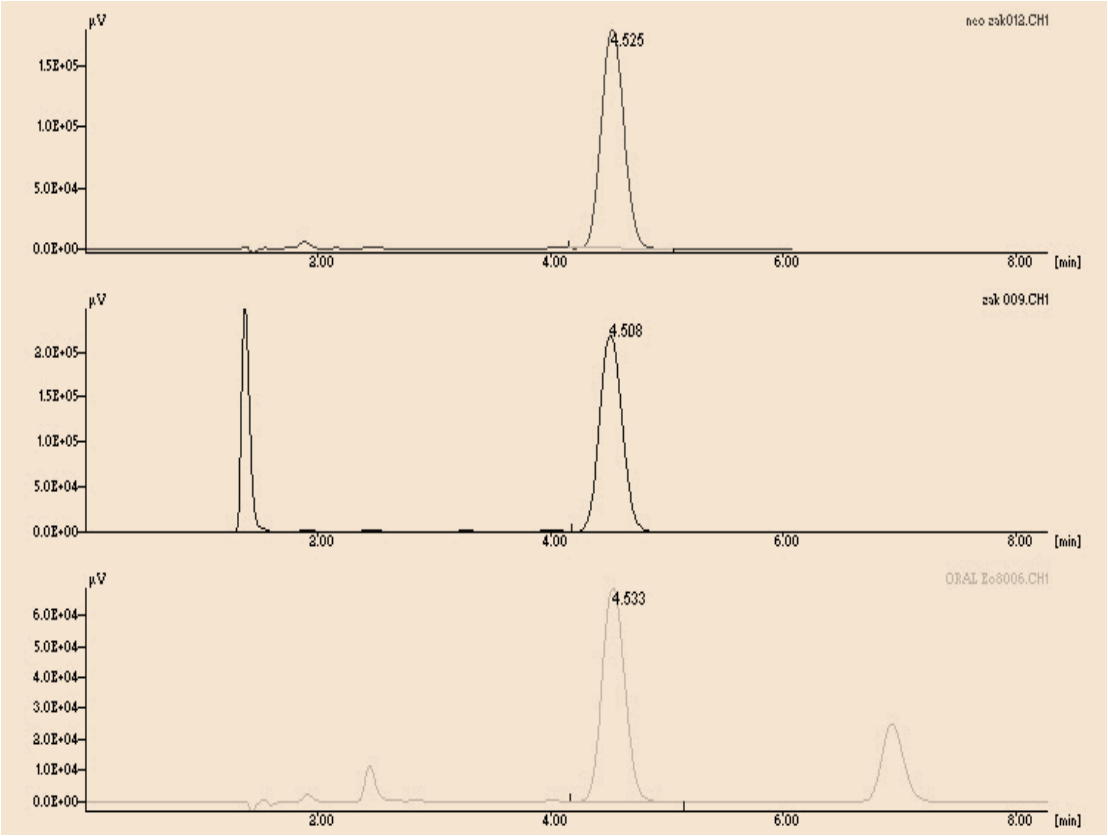
الشكل (23)يوضح المخطط الكروماتوغرافي لمستحضر **(السلسلة العيارية)**



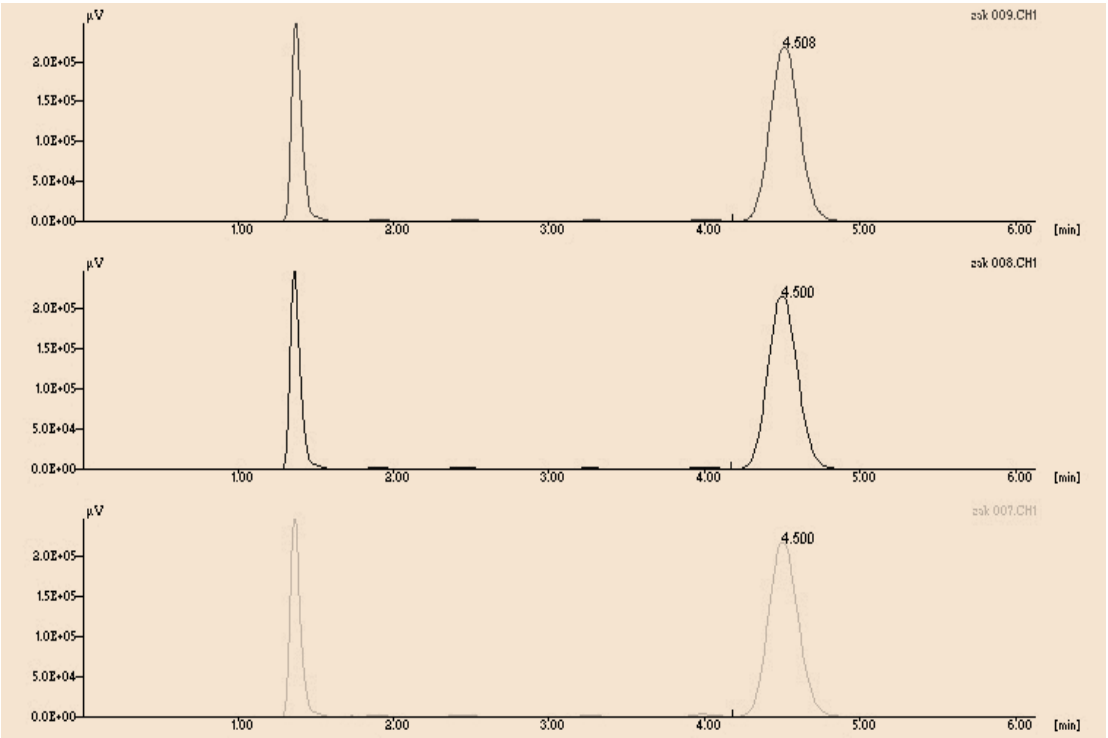
الشكل (24)يوضح المخطط الكروماتوغرافي لعياري الكلورهيكسيدين بالإضافة إلى المخطط الكروماتوغرافي للشائبة 4-كلور انيلين



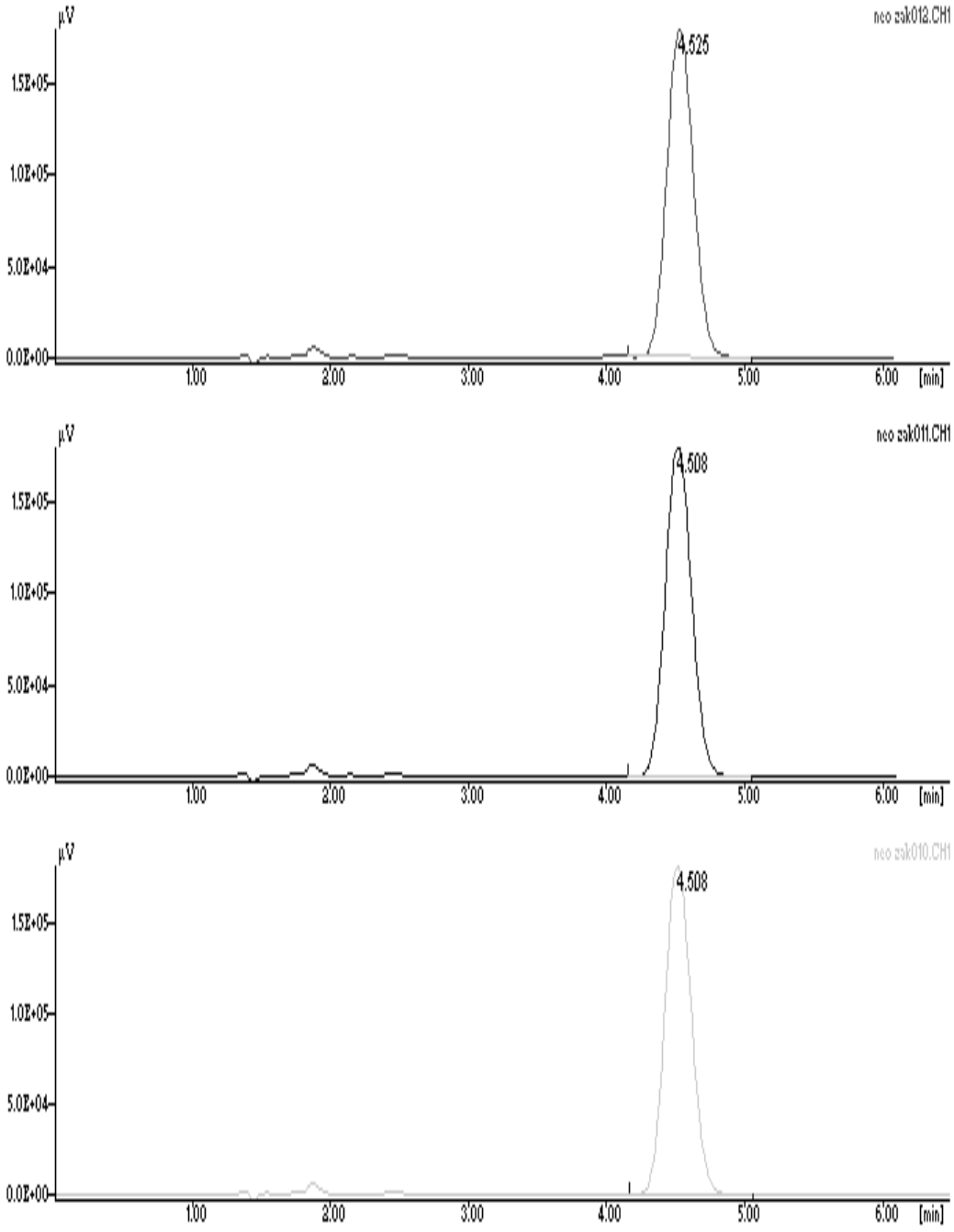
الشكل (25)يوضح المخطط الكروماتوغرافي لثلاث مستحضرات يقارن موقع قمة كل مادة وشوائبها وسواغاتها.



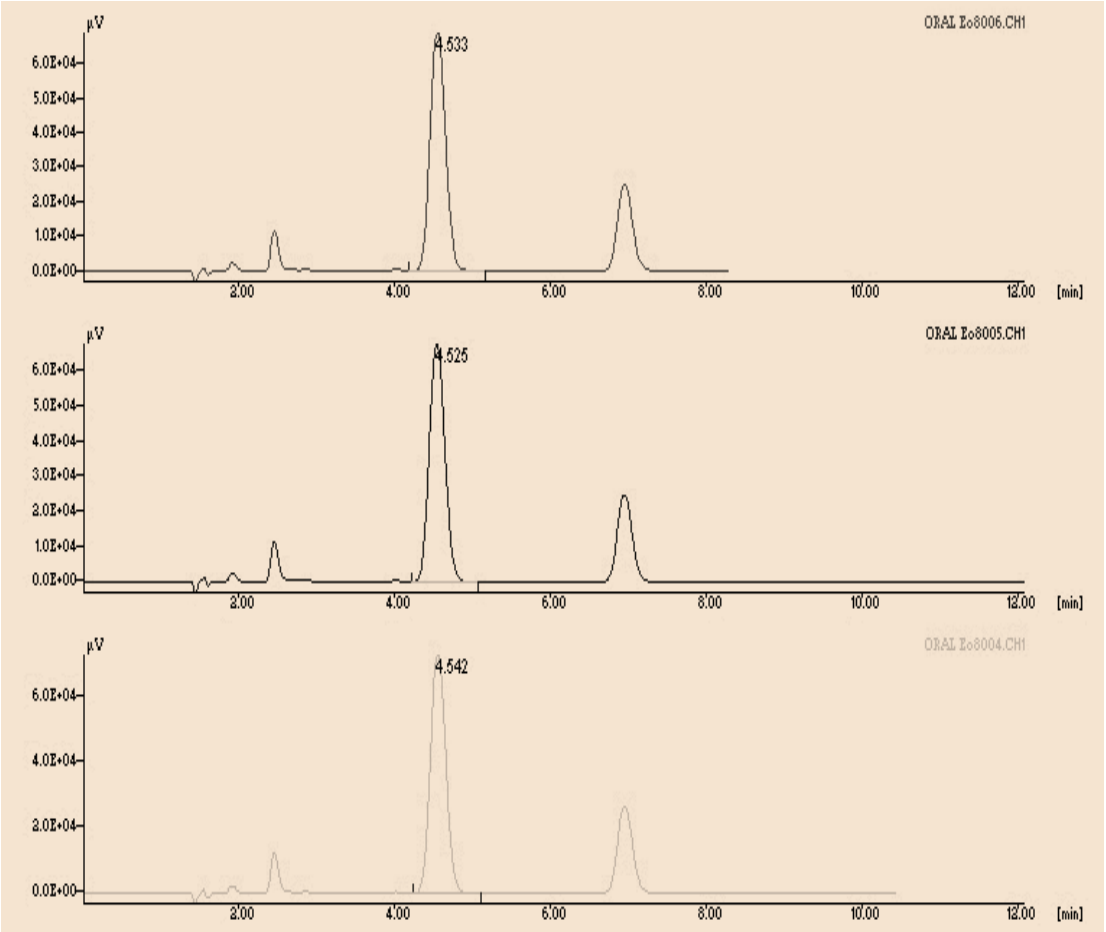
الشكل (26) المخطط الكروماتوغرافي لمستحضرX1



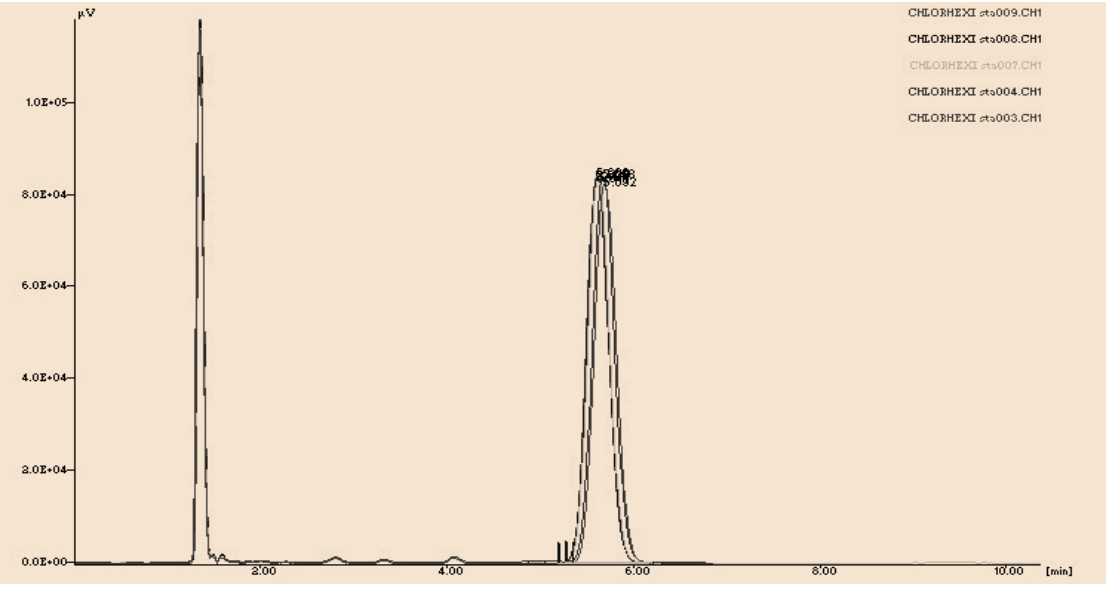
الشكل (27) المخطط الكروماتوغرافي لثلاث حقنات متتالية من مستحضرX2



الشكل (28) المخطط الكروماتوغرافي لمستحضر **X3**



الشكل (29) المخطط الكروماتوغرافي لمستحضر X المستورد



2-مقايسة الكلورهيكسيدين باستخدام الطريقة الحيوية:

نتائج الدراسة الحيوية:

2-1-نتائج الدراسة الحيوية للمستحضر X1:

الجدول (22)يوضح انخفاض فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X1 خلال مدة الدراسة

الأسبوع	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي الأم	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي المدروس بعد تطبيق مستحضرX1	عدد دروات القتل
الأول (0)	$10^{11}*2$	$10^{4}*5$	6.602059991
الثاني	$10^{11}*1$	$10^{5}*4$	6.397940009
الثالث	$10^{10}*2.4$	$10^{5}*3$	6.079181246
الرابع	$10^{11}*8$	$10^{6}*1$	5.903089987
الخامس	$10^{12}*2$	$10^{6}*2.7$	5.698970004
السادس	$10^{11}*2.6$	$10^{6}*8.8$	5.470490676
السابع	$10^{12}*1.8$	$10^{6}*9$	5.301029996
الثامن	$10^{11}*4.4$	$10^{6}*3.5$	5.099384632

2-2- **نتائج الدراسة الحيوية للمستحضر X2**:

الجدول (23)يوضح انخفاض فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X2خلال مدة الدراسة

الأسبوع	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي الأم	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي المدروس	عدد دورات القتل
الأول (0)	$10^{11}*2$	$^{5}10*2.2$	5.958607
الثاني	$10^{11}*1$	$10^{5}*3$	5.69897
الثالث	$10^{10}*2.4$	$10^{5}*1.5$	5.535113
الرابع	$10^{11}*8$	$^{5}10*7$	5.30103
الخامس	$10^{12}*2$	$^{5}10*8$	5.60206
السادس	$10^{11}*2.6$	$^{5}10*6$	5.238882
السابع	$10^{12}*1.8$	$^{5}10*4$	4.954243
الثامن	1011*4.4	106*3.2	4.643453

3-2- **نتائج الدراسة الحيوية للمستحضر X3**:

الجدول (24)يوضح انخفاض فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X3 خلال مدة الدراسة

الأسبوع	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي الأم	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي المدروس بعد تطبيق مستحضر X3	عدد دورات القتل
الأول (0)	1011*2	104*7.2	4.823909
الثاني	1011*1	104*1	4.69897
الثالث	1010*2.4	105*4.5	4.380211
الرابع	1011*8	105*5	4
الخامس	1012*2	107*1.5	3.823909
السادس	1011*2.6	510*8	3.511883
السابع	1012*1.8	710*1.2	3.30103
الثامن	1011*4.4	106*5	3.166331

4-2- نتائج الدراسة الحيوية للمستحضر X:

الجدول (25)يوضح انخفاض فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X خلال مدة الدراسة

الأسبوع	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي الأم	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي المدروس المستوردX	عدد دورات القتل
الأول	1011*2	104*3.2	6.79588
الثاني	1011*1	104*2	6.69897
الثالث	1010*2.4	105*5	6.681241
الرابع	1011*8	106*2.5	6.647817
الخامس	1012*2	106*1.3	6.39794
السادس	1011*2.6	106*6.2	6.30103
السابع	1012*1.8	106*7.8	6.176091
الثامن	1011*4.4	106*8.5	6.041393

5-2- نتائج الدراسة الحيوية للمعياري X´ :

الجدول (26)يوضح انخفاض فعالية الكلورهيكسيدين في المعياري خلال مدة الدراسة

الأسبوع	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي الأم	عدد المستعمرات في المعلق الجرثومي المدروس المعياري	عدد دورات القتل
الأول	1011*2	104*7.5	7.187087
الثاني	1011*1	104*1	7
الثالث	1010*2.4	104*9	6.90309
الرابع	1011*8	105*2.7	6.823909
الخامس	1012*2	105*3.6	6.744727
السادس	1011*2.6	106*2.5	6.511883
السابع	1012*1.8	106*4	6.477121
الثامن	1011*4.4	106*7.2	6.321233

لم نكتف بالدراسة بتحديد التراكيز المتبقية من المادة الدوائية المدروسة بل قمنا أيضا باختبار فعالية تلك التراكيز مع الفواصل الزمنية المدروسة ذاتها في الطريقة التحليلية. [36]

إن التعامل مع المواد من الناحية الكيمائية فقط ليس كافيا للتنبؤ بفعالة تلك المادة وذلك لوجود عدد كبير من العوامل التي قد تهمل من غير قصد وتؤدي إلى فقدان الفعالية الحيوية: وهذا ما أنبأتنا به دراستنا الحيوية، حيث كانت خلاصة النتائج المذكورة سابقا كالآتي:

خلاصة النتائج:

1- حافظ مستحضر X1 على قدرته أو فعاليته المضادة للجراثيم حسب المعاييير الدستورية المذكورة سابقا حتى نهاية الفترة الزمنية المدروسة (إحداث القتل الجرثومي حتى الأسبوع الثامن من الدراسة حيث كان الانخفاض في معدل القتل الجرثومي حتى نهاية الدراسة فوق ال5. وهو المعيار الأساسي لتقييم تلك القدرة.)

2- حافظ مستحضرX2 على قدرته أو فعاليته المضادة للجاثيم حسب المعاييير الدستورية المذكرو سابقا حتى نهاية الفترة الزمنية المدروسة (أقل قدرة بقليل مقارنة ب X1على إحداث القتل الجرثومي حتى الأسبوع السادس من الدراسة وبعدها فقد الفعالية القاتلة التي يجب أن تكون فوق 5.)

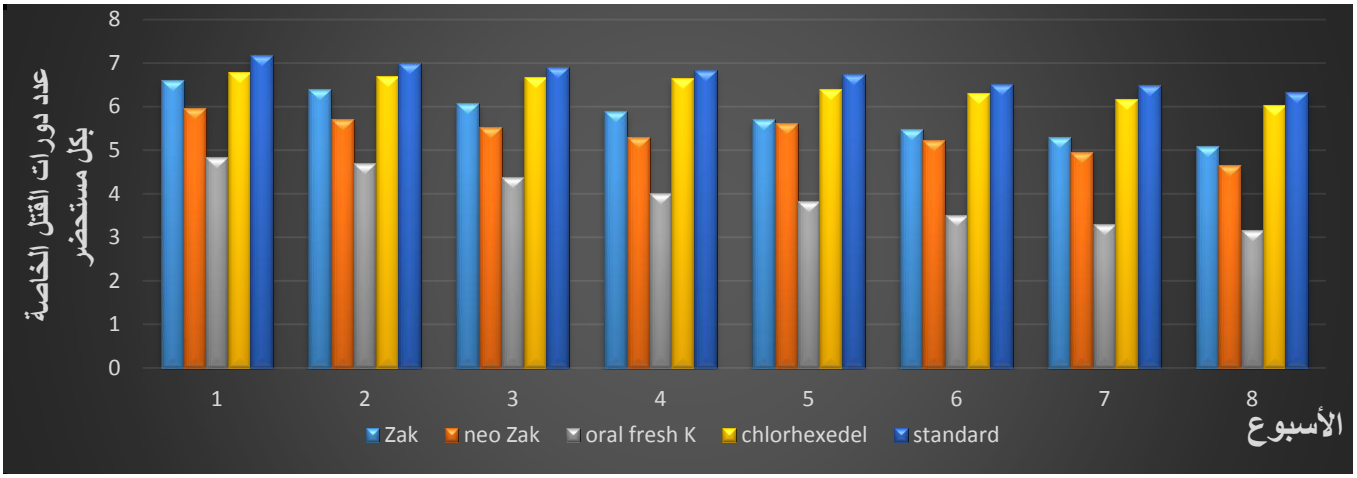
3- كان مستحضر X3 عديم الفعالية تماما من اللحظة صفر حيث كان لوغاريتم القتل أقل من 5 وهذا ما يتوافق مع الدراسة التحليلية.

4- حافظ مستحضر X المستورد على قدرته أو فعاليته المضادة للجاثيم حسب المعاييير الدستورية المذكرو سابقا حتى نهاية الفترة الزمنية المدروسة (من حيث القدرة على إحداث القتل الجرثومي جيدة وكان لوغاريتم القتل إجمالا طول مدة الدراسة أكبر من 5.)

5- حافظ المستحضر المعياري 'X على قدرته أو فعاليته المضادة للجاثيم حسب المعاييير الدستورية المذكرو سابقا حتى نهاية الفترة الزمنية المدروسة

6- نعتقد أن تميز فعالية مستحضري X1و X2 ،بالرغم من إخلالهما بالشروط الدستورية للحفظ قد جاءت بسبب إضافة الفلور إلى الغسول، الأمر الذي أعطى تأثير تآزري ضد الجراثيم أفضل من غيره.

الشكل(30) يوضح عدد دورات القتل الخاصة بكل مستحضر



الجدول(27) يوضح عدد دورات القتل الخاصة بكل مستحضر

X ´	X	X1	X2	X3	عدد دورات القتل	الأسبوع
7.187087	6.79588	6.602059991	5.958607	4.823909	6.602059991	0
7	6.69897	6.397940009	5.69897	4.69897	5.397940009	1
6.90309	6.681241	6.079181246	5.535113	4.380211	4.903089987	2
6.823909	6.647817	5.903089987	5.30103	4	5.903089987	3
6.744727	6.39794	5.698970004	5.60206	3.823909	5.869666232	4
6.511883	6.30103	5.470490676	5.238882	3.511883	4.470490676	5
6.477121	6.176091	5.301029996	4.954243	3.30103	5.301029996	6
6.321233	6.041393	5.099384632	4.643453	3.166331	5.099384632	7

البـــاب الســادس:
الدراسة الإحصائية

جدول بعينة الدراسة خلال ثمانية أسابيع

الدواء	عدد الدورات	عدد ستعمرات بعد	عدد مستعمرات قبل	RSD	التركيز	متوسط ثلاثة قراءات	الزمن
x1	6.60	5.00E+04	2.00E+12	0.67	98.89	2.50E+06	0.00
x1	6.40	4.00E+05	1.00E+11	0.28	98.22	2.48E+06	1.00
x1	6.08	3.00E+05	2.40E+10	0.30	98.01	2.44E+06	2.00
x1	5.90	1.00E+04	8.00E+11	0.49	97.54	2.44E+06	3.00
x1	5.70	2.70E+06	2.00E+12	0.36	97.33	2.39E+06	4.00
x1	5.47	8.80E+06	2.60E+11	0.89	96.76	2.37E+06	5.00
x1	5.30	9.00E+06	1.80E+12	0.71	93.32	2.20E+06	6.00
x1	5.10	3.50E+06	4.40E+11	0.65	91.89	2.06E+06	7.00
x2	5.96	2.20E+05	2.00E+11	0.59	98.85	2.46E+06	0.00
x2	5.70	3.00E+05	1.00E+11	0.97	98.55	2.43E+06	1.00
x2	5.54	1.50E+05	2.40E+10	0.56	98.21	2.38E+06	2.00
x2	5.30	7.00E+05	8.00E+11	0.65	97.73	2.30E+06	3.00
x2	5.60	8.00E+05	2.00E+12	0.48	97.22	2.22E+06	4.00
x2	5.24	6.00E+05	2.60E+11	0.89	95.56	2.16E+06	5.00
x2	4.95	4.00E+05	1.80E+12	0.70	94.89	1.90E+06	6.00
x2	4.64	3.20E+06	4.40E+11	0.78	93.75	1.75E+06	7.00
x3	4.82	7.20E+04	2.00E+11	0.16	60.54	1.46E+06	0.00
x3	4.70	1.00E+04	1.00E+12	0.34	59.12	1.40E+06	1.00
x3	4.38	4.50E+05	2.40E+10	0.66	58.55	1.29E+06	2.00
x3	4.00	5.00E+05	8.00E+11	0.63	57.37	1.21E+06	3.00
x3	3.82	1.50E+07	2.00E+12	0.70	56.97	1.19E+06	4.00
x3	3.51	8.00E+05	2.60E+11	0.45	56.44	1.15E+06	5.00
x3	3.30	1.20E+07	1.80E+12	0.87	56.10	1.11E+06	6.00
x3	3.17	5.00E+06	4.40E+11	0.25	55.26	1.09E+06	7.00
x	6.80	3.20E+04	2.00E+11	0.82	105.55	2.65E+06	0.00
x	6.70	2.00E+04	1.00E+11	1.10	105.22	2.65E+06	1.00
x	6.68	5.00E+05	2.40E+10	0.97	105.00	2.60E+06	2.00
x	6.65	2.50E+05	8.00E+11	0.66	104.66	2.52E+06	3.00
x	6.40	1.30E+06	2.00E+12	0.75	103.99	2.50E+06	4.00
x	6.30	6.20E+06	2.60E+11	0.24	103.44	2.46E+06	5.00
x	6.18	7.80E+06	1.80E+12	0.46	102.75	2.42E+06	6.00
x	6.04	8.50E+06	4.40E+11	1.10	102.30	2.39E+06	7.00

خطوات الدراسة :

تنقسم الدراسة الاحصائية إلى دراسة كيميائية و دراسة جرثومية والربط بين الدراستين

أولاً :الدراسة الكيميائية:

الجدول (1)					
متوسط ثلاثة قراءات	الدواء	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
	X	8	2,524,081.75	103,097.39	36,450.43
	X1	8	2,360,160.38	153,923.13	54,420.05
	X2	8	2,198,159.75	254,350.23	89,926.39
	X3	8	1,238,668.88	133,717.20	47,276.17
	Total	32	2,080,267.69	532,742.56	94,176.47
التركيز	الدواء	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
	X	8	104.12	1.19	0.42
	X1	8	96.5	2.51	0.89
	X2	8	96.85	1.88	0.67
	X3	8	57.54	1.75	0.62
	Total	32	88.75	18.65	3.3

الفرضية الأولى :

H0: X1= X2= X3=X

لا توجد اختلافات حقيقة في متوسطات القراءات تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة

H1: X1≠ X2≠ X3≠ X

يوجد اختلافات حقيقة في متوسطات القراءات تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة

الجدول 2			
Test of Homogeneity of Variances			
متوسط ثلاثة القرارات			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.114	3	28	0.121

Homogeneity of Variance : لغرض اختبار تجانس تباين المجموعات التي تتم مقارنتها، باستخدام إحصائية Levene . حيث يعتبر تجانس التباين احد الشروط المهمة في إجراء تحليل التباين.

من الجدول (2) **Test of Homogeneity of Variances** نلاحظ أن

sig 0.121 >0.05 وبالتالي الفرضية القائلة بتجانس أو تساوي تباين متوسط ثلاثة قراءات نتيجة استعمال الأدوية ،أي لا يمكن رفضها مما يدل على تحقق شرط التجانس التباينات .

الجدول 3

ANOVA

متوسط القراءات

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,979,983,505,525	3	2,659,994,501,842	91.021	0.000
Within Groups	818,270,125,566	28	29,223,933,056		
Total	8,798,253,631,091	31			

من الجدول (3) :**ANOVA** نلاحظ أن قيمة F المصاحبة للاختبار تساوي :

F (3,28)=91.021 مما يدل على أن الفروق كبيرة بين متوسط ثلاثة القراءات بين الأدوية الأربعة

ولما كانت Sig 0.05>0.000 مما يؤدي رفض فرضية العدم بعدم وجود اختلاف بين متوسطات القراءات من جراء استخدام الأدوية الأربعة .

ولمعرفة الفروقات لابد من القيام باختبار الفروق بين متوسطات المجموعات المقارنة ومن بين هذه الطرق نجد طريقة Bonferroni .

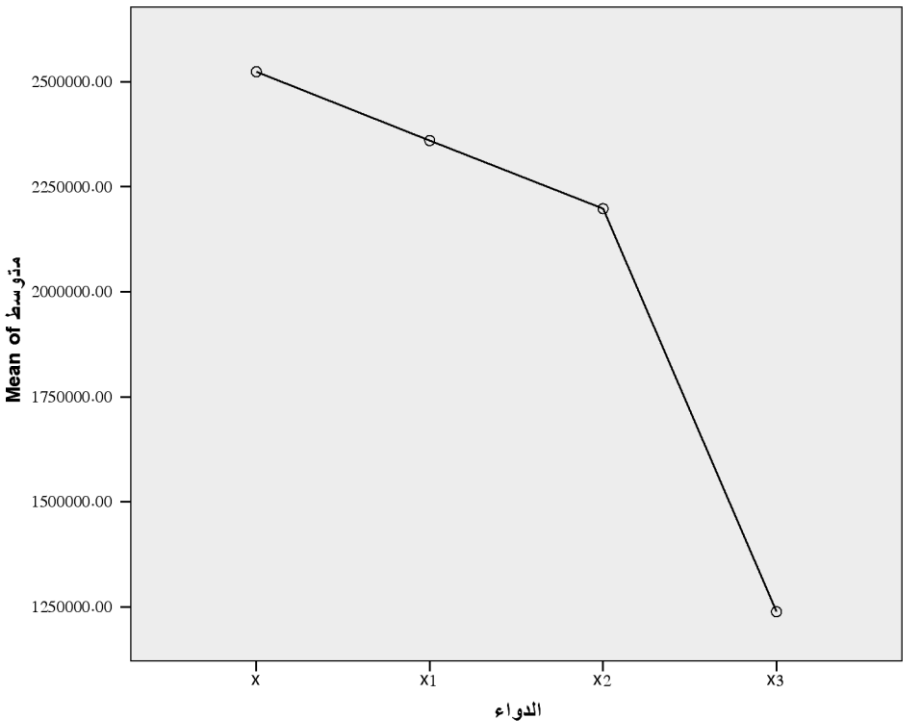
حيث تسمح هذه الطريقة بإجراء مقارنات متعددة Multiple Comparison لاختبار معنوية الفرق لكل زوج من المعالجات .

نلاحظ أن اختبار Bonferroni قد أظهر وجود فروق معنوية بين متوسطات القراءات بحسب استخدام الأدوية الأربعة

جميع المقارنات تظهر فروق جوهرية بين متوسط المجموعات المقارنات.

الجدول رقم (5)

Means Plots



الفرضية الثانية

H0: X1= X2= X3=X

لا توجد اختلافات حقيقة في متوسطات التراكيز تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة

H1: X1≠ X2≠ X3≠ X

يوجد اختلافات حقيقة في متوسطات التراكيز تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة

الجدول 6

Test of Homogeneity of Variances

التركيز

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.330	3	28	0.284

الجدول 7
ANOVA
التركيز

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,683.733	3	3,561.244	994.042	0.000
Within Groups	100.312	28	3.583		
Total	10,784.045	31			

من الجدول (7) **Test of Homogeneity of Variances** نلاحظ أن 0.05< 0.284 وبالتالي الفرضية القائلة بتجانس أو تساوي تباين متوسطات الأدوية قراءات نتيجة استعمال الأدوية ،أي لا يمكن رفضها مما يدل على تحقق شرط التجانس التباينات وهو من الشروط المهمة لإجراء تحليل التباين .

من الجدول (3) :**ANOVA** نلاحظ أن قيمة F المصاحبة للاختبار تساوي :

F (3,28)=994.042 مما يدل على أن الفروق كبيرة بين متوسط تراكيز الأدوية الأربعة

ولما كانت Sig00.000<0.05 مما يؤدي رفض فرضية العدم بعدم وجود اختلاف بين متوسطات تراكيز من جراء استخدام الأدوية الأربعة .

ولمعرفة الفروقات لابد من القيام باختبار الفروق بين متوسطات التراكيز المجموعات المقارنة ومن بين هذه الطرق نجد طريقة Bonferroni .

حيث تسمح هذه الطرقة بإجراء مقارنات متعددة Multiple Comparison لاختبار معنوية الفرق لكل زوج من المعالجات .

Post Hoc Tests

الجدول 8

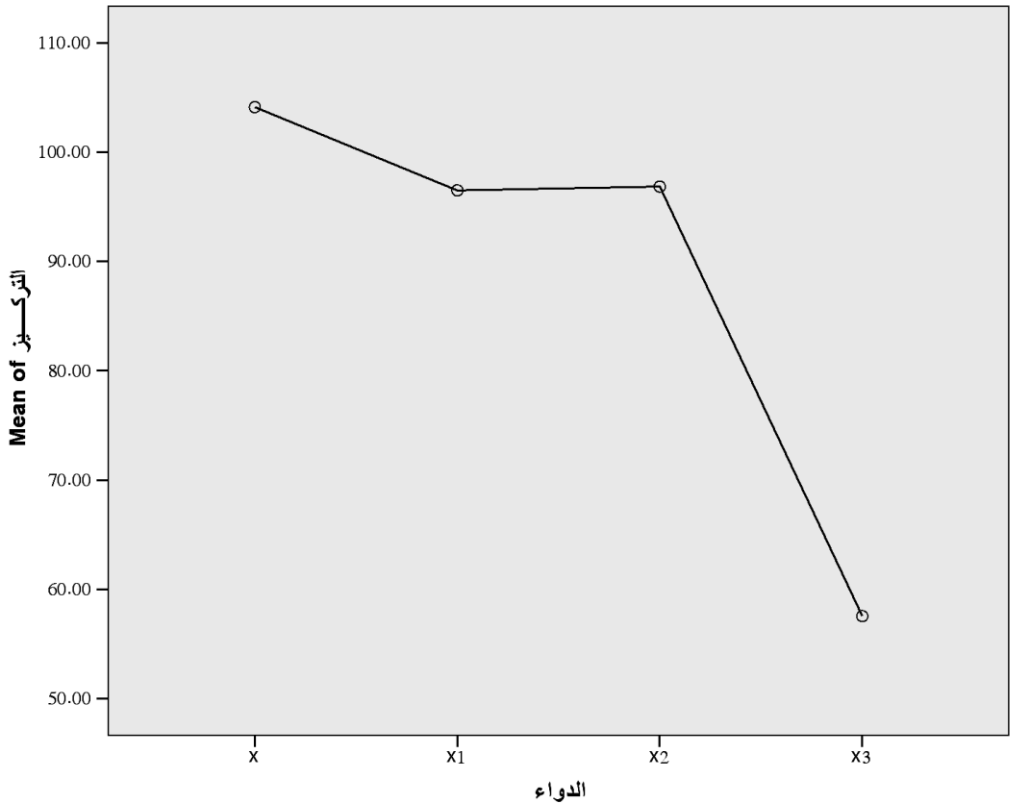
Multiple Comparisons

Dependent Variable: التركيز

Bonferroni						
(I) الدواء	(J) الدواء	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
X	X1	7.62037(*)	0.94639	0.000	4.9336	10.3071
	X2	7.26962(*)	0.94639	0.000	4.5829	9.9564
	X3	46.57187(*)	0.94639	0.000	43.8851	49.2586
X1	X	-7.62037(*)	0.94639	0.000	-10.3071	-4.9336
	X2	-0.35075	0.94639	1.000	-3.0375	2.3360
	X3	38.95150(*)	0.94639	0.000	36.2648	41.6382
X2	X	-7.26962(*)	0.94639	0.000	-9.9564	-4.5829
	X1	0.35075	0.94639	1.000	-2.3360	3.0375
	X3	39.30225(*)	0.94639	0.000	36.6155	41.9890
X3	X	-46.57187(*)	0.94639	0.000	-49.2586	-43.8851
	X1	-38.95150(*)	0.94639	0.000	-41.6382	-36.2648
	X2	-39.30225(*)	0.94639	0.000	-41.9890	-36.6155
*. The mean difference is significant at the .05 level.						

الجدول 9

Means Plots



نستنتج من الاختبار ترتيب متوسطات التراكيز الأدوية الأربعة على النحو التالي :

الدواء	المرتبة من حيث التركيز
X	الأولى
X2	الثانية
X1	الثالثة
X3	الرابعة

ولدى دراسة العلاقة الرياضية بين التركيز والزمن خلال مدة ثمانة أسابيع على الادوية الاربعة نجد ما يلي :

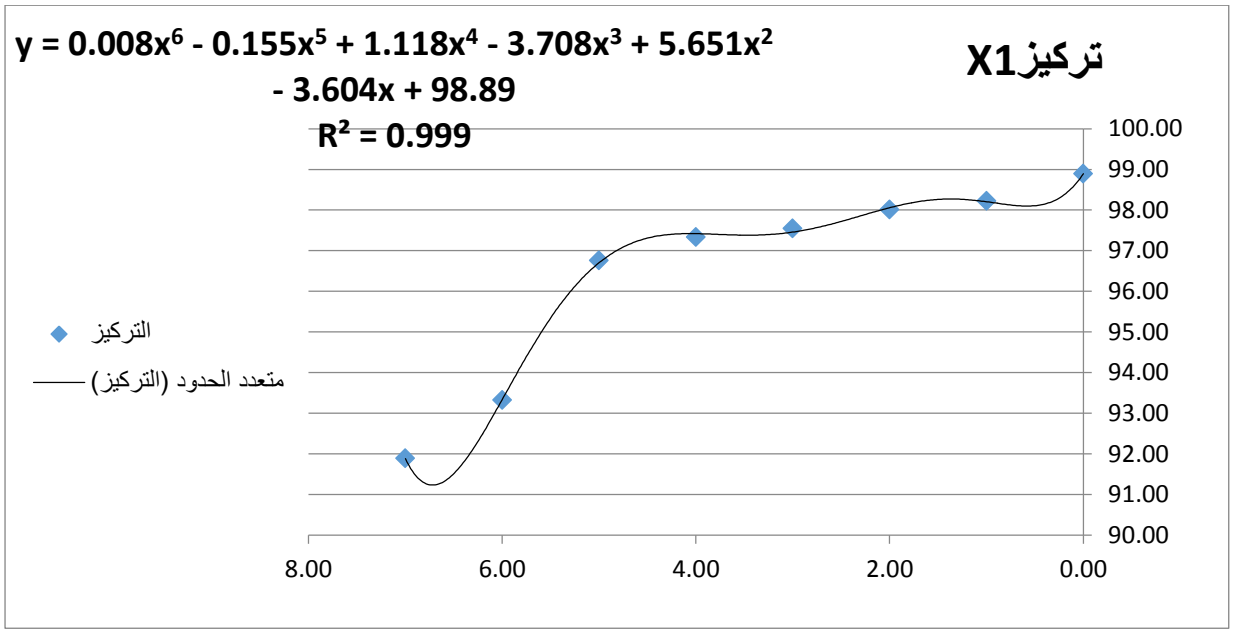
جدول 10

نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة

المستحضر X1

الرقم	الزمن	متوسط ثلاثة قراءات	التركيز	RSD
1	0	2499858	98.89	0.67
2	1	2477632	98.22	0.28
3	2	2442298	98.01	0.30
4	3	2442298	97.54	0.49
5	4	2392709	97.33	0.36
6	5	2371895	96.76	0.89
7	6	2195816	93.32	0.71
8	7	2058777	91.89	0.65

الجدول 11

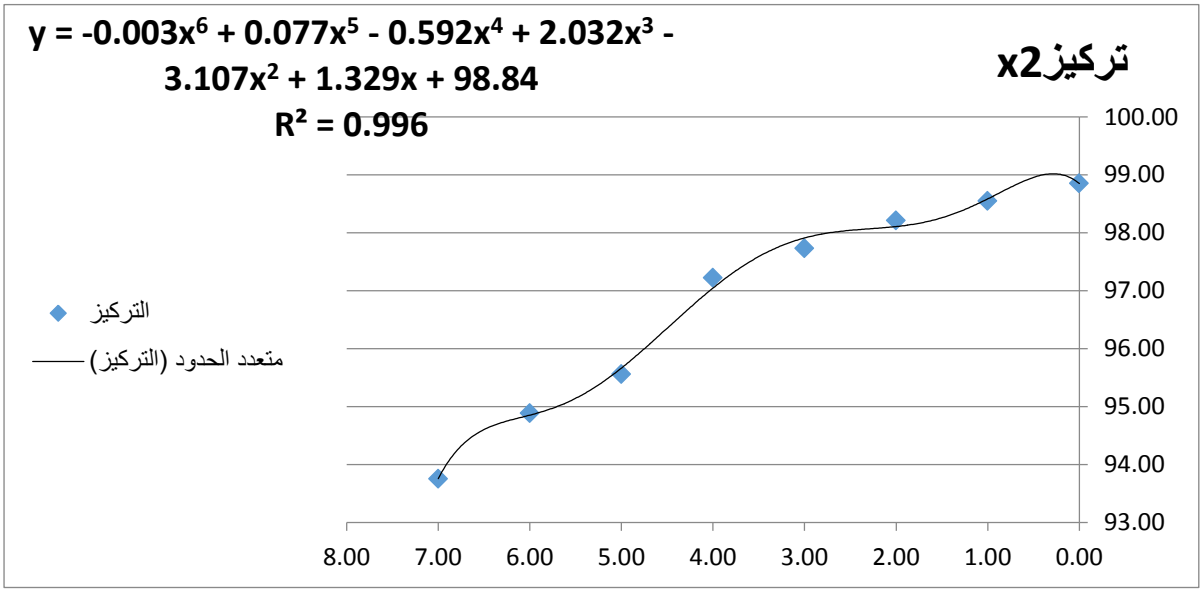


الجدول 12

نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة المستحضر X2

الرقم	الزمن	متوسط ثلاثة قراءات	التركيز	RSD
1	0.00	2462689.00	98.85	0.59
2	1.00	2425891.00	98.55	0.97
3	2.00	2375895.00	98.21	0.56
4	3.00	2295897.00	97.73	0.65
5	4.00	2215584.00	97.22	0.48
6	5.00	2158745.00	95.56	0.89
7	6.00	1895842.00	94.89	0.70
8	7.00	1754735.00	93.75	0.78

الجدول 13

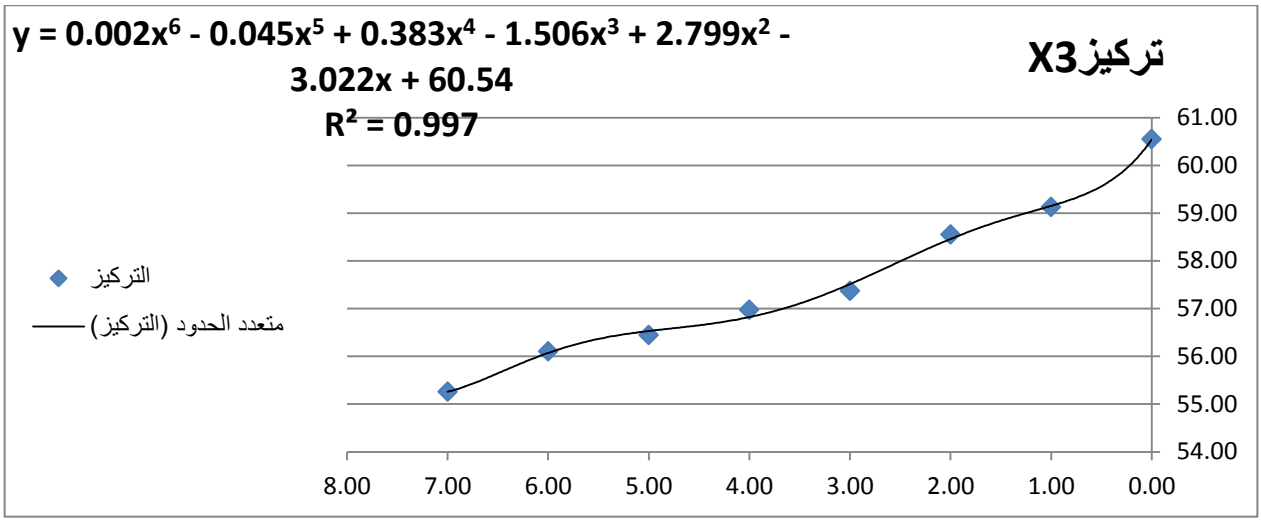


الجدول 14

نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة المستحضر X3

الرقم	الزمن	متوسط ثلاثة قراءات	التركيز	RSD
1	0.00	1459343	60.54	0.16
2	1.00	1397283	59.12	0.34
3	2.00	1293122	58.55	0.66
4	3.00	1210006	57.37	0.63
5	4.00	1194514	56.97	0.70
6	5.00	1153637	56.44	0.45
7	6.00	1112589	56.10	0.87
8	7.00	1088857	55.26	0.25

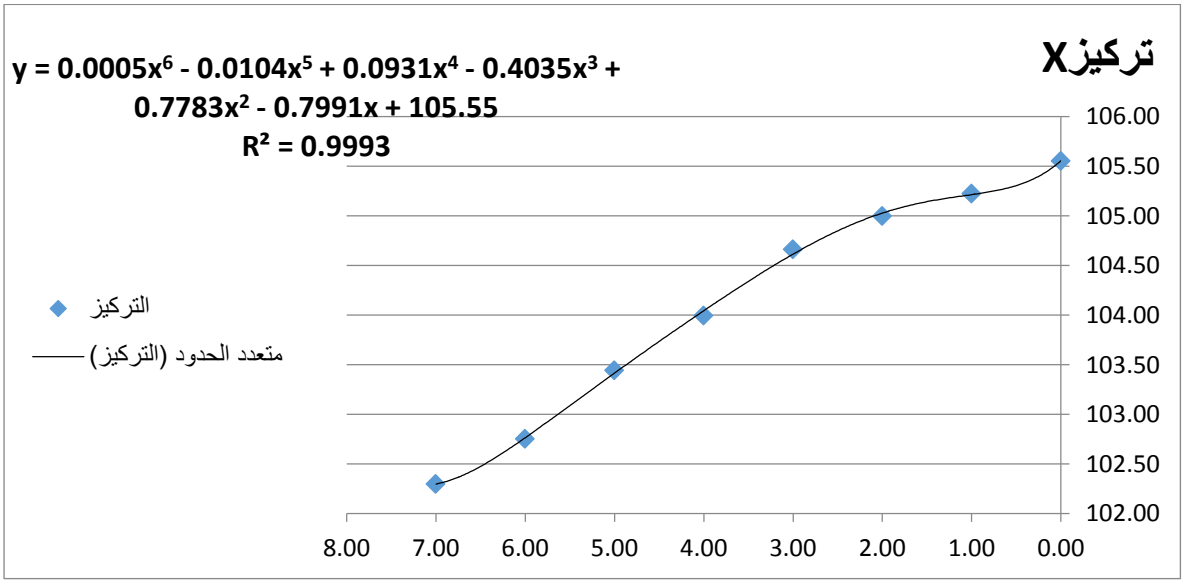
الجدول 15



الجدول 16

نسبة انخفاض المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة المستحضر X				
RSD	التركيز	متوسط ثلاثة قراءات	الزمن	الرقم
0.82	105.55	2654211	0	1
1.10	105.22	2654555	1	2
0.97	105.00	2598989	2	3
0.66	104.66	2522100	3	4
0.75	103.99	2500080	4	5
0.24	103.44	2456522	5	6
0.46	102.75	2417543	6	7
1.10	102.30	2388654	7	8

الجدول 17



الجدول 18								
يوضح متوسط تراكيز كل من المادة الفعالة الكلور هيكسيدين خلال الدراسة								
الدواء	الأسبوع الأول	الأسبوع الثاني	الأسبوع الثالث	الأسبوع الرابع	الأسبوع الخامس	الأسبوع السادس	الأسبوع السابع	الأسبوع الثاممن
x1	98.89	98.22	98.01	97.54	97.33	96.76	93.32	91.89
x2	98.85	98.55	98.21	97.73	97.22	95.56	94.89	93.75
x3	60.54	59.12	58.55	57.37	56.97	56.44	56.10	55.26
x	105.55	105.22	105.00	104.66	103.99	103.44	102.75	102.30
متوسط	90.96	90.28	89.94	89.33	88.88	88.05	86.77	85.80

من الجدول (18) نجد أن قيمة تركيز **x3** هي شاذة ويجب استبعادها من المعادلة العامة وهي تحرف متوسط التراكيز .

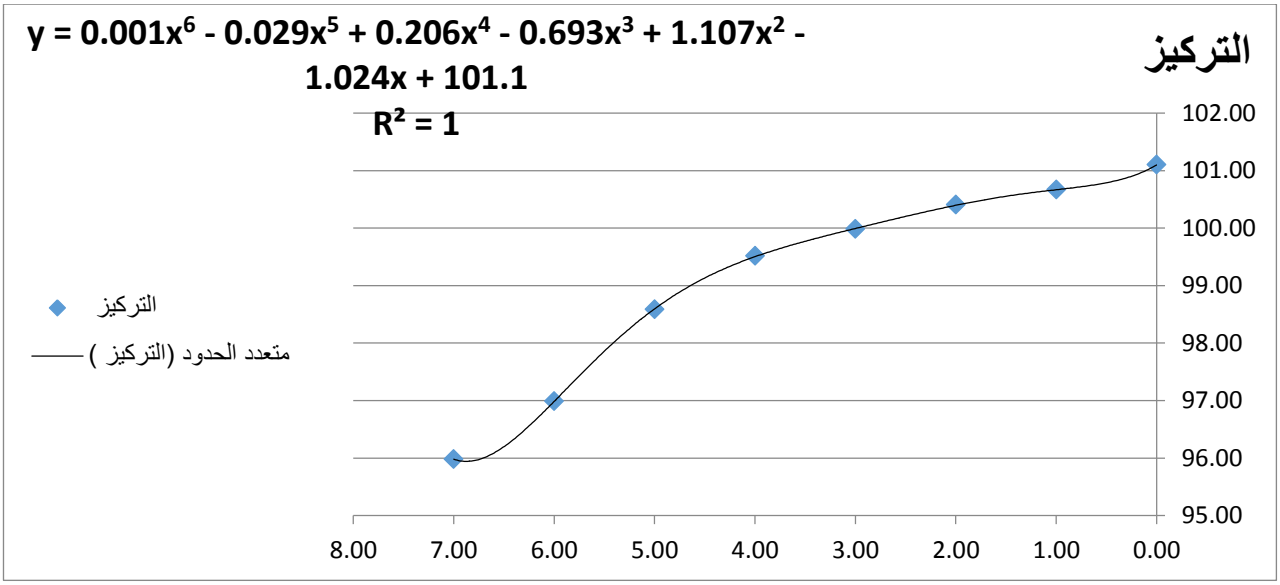
ونقوم بحساب المتوسط بعد استبعاد الدواء x3

الجدول 19

يوضح متوسط تراكيز كل من المادة الفعالة الكلور هيكسيدين خلال الدراسة بعد استبعاد x3								
x1	98.892	98.222	98.005	97.544	97.333	96.756	93.321	91.888
x2	98.85	98.55	98.21	97.73	97.22	95.56	94.89	93.75
x3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
x	105.55	105.22	105.00	104.66	103.99	103.44	102.75	102.30
متوسط	101.10	100.66	100.40	99.98	99.52	98.59	96.99	95.98

الزمن	0	1	2	3	4	5	6	7
التركيز	101.10	100.66	100.40	99.98	99.52	98.59	96.99	95.98

الجدول (20)



$$y = 0.001x6 - 0.029x5 + 0.206x4 - 0.693x3 + 1.107x2 - 1.024x + 101.1$$

حيث* y : تركيز المادة الفعالة

X*:الزمن مقدر بالأسبوع

يمكن استخدام هذه المعادلة لتنبؤ بتركيز كلور هيكسيدين لأي منتج في السوق يكون تركيزه بين [98.85 ، 101.10] خلال زمن الاستخدام المقدر بالأسبوع هذا بفرض تثبت الحرارة والضغط الجوي .

ثانياً : الدراسة الميكروبيولوجية:

أولاً : توصيف عينة الدراسة

الجدول رقم (21)

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
colony before	32	2.40E+10	2.00E+12	7.87E+11	7.59E+11
colony after	32	1.00E+04	1.50E+07	2.83E+06	4.03E+06
killing number	32	3.17E+00	6.80E+00	5.40E+00	1.04E+00
Valid N (listwise)	32				

اختبار T للعينات المزدوجة، Paired samples t-test

- **تضمن هذا الاختبار فحص فرض تتعلق بمساواة متوسط**

متغير لنفس العينة

- **بحث تكون مشاهدات على عينة الأزواج**

الفرضية الثالثة :

H0: X1= X2= X3=X

لا توجد اختلافات حقيقة في متوسطات عدد مستعمرات جرثومية تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة

H1: X1≠ X2≠ X3≠ X

توجد اختلافات حقيقة في متوسطات عدد مستعمرات جرثومية تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة

T-Test

الجدول (22)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	colony before	8.E+11	32	8.E+11	1.E+11
	colony after	3.E+06	32	4.E+06	7.E+05

الجدول (23)

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Colony before & colony after	32	0	0

الجدول (24)

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Upper	Lower			
Pair 1	colony before - colony after	8.E+11	8.E+11	1.E+11	5.E+11	1.E+12	6	31	0.000

يشير اختبار T إلى وجود اختلاف جوهوي في متوسط عدد المستعمرات الجرثومية نتيجة استخدام الأدوية الأربعة

T (31) = 6 X < 0.000

حيث متوسط عدد المستعمرات الجرثومية قبل استخدام الأدوية 8.E+11

ومتوسط عدد المستعمرات الجرثومية بعد استخدام الأودية 3.E+06

ومنه يمكن القول بأن الأدوية الأربعة فعالة في قتل الجراثيم .

الفرضية الرابعة :

H0: X1= X2= X3=X

لا توجد اختلافات حقيقة في عدد دورات القتل تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة .

H1: X1≠ X2≠ X3≠ X

توجد اختلافات حقيقة في عدد دورات القتل تعزى لاستخدام أحد الأدوية الأربعة .

الجدول (25)

Descriptives

Std. Error	Std. Deviation	Mean	N	
0.1	0.28	6.47	8	X
0.19	0.53	5.82	8	X1
0.15	0.42	5.37	8	X2
0.22	0.63	3.96	8	X3
0.18	1.04	5.4	32	Total

الجدول (26)

Test of Homogeneity of Variances

Number of killing

Sig.	df2	df1	Levene Statistic
0.14	28	3	2

من الجدول (26) **Test of Homogeneity of Variances** نلاحظ أن 0.05< 0.14 وبالتالي الفرضية القائلة بتجانس أو تساوي تباين متوسطات عدد مرات قتل الجراثيم نتيجة استعمال الأدوية ،أي لا يمكن رفضها مما يدل على تحقق شرط التجانس التباينات وهو من أحد الشروط المهمة لإجراء تحليل التباين .

الجدول (27)

ANOVA

Number of killing

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
0.000	39	9	3	27	Between Groups
		0	28	6	Within Groups
			31	34	Total

من الجدول (27) :**ANOVA** نلاحظ أن قيمة F المصاحبة للاختبار تساوي :

F (3,28) = 39 مما يدل على أن الفروق كبيرة بين عدد مرات قتل الجراثيم بين الأدوية الأربعة

ولما كانت Sig 0.05>0.000 مما يؤدي رفض فرضية العدم بعدم وجود اختلاف بين عدد مرات قتل الجراثيم من جراء استخدام الأدوية الأربعة.

ولمعرفة الفروقات لابد من القيام باختبار الفروق بين متوسطات المجموعات المقارنة ومن بين هذه الطرق نجد طريقة Bonferroni .

الجدول (28)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

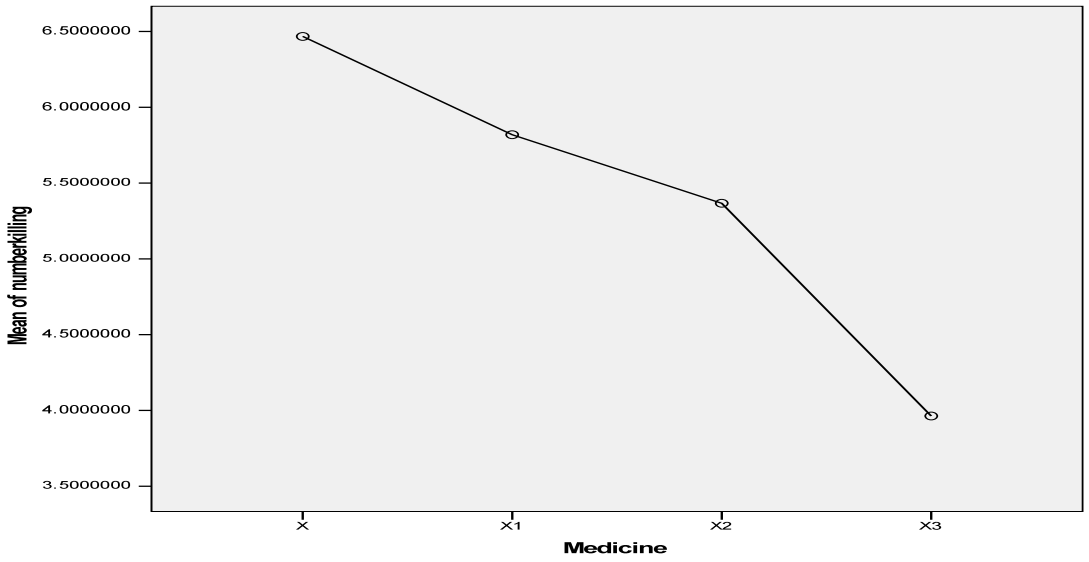
Dependent Variable: number of killing

Bonferroni

95% Confidence Interval		Sig.	Std. Error	Mean Difference (I-J)	(J) Medicine	(I) Medicine
Lower Bound	Upper Bound					
1.33	-0.04	0.07	0.24	0.65	X1	
1.78	0.42	0	0.24	1.1	X2	X
3.19	1.82	0	0.24	2.5	X3	
0.04	-1.33	0.07	0.24	-0.65	X	
1.14	-0.23	0.42	0.24	0.45	X2	X1
2.54	1.17	0	0.24	1.86	X3	
-0.42	-1.78	0	0.24	-1.1	X	
0.23	-1.14	0.42	0.24	-0.45	X1	X2
2.09	0.72	0	0.24	1.4	X3	
-1.82	-3.19	0	0.24	1.4	X	
-1.17	-2.54	0	0.24	1.4	X1	X3
-0.72	-2.09	0	0.24	1.4	X2	

*. The mean difference is significant at the .05 level.

الجدول(29)



نستنتج من الاختبار ترتيب عدد دورات قتل الجراثيم في الأدوية الأربعة على النحو التالي :

المرتبة من حيث التركيز	الدواء
الأولى	X
الثانية	X1
الثالثة	X2
الرابعة	X3

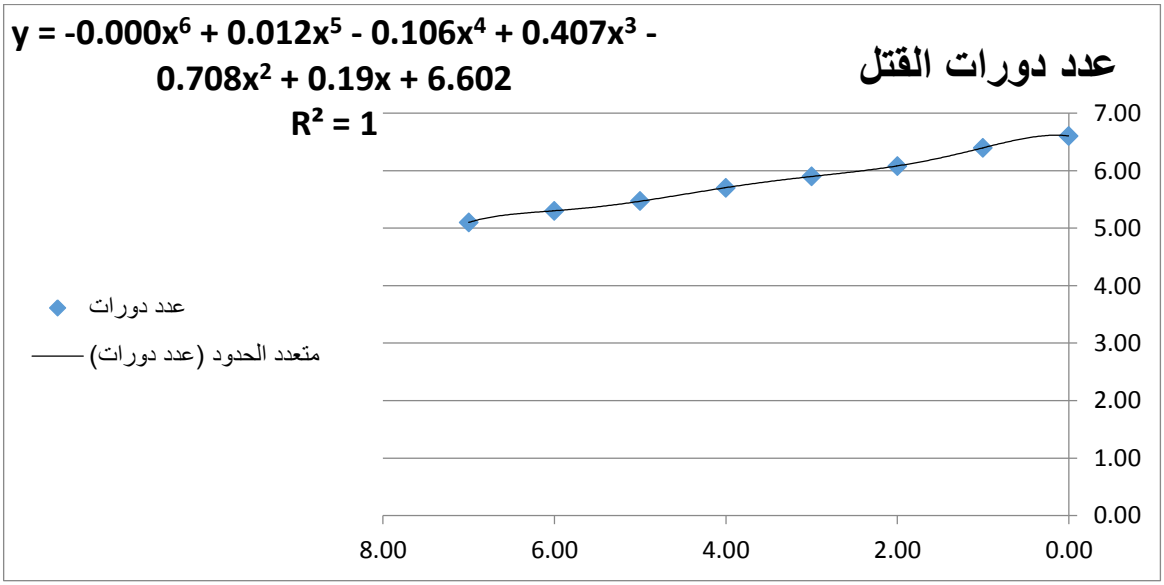
ولدى دراسة علاقة الرياضية بين عدد دورات قتل الجراثيم والزمن خلال مدة ثمانة أسابيع على أربعة أدوية نجد ما يلي :

الجدول (30)

عدد دورات القتل بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X1

الزمن	عدد الدورات
0.00	6.60
1.00	6.40
2.00	6.08
3.00	5.90
4.00	5.70
5.00	5.47
6.00	5.30
7.00	5.10

الجدول(31)

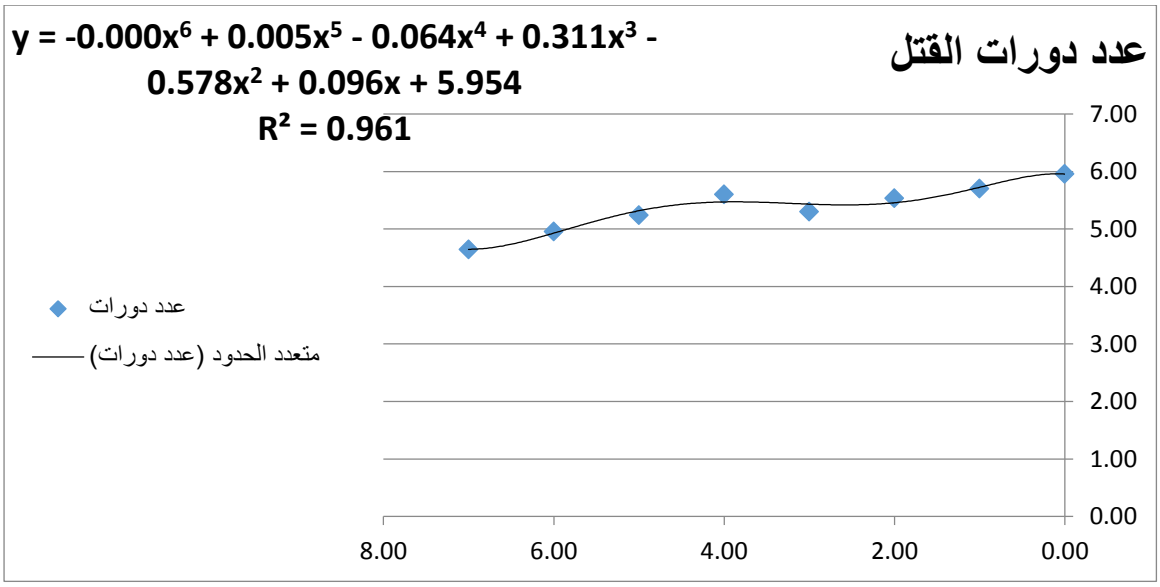


الجدول (32)

عدد دورات القتل بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X2

الزمن	عدد الدورات
0.00	5.96
1.00	5.70
2.00	5.54
3.00	5.30
4.00	5.60
5.00	5.24
6.00	4.95
7.00	4.64

الجدول (33)

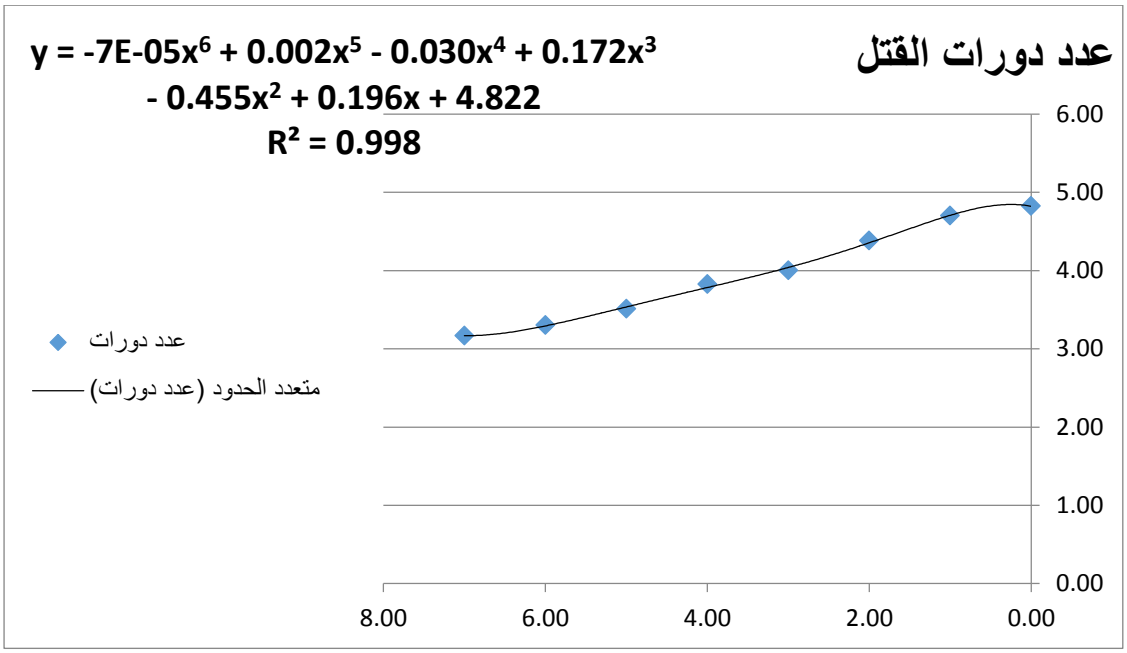


الجدول (34)

عدد دورات القتل بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X3

الزمن	عدد الدورات
0.00	4.82
1.00	4.70
2.00	4.38
3.00	4.00
4.00	3.82
5.00	3.51
6.00	3.30
7.00	3.17

الجدول (35)

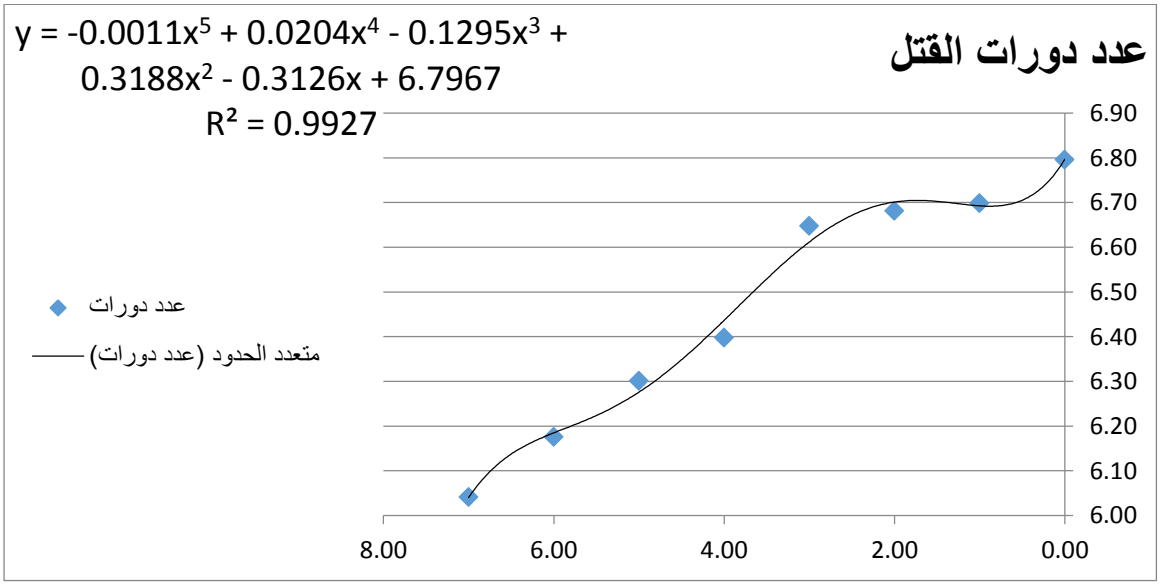


الجدول (36)

عدد دورات القتل بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للمستحضر X

الزمن	0	1	2	3	4	5	6	7
عدد الدورات	6.80	6.70	6.68	6.65	6.40	6.30	6.18	6.04

الجدول (37)



الجدول 38

يوضح عدد دورات القتل خلال الدراسة

الدواء	الأسبوع الأول	الأسبوع الثاني	الأسبوع الثالث	الأسبوع الرابع	الأسبوع الخامس	الأسبوع السادس	الأسبوع السابع	الأسبوع الثاممن
x1	6.60	6.40	6.08	5.90	5.70	5.47	5.30	5.10
x2	5.96	5.70	5.54	5.30	5.60	5.24	4.95	4.64
x3	4.82	4.70	4.38	4.00	3.82	3.51	3.30	3.17
x	6.80	6.70	6.68	6.65	6.40	6.30	6.18	6.04
متوسط	**6.05**	**5.87**	**5.67**	**5.46**	**5.38**	**5.13**	**4.93**	**4.74**

من الجدول (38) نجد أن عدد مستعمرات **x3** هي شاذة ويجب استبعادها من المعادلة العامة وهي تحرف متوسط التراكيز .

ونقوم بحساب المتوسط بعد استبعاد الدواء x3 فنجد :

الجدول 39

يوضح عدد دورات القتل خلال الدراسة

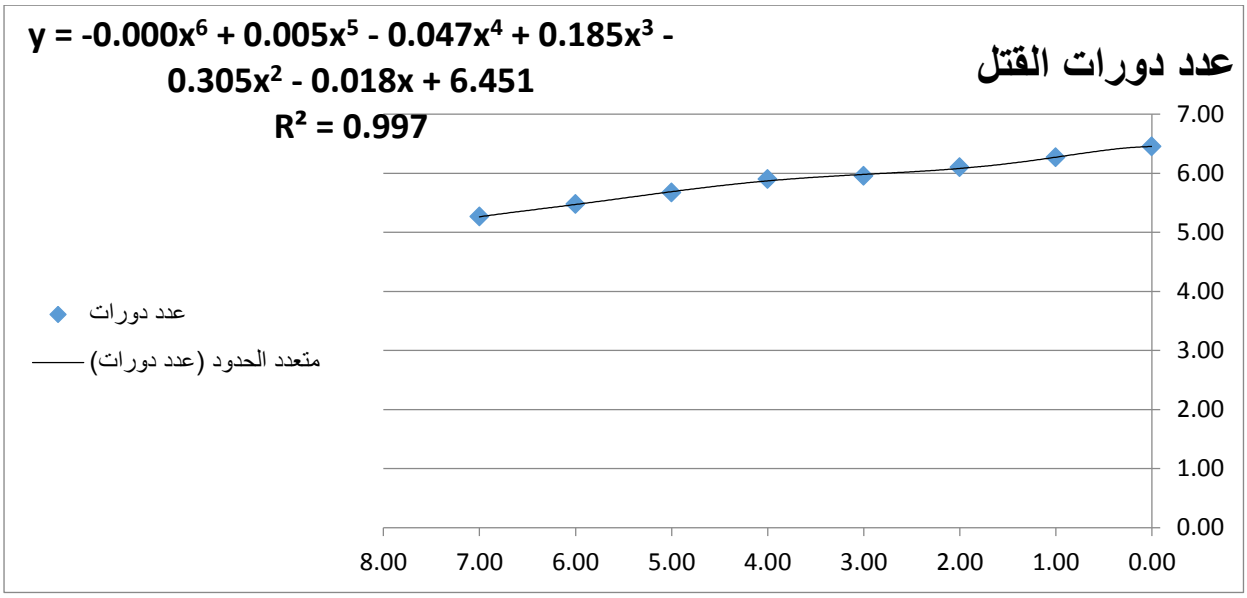
الدواء	الأسبوع الأول	الأسبوع الثاني	الأسبوع الثالث	الأسبوع الرابع	الأسبوع الخامس	الأسبوع السادس	الأسبوع السابع	الأسبوع الثاممن
x1	6.60	6.40	6.08	5.90	5.70	5.47	5.30	5.10
x2	5.96	5.70	5.54	5.30	5.60	5.24	4.95	4.64
x	6.80	6.70	6.68	6.65	6.40	6.30	6.18	6.04
متوسط	**6.45**	**6.27**	**6.10**	**5.95**	**5.90**	**5.67**	**5.48**	**5.26**

الجدول(40)

عدد دورات القتل بعد الفتح أثناء مدة الدراسة للعياري

الزمن	0	1	2	3	4	5	6	7
عدد الدورات	6.45	6.27	6.10	5.95	5.90	5.67	5.48	5.26

الجدول (41)



$$y = -0.000x^6 + 0.005x^5 - 0.047x^4 + 0.185x^3 - 0.305x^2 - 0.018x + 6.451$$

حيث y : عدد مرات القتل

X:الزمن مقدر بالأسبوع

يمكن استخدام هذه المعادلة لتنبؤ عدد مرات القتل لأي منتج في السوق يكون تركيزه بين [98.85 ، 101.10] خلال زمن الاستخدام المقدر بالأسبوع هذا بفرض تثبت الحرارة والضغط الجوي .

ثالثاً: دراسة العلاقة بين الدراسة الكيمائية والدراسة الميكروبيولوجية :

لما كانت معادلة التنبؤ بالتركيز الدواء خلال مدة الدراسة هي :

$$y = 0.001x^6 - 0.029x^5 + 0.206x^4 - 0.693x^3 + 1.107x^2 - 1.024x + 101.1$$

حيث y : تركيز المادة الفعالة

X:الزمن مقدر بالأسبوع

ولما كانت معادلة التنبؤ عدد مرات القتل خلال مدة الدراسة هي :

$$y = -0.000x^6 + 0.005x^5 - 0.047x^4 + 0.185x^3 - 0.305x^2 - 0.018x + 6.451$$

حيث y : عدد مرات القتل

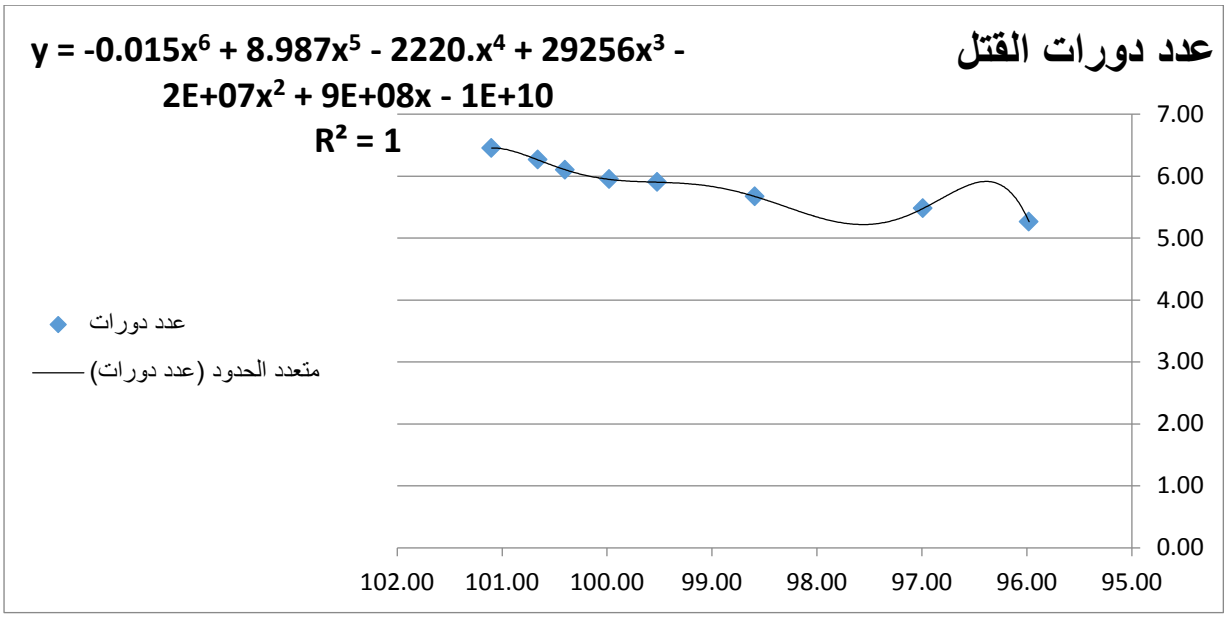
X:الزمن مقدر بالأسبوع

الجدول (41)

يوضح التركيز وعدد دورات القتل خلال فترة الدراسة

الزمن	0	1	2	3	4	5	6	7
التركيز	101.10	100.66	100.4	99.98	99.52	98.59	96.99	95.98
عدد دورات	6.45	6.27	6.10	5.95	5.90	5.67	5.48	5.26

الجدول (42)



من الجدول (42) نستنتج ما يلي :

إن العلاقة بين التركيز وعدد مرات قتل الجراثيم علاقة ارتباط تام من الدرجة السادس وهي :

$$y = -0.015x6 + 8.987x5 - 2220.x4 + 29256x3 - 2E+07x2 + 9E+08x - 1E+10$$

حيث **y : عدد مرات قتل الجراثيم**

X :تركيز الدواء

ويمكن استخدام هذه المعادلة لتنبؤ بعدد الجراثيم المقتولة وذلك من خلال التركيز المستخدم في الدواء وذلك مع أخذ بالاعتبار ثبات الضغط الجوي ودرجة الحرارة .

وإن المعادلة السابق أكثر دقة من المعادلة التنبؤ بدلالة الزمن ،حيث كان الخطأ فيها 0.003

ولتحليل درجة الارتباط ما بين عدد المستعمرات والتراكيز نجد ما يلي :

Correlations

numberkilling	concentration		
.893(**)	1	Pearson Correlation	Concentration
.000		Sig. (2-tailed)	
32	32	N	
1	.893(**)	Pearson Correlation	Numberkilling
	.000	Sig. (2-tailed)	
32	32	N	

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

إن معامل الارتباط بيرسون p = .893 مما يدل على الارتباط القوي ما بين التراكيز وعدد المستعمرات .

ونلاحظ أيضاً من جدول السابق أن لمعامل الارتباط دلالة إحصائية لأن

Sig: 0.000 < 0.05

المناقشة والاستنتاجات:

CONCLUSIONS AND DISCUSSION

عند اختيار عدد من الغسولات المحلية المصنعة من قبل عدة شركات دوائية محلية وغسول مستورد بالإضافة إلى العياري من مادة الكلورهيكسيدين وبعد ان اعتمدنا طريقة الـ HPLC المصرح بها دستوريا من قبل الدستور الأمريكي الإصدار 35 ودستور الادوية البريطاني إصدار العام 2013 قمنا بإجراء التحليل الدستوري وفق للشروط المذكورة:

1- العمود c18
2- الطور المتحرك
3- كاشف الU.V عند طول موجة 254 n.m

وبعد القيام بالإجراءات المختبرية التحليلية اللازمة توصلنا للنتائج المذكورة والتي زودتنا بالملاحظات التالية:

1- إن مستحضر X3 لم يحتو على القدر المصرح به دستوريا من مادة الكلورهيكسيدين. وهو 0.12%. فقد كانت نتيجة التحليل عند فتح العبوة تشير إلى ان المستحضر قد احتوى على تركيز قدره تقريبا 60% من الكمية المطلوبة دستوريا.
2- كان مستحضر X1 هو المستحضر الأعلى تركيزا بين المستحضرات المدروسة حيث كان التركيز الابتدائي له يساوي 102% من الكمية المطلوبة وهي ضمن الحدود المصرح بها دستوريا.
3- كان كل من مستحضري المستحضر المحلي الصنعX2 والمستحضر الأجنبي Xضمن الشروط الدستورية المطلوبة.
4- عند ملاحظة نسب الكلور هيكسيدين في المستحضرات المدروسة كان كل من مستحضري X1وX2محافظا على درجة من الثبات طيلة الأسابيع الستة الأولى ومن ثم حصل تخرب سريع للمستحضر وقد تعزى هذه النتيجة لعدم الاهتمام بالعبوات الكتيمة المانعة لوصول الضوء بينما كان المستحضر المستورد X معبأ بعوة كتيمة للضوء وهذا ما انعكس على سرعة تخربه إذ كان الأبطأ تخربا بين المستحضرات المدروسة، وكان مستحضرX3 ذو تركيز بدائي منخفض أساسا.

قد يعزى الأمر أيضا لوجود بعض السواغات المثبتة للمادة الدوائية والمبطئة من عملية تخربها بالضوء توافرت في المستحضر المستورد ولم تتوافر في المستحضرات الوطنية.

كما أن استخدام المواد الأولية قد يلعب دورا مهم، فاستخدام الماء منزوع الشوارد في تحضير المستحضر أو إضافة العوامل المخلبة كال EDTA يمكنه أن يوقف أو يبطأ على أقل تقدير من معدل التخرب الضوئي وهو الأمر الذي لم تصرح به الشركات المصنعة أثناء كتابة المكونات على العبوة.

5- بينما كان مستحضر X3هو المستحضر الاقل بين المستحضرات المدروسة.
6- مراقبة مادة الكلورهيكسيدين كيميائياً لم يكن كافياً ليعكس لنا فاعليته الحيوية لذلك تم الاعتماد على الطريقة الحيوية لتقييم قدرته القاتلة للجراثيم من لحظة الفتح وخلال مدة الدراسة.
7- تبين وجود علاقة جوهرية حقيقية ما بين المعايرة الميكروبيولوجية والاستشراب السائل رفيع الانجاز للكلورهيكسيدين وتم تحديد درجتها تبين أنها من الدرجة السادسة.

التوصيات والمقترحات:

SUGGESTIONS AND RECOMMENDATIONS

1- تطبيق طريقة معايرة مادة الكلورهيكسيدين بطريقة الكروموتوغرافية السائلة رفيعة الإنجاز حيث أعطت هذه الطريقة نتائج تتمتع بالدقة و الحساسية و النوعية لذا يمكننا اعتمادها و استخدامها لمعايرة الكلورهيكسيدين في الغسولات الفموية الحاوية عليه عندما نريد نتائج سريعة توفر الوقت و الجهد

2- الاعتماد على الطريقة الحيوية لمعايرة مادة الكلورهيكسيدين لتقييم قدرته القاتلة للجراثيم حيث لا تستطيع الطرق التحليلية الكيميائية اثبات ذلك.

3- متابعة تطوير طرق أفضل لمقايسة الكلورهيكسيدين بكافة أشكاله الصيدلانية حيث يعتبر من الأدوية الهامة المضادة للجراثيم و هو بطليعة المواد الفعالة المطهرة المطروحة في الأسواق العالمية خاصة المطهرات الفموية حيث يتمتع بفعالية قوية و طيف واسع و تأثيرات جانبية وسمية قليلة بالمقارنة مع مضادات الجراثيم و المطهرات الاخرى.

4- تعاني السوق المحلية من ضعف في كمية الغسولات الفموية بشكل عام والتي تضاعفت مع الظروف الحرجة التي يمر بها القطر، وعليه فإننا تقترح على المعامل القائمة تكثيف الجهود لتغطية العجز الحاصل في الأسواق وخصوصا مادة الكلورهيكسيدين الموضحة الأهمية سابقا.

5- يجب على الشركات الدوائية الراغبة في تقديم مستحضرات ذات جودة عالية أن تلتزم بالمعايير الدستورية للحفظ وأهمها حماية المستحضر من الضوء. باستخدام عبوات كتيمة مانعة للضوء أو إضافة علبة كرتونية تحمي المستحضر.

6- إن الفعالية الواضحة التي حصلنا عليها نتيجة إضافة الفلور تسلط الضوء على أهمية المشاركة الدوائية في الغسولات الفموية وبالتالي عدم تصنيع مستحضرات ذات تركيب مفرد.

7- عدم إهمال إضافة النشرات الداخلية لما لها من أهمية في توعية المستخدم حول طريقة الاستخدام المناسبة والأخطار التي قد تنتج عنها.

8- من الواضح تحليليا وحيويا أن الفعالية في تناقص مستمر بعد فتح العبوة وعليه على المصنع أن ينبه المستخدم لعدم استخدام المستحضر بعد شهرين من فتح العبوة.

9- نوصي إجراء دراسات ثبات أكثر شمولا للتنبؤ بسمية نواتج التخرب وتأثيرها على صحة الإنسان، فانتهاء فعالية المستحضر لا يقتصر ضررها على توقف الفعالية بل أيضا على

إمكانية تشكل مركبات قد تؤدي إلى تسمم المستخدم وإن كانت المادة الأولية ضعيفة أو قليلة السمية.

10- نوصي بدراسات لفترة زمنية أطول بعد تاريخ الفتح بسبب الانخفاض الذي يطرأ على نسبة مادة الكلورهيكسيدين بعد الفتح خاصة بعد تعرضه للضوء و الحرارة لتمكننا من تحديد المدة الزمنية التي تضمن صلاحية الغسول بعد الفتح.

11- دراسة باقي المواد الفعالة الأخرى التي تدخل في تركيب الغسولات الفموية و التي لم تدرس في هذا البحث بسبب عدم توفر المواد العيارية اللازمة في ظل الظروف الراهنة.

الملخص

تعد آفات التجويف الفموي من المشاكل الصحية شائعة الانتشار و على رأسها التهاب اللثة و تشكل اللويحة (طبقة من الجراثيم) على الأسنان و رائحة الفم (البخر) و إصابات الأغشية المخاطية بالفطور و التقرحات و القلاع .

لذا شاع استعمال المضامض الفموية او الغسولات الفموية كشكل صيدلاني موضعي في التجويف الفموي و تعددت المواد الفعالة في هذه المضامض حسب الغاية الطبية و كان أكثرها انتشاراً المطهرات و المعقمات الفموية و تعد مادة الكلورهيكسيدين في طليعة هذه المعقمات و قد احتلت المرتبة الأولى بين المطهرات الفموية عالمياً.

لتلك الأهمية تم العمل على بعض المضامض الفموية الموجودة في السوق الدوائية المحلية لدراسة مدى مطابقة المادة الفعالة مع الشروط الدستورية من ناحية التركيز و الفعالية و الثبات بعد الفتح.

و بناءً على ذلك قمنا بمقايسة الكلورهيكسيدين في عدة غسولات فموية محلية بالطرق التحليلية (الكروماتوغرافيا) و عايرناها و حددنا نسبة المادة الفعالة باللحظة صفر من فتح العبوات و

وخلال فواصل زمنية متساوية للخروج بمقترح أو توصية للاستعمال بعد فترة زمنية معينة من فتح العبوات تضمن بقاء المادة الفعالة بالتركيز الفعال المصرح به دستورياً.

كما تم دراسة المادة الفعالة(جرثومياً- حيوياً) لتقييم فعالية المادة .

ثم جرى تطبيق المقايسة بالكروماوتوغرافيا السائلة رفيعة الإنجاز و تم التحقق من مصدوقية الطريقة حيث كانت جميع المتثابتات ضمن المجال المقبول (زمن الاحتباس – التكرارية- الدقة- النوعية-...).

فالطريقة الكيميائية :

طريقة "HPLC" مكنتنا من مقايسة الكلورهيكسيدين في مستحضراته ، حيث أعطت فكرة دقيقة و سريعة عن نسبة الكلورهيكسيدين بوقت قصير.

أما الطريقة الحيوية:

- هي طريقة صديقة للبيئة لا تتطلب محلات أومعدات خاصة ولا تعطي نواتج سامة .

- هي طريقة اقتصادية سهلة التطبيق لا تحتاج إلى مدة زمنية طويلة نسبياً و كلفة أقل.

المعايرة الحيوية قادرة على تقييم القدرة القاتلة للجراثيم وتقييم حقيقي أكثر لفعالية المطهرات،

و تبين نقصان فعالية المادة نتيجة تخربها بالضوء لعدم التزام المعامل المصنعة بشروط التغليف و الحفظ الدستورية.

تمت الدراسة الإحصائية على الطريقتين

نتيجة الدراسة الإحصائية على القسم التحليلي الكيميائي أوصلتنا إلى معادلة تمكننا من التنبؤ عن تركيز الكلورهيكسيدين لأي منتج في السوق خلال زمن الاستخدام.

أيضاً نتيجة الدراسة على القسم الحيوي أوصلتنا إلى معادلة تمكننا من التنبؤ لعدد مرات القتل للمطهر الدروس خلال زمن الاستخدام .

وتم الوصول إلى العلاقة ما بين عدد دورات القتل وبين التركيز وكانت علاقة ارتباط تام من الدرجة السادسة.

إذاً تم الوصول إلى العلاقة مابين المعايرة الميكروبيولوجية والمعايرة بالاستشراب السائل رفيع الإنجاز لمحتوى الكلورهيكسيدين في الغراغر الفموية.

كما وجدنا أن الطريقة الكيميائية لا تستطيع اثبات قدرة و فعالية الكلورهيكسيدين في قتل البكتيريا بينما الطريقة الحيوية تستطيع اظهار فعالية و قدرة الكلورهيكسيدين في قتل البكتيريا .

كما وجدنا تناقص في المادة الفعالية نتيجةً لتخربها بالضوء بسبب عدم التزام المصانع المنتجة بشروط التخزين و الحفظ الدستورية.

ABSTRACT

Oral lesions are considered one of the most common mouth health problems .

On its head are gingivitis and formation of plaque on teeth (layer of bacteria) , bad breath and infections of mucosal mouth layers by fungus, ulcers and aphtous.

Therefore using of oral rinses and gargles as a local pharmaceutical form in oral cavity became common, and there are many APIs according to their effect and most of them were antiseptics and detergents , also Chlorhexidine is considered at the forefront of those antiseptics and internationally ranked first.

For this importance, work has been done by using some oral gargles that are spreded in local pharmaceutical markets to study the extent of matching of API with constitutional conditions in terms of concentration , effectiveness , stability , and purity after opening the container.

So the chlorhexidine assay has been done in many local oral gargles using analytical methods (chromatography) and validated , then determined the percentage of API at minute 0 since the openning of the container and during equal intervals , to get a conclusions or a recommendations for the usage after specific period of time of the container opening that guarantee the exsitance of API at the active concentration without any degredation of it , that is constitutionally authorized.

also the API was studied (bacterial – vital) to evaluate the vital effectiveness .

The assay method been applied using HPLC , also verified the method of validation where all of parameters were in the acceptance range (period of retention - repetition – accuracy – quality - …).

The Chemical method:

Is the method that enables us to assay Chlorhexidine in it's products routinely "HPLC" as it gives us an accurate and quick idea about the ratio of Chlorhexidine shortly.

The Microbiological method:

This method is environmentally friendly , it does not require special equipments and solvents , and doesn't give toxic products , frugal , easy to apply , does not need a relatively long period of time , with less cost.

Also the microbiological method is able to determine the ability of CHX in killing germs , and gives a more specific evaluation of the effectiveness of disinfectants , and it explains the decrease in the effectiveness of the API as a result of their degredation by light due to the lack of laboratories manufacturer's commitment to packaging and storing of constitutional terms.

The statistical study has been done on the two methods (Chemical – microbiological) :

As a result of the statistical study on the chemical analytical section brought us to the equation that enables us to predict the concentration of chlorhexidine in any product in the market during the time of use.

Also the result of the statistical study on the microbiological section brought us to the equation that enables us to predict the number of killing courses of the studied disinfectant during the time of use .

We've reached to the relationship between the number of killing courses and the concentration , it was complete correlation from class VI relationship.

And we found that the chemical method can't prove the ability and effectiveness of chlorhexidine in killing bacteria , while the vital method gives effectiveness and ability of chlorhexidine in killing bacteria.

As well we found a decreasing in the API as a result of it's degredation by light because of the lack of obligation by the producing factories in condition of packaging and constitutional storage.

قائمة الجداول LIST OE TABLES	رقم الصفحة
الجدول رقم (1) يوضح بعض المركبات المسوقة محلياً	22
الجدول رقم (2) أجناس الجراثيم والفطور المكونة للفلورا الفموية	25
الجدول رقم (3) أنواع منتقاة من المجتمع الجرثومي المكون للويحة الجرثومية فوق وتحت اللثة	26
الجدول (4) يوضح العوامل التي تبطل مفعول المطهرات	67
الجدول (5) يوضح خصائص الأداء التحليلي وفق 35USP	78
الجدول (6) يوضح أهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي	81
الجدول (7)يوضح أهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي	82
الجدول (8) يوضح القيم الاستعادة الخاصة بدراسة المضبوطية	82
الجدول (9) يوضح أهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي	83
الجدول (10) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة الدقة التكرارية	84
الجدول (11) يوضح أهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي	85
الجدول (12) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة الدقة الوسطى	85
الجدول (13) يوضح أهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي	86
الجدول (14) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة النوعية	86
الجدول (15) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة الخطية	87
الجدول (16) يوضح أهم المعايير الدستورية للمخطط الكروماتوغرافي	88
الجدول (17) يوضح قيم الاستعادة الخاصة بدراسة المتانة	89
الجدول (18) يوضح انخفاض نسبة المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة ل X1	90
الجدول (19) يوضح انخفاض نسبة المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة ل X2	91
الجدول (20) يوضح انخفاض نسبة المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة ل X3	92
الجدول (21) يوضح انخفاض نسبة المادة الفعالة بعد الفتح أثناء مدة الدراسة ل X	94

الجدول (22) يوضح قياس فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X1 خلال مدة الدراسة	101
الجدول (23) يوضح قياس فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X2خلال مدة الدراسة	102
الجدول (24) يوضح قياس فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر X3 خلال مدة الدراسة	103
الجدول (25) يوضح قياس فعالية الكلورهيكسيدين في المستحضر Xخلال مدة الدراسة	104
الجدول (26) يوضح قياس فعالية الكلورهيكسيدين في المعياري خلال مدة الدراسة	105
الجدول (27) يوضح عدد دورات القتل الخاصة بكل مستحضر	107

رقم الصفحة	قائمة الأشكال **LIST OF FIGURES**
33	الشكل (1) الصيغة الكيميائية
33	الشكل (2) الصيغة المنشورة
34	الشكل (3) مخطط امتصاصية الكلورهيكسدين باستخدام جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية
35	الشكل (4)مخطط الأشعة تحت الحمراء لمادة الكلورهيكسيدين
37	الشكل (5)الشوائب الدستورية
37	الشكل (6) الشوائب الدستورية
38	الشكل (7) الشوائب الدستورية
38	الشكل (8) الشوائب الدستورية
41	الشكل (9) آلية تأثير الكلورهيكسيدين على البكتيريا
50	الشكل (10) نظام ال HPLC النمطي
64	الشكل(11) يوضح تحضير السلسلة العيارية الجرثومية
66	الشكل (12) يوضح المستعمرات الجرثومية المزروعة في المعلق الجرثومي الأساسي
67	الشكل (13) يوضح المستعمرات الجرثومية بعد تطبيق مستحضر X1
67	الشكل (14) يوضح المستعمرات الجرثومية بعد تطبيق مستحضر X2
68	الشكل (15) يوضح المستعمرات الجرثومية بعد تطبيق المعياري
87	الشكل (16) يوضح الخط البياني للسلسلة العيارية و معادلة الارتداد الخطي
91	الشكل (17) يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في المستحضر X1 خلال مدة الدراسة
92	الشكل (18) يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في المستحضر X2 خلال مدة الدراسة
93	الشكل (19) يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في المستحضر X3 خلال مدة الدراسة
94	الشكل (20) يوضح انخفاض تركيز الكلورهيكسيدين في المستحضرXخلال مدة الدراسة
95	الشكل (21) يوضح ثلاث حقنات من العياري

الشكل (22) يوضح المخطط الكروماتوغرافي لمادة العياري عند الحقن بتراكيز متدرجة	96
الشكل (23) يوضح تراكيز متدرجة للسلسلة العيارية	96
الشكل (24) يوضح المخطط الكروماتوغرافي لعياري الكلورهيكسيدين بالإضافة الى المخطط الكروماتوغرافي للشائبة 4-كلور انيلين	97
الشكل (25) يوضح المخطط الكروماتوغرافي لثلاث مستحضرات يقارن موقع المادة الفعالة و سواغاتها	98
الشكل (26) يوضح المخطط الكروماتوغرافي للمستحضر X1	98
الشكل (27) يوضح المخطط الكروماتوغرافي لثلاث حقنات متتالية للمستحضر X2	99
الشكل (28) يوضح المخطط الكروماتوغرافي للمستحضر X3	100
الشكل (29) يوضح المخطط الكروماتوغرافي للمستحض ر المستورد X	100
الشكل (30) يوضح عدد دورات القتل الخاصة لكل مستحضر	107

قائمة الاختصارات

LIST OF ABBREVIATION

FDA: Food and Drug Administration.

WHO:Wolrd Health Organization.

USP: United States Pharmacopia.

BP: British Pharmacopia.

HPLC: High Performance Liquid Chromotograph.

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromotograph.

TLC: Thin-Layer Chromotograph.

HPTLC: High Performance Thin Layer Chromotography.

RSD: Relative Standard Deviation.

CHX: Chlorhexidine .

SDR:Syrian drug reference.

CHA: Chlorhexidine acetate.

CHG:Chlorhexidine gluconate.

nm:Nanometer .

UV:Ultra violet.

EURP: European pharmacpia.

$\mathbf{R^2}$:Regression coefficient.

قائمة المصطلحات الأجنبية المستخدمة

Food and Drug Administration : منظمة الغذاء و الدواء

Wolrd Health Organization : منظمة الصحة العالمية

United States Pharmacopia: دستور الادوية الاميريكي

British Pharmacopia: دستور الادوية البريطاني

High Performance Liquid Chromotograph : الكروموتوغرافيا السائلة رفيعة الانجاز

Ultra Performance Liquid Chromotograp : الكروموتوغرافيا السائلة فائقة الانجاز

Thin-Layer Chromotograph : كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة

High Performance Thin Layer

Chromotography: الكروموتوغرافيا الرقيقة رفيعة الانجاز

ASSAY:مقايسه

Accuracy:المضبوطيه

Adsorption:الامتزاز

Average:الوسط الحسابي

Buffer:دارئه

Correlation factor:معامل الارتباط

Degreadtion compounds:نواتج التدرك

Detection limit:حد الكشف

Ion exchange:التبادل الأيوني

Intermediate precision:الدقه الوسطى

Linearity:الخطيه

Mobile phase:الطور المتحرك

Precision: الدقه:

Polarity:القطبيه

Quantification limit:حد الكم

Range:مجال

Repeatability:التكراريه

Robustness:المتانه

Specificity:النوعيه

Stationary phase:الطور الثابت

System suitability : ملاءمة النظام

Tailing factor:معامل الذييل

Theoretical plates:الصفائح النظريه

Validation:المصدوقيه

Absorption:الامتصاص

Solubility:الانحلالية

Appearance:المظهر

Characterization:الوصف

Stability:الثباتية

Sterilization:التعقيم

Gengivitis : التهاب اللثة

Thrust:السلاق

Aphtous:القلاع

Plaque:اللويحة الجرثومية

Mouth Ulcer:تقرحات فموية

المراجع

REFERANCES

1- Singh A, Purohit B (April 2011). "Tooth brushing, oil pulling and tissue regeneration: A review of holistic approaches to oral health". J Ayurveda Integr Med 2 (2): 64–8. doi:10.4103/0975-9476.82525. PMC 3131773. PMID 21760690

2- Matthews, R W (12 July 2003). "Hot salt water mouth baths". British Dental Journal 195 (1): 3–3. doi:10.1038/sj.bdj.4810318.

3- Tal, H; Rosenberg, M (1990). "Estimation of dental plaque levels and gingival inflammation using a simple oral rinse technique". Journal of periodontology 61 (6): 339–42. doi:10.1902/jop.1990.61.6.339. PMID 2366142.

4- Shifman, A; Orenbuch, S; Rosenberg, M (2002). "Bad breath—a major disability according to the Talmud". The Israel Medical Association journal 4 (10): 843–5. PMID 12389360.

5- Gunsolley, JC (2006). "A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents". Journal of the American Dental Association 137 (12): 1649–57. doi:10.14219/jada.archive.2006.0110. PMID 17138709.

6- Tal, H; Rosenberg, M (1990). "Estimation of dental plaque levels and gingival inflammation using a simple oral rinse technique". Journal of periodontology 61 (6): 339–42.

7- Keoke, Emory Dean; Porterfield, Kay Marie (2002). Encyclopedia of American Indian contributions to the world 15,000 years of inventions and innovations. New York, NY: Facts on File. p. 180. ISBN 9781438109909.

8- Fischman, Stuart L. (1997). "The history of oral hygiene products: How far have we come in 6000 years?". Periodontology 2000 15: 7–14. doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00099.x. PMID 9643227.

9- Lax, Alistair (27 October 2005). Toxin: The cunning of bacterial poisons. Oxford University Press. ISBN 9780191578502. Retrieved 26 November 2013.

1o- Budtz-Jörgensen, E; Löe, H (1972). "Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis". Scandinavian journal of dental research 80 (6): 457–64. doi:10.1111/j.1600-0722.1972.tb00314.x. PMID 4575037.

11- Loesche, Walter J.; Kazor, Christopher (2002). "Microbiology and treatment of halitosis". Periodontology 2000 28: 256–79. doi:10.1034/j.1600-0757.2002.280111.x. PMID 12013345.

12- "Hacking the Microbiome for Fun and Profit: Can Killing Just One Mouth Bacterium Stop Cavities? | 80beats | Discover Magazine". Blogs.discovermagazine.com. Retrieved 31 October 2012.

13- Gunsolley, JC (2006). "A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents". Journal of the American Dental Association 137 (12): 1649–57. doi:10.14219/jada.archive.2006.0110. PMID 17138709.

14- Weaver, Clair (11 January 2009). "Mouthwash linked to cancer". Daily Telegraph (News Ltd). Archived from the original. You must specify the date the archive was made using the |archivedate= parameter. http://www.news.com.au/dailytelegraph/story/0,22049,24896583-5001021,00.html. Retrieved on 11 January 2009.

15- Farah, C; McIntosh, L; McCullough, M (2009). "Mouthwashes". Australian Prescriber, 32:162-4. Available at http://www.australianprescriber.com/magazine/32/6/162/4/

16- Rosenberg M. The science of bad breath. Sci Am. 2002 Apr;286(4):72-9. PMID 11905111

17- Canada JR, editor. USP dictionary of USAN and international drug names 1998. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, Inc; 1997. p. 154.

18- Journal of the American Dental Association November 1, 2004 135: 1559-1564.

19-"Mouthwashes, gargles, and dentifrices". British National Formulary March 2014. BMJ Group and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain 2014

20- United states pharmacopeia .USP 35-NF30 43-

21- BELOW, H.; LEHAN, N.; KRAMER, A. HPLC determination

of the antiseptic agent chlorhexidine and its degradation

products 4-chloroaniline and 1-chloro-4-nitrobenzene in serum and urine. Microchim. Acta, v.146, p.129-135, 2004

22- GAVLICK, W.K. High-performance liquid chromatographic

analysis of chlorhexidine and p-chloroaniline using a specialty column and a photodiode-array detector. J.Chromatogr.,v.623, p.375-380, 1992.

23-2008-2007جامعة دمشق .المراقبة الدائية.أ.د.محمد عامر ماردیني

24- Ich.validation of analytical procedures :text and methodology .Q2(R1), 2005.

25- Ravichandran V , shalini Ssundram KMand harish rajak .validation of analytical method – strategies & importance .int J pharmacy and pharm sci: 2010 ;2(3) :18-22.

26- Chan cc . analytical method validation: principles and practices pharamaceutical manufacturing handbook :regulations and quality , edited by gad S.C. john wiley &sons ,inc 2008 :727-742

27- ICH Q2 B , Note for guidance on Validation of analytic procedure :methodology , (1996)

28- Ewing , G.W. , Mc Graw Hill international Book col , instrumental Methods of chemical analysis , London , 4th edition , 1-7 , (1981).

29- المرجع الدوائي السوريSDR الاصدار السابع –الصادر عن المركز العلمي الاستشاري بالتعاون مع نقابة صيادلة سوريا و المجلس العلمي للصناعات الدوائية ووزارة الصحة بالجمهورية العربية السورية.

30- Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology , edited by Stephen p denyer , Norman A Hodges , Sean P Gorman . seventh edition .

31- GAVLICK, W.K. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine and p-chloroaniline using a specialty column and a photodiode-array detector. J. Chromatogr., v.623, p.375-380, 1992.

32- HÁ, Y.; CHEUNG, A.P. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. J. Pharm. Biomed. Anal., v.14, p.1327-1334, 1996.

33- MARTINDALE: the complete drug reference. 36ed. Pharmaceutical Press, 2009. p.1635-1638.

34- MENDEZ, A.S.L.; WEISHEIMER, V.; OPPE, T.P.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage.

35- MIRIBEL, L.; BRAZIER, J.L.; COMET, F.; LECOMPTE, D. Gas-liquid chromatographic determination of chlorhexidine in pharmaceutical formulations. J. Chromatogr., v.268, p.321-328, 1983.

33- HAVLÍKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; HAJKOVÁ, R.; SOLICH, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. J. Pharm. Biomed. Anal., v.43, p.1169-1173, 2007.

34 HEWITT, W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach. Boca Raton: Interpharm/CRC Press, 2003. p.97-115.

35- SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay of gatifloxacin in pharmaceutical formulations. J. Pharm. Biomed. Anal., v.40, p.443-446, 2006.

36- LOPES, C.C.G.O.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. Talanta, v.82, p.918-922, 2010.

37- SOLANO, A.G.R.; PREIRA, L.M.C.S.; LEONEL, M.F.V.; NUNAN, E.A. Development of agar diffusion method for dosage of gramididin. Braz. J. Pharm. Sci., v. 47, p. 555-572, 2011

39- JENSEN, J.E.; CHRISTENSEN, F. A study of the elimination of chlorhexidine from the oral cavity using a new spectrophotometric method. J. Periodont. Res., v.6, p.306-

311, 1971.

40- MIRIBEL, L.; BRAZIER, J.L.; COMET, F.; LECOMPTE, D.

Gas-liquid chromatographic determination of chlorhexidine

in pharmaceutical formulations. J. Chromatogr., v.268,

p.321-328, 1983.

41- HAVLÍKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.;

HAJKOVÁ, R.; SOLICH, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical

ointment. J. Pharm. Biomed. Anal.,v.43, p.1169-1173,

2007.

42- GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for

determination of lomefloxacin in coated tablets. J. AOAC Int.

, v.89, p.1077-1079, 2006.

45 - ABAD-VILLAR, E.M.; ETTER, S.F.; THIEL, M.A.; HAUSER,

P.C. Determiantion of chlorhexidine digluconate and

polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary

electrophoresis with contactless conductivity detection. Anal. Chem. Acta.,v.561, p.133-137, 2006.

46- Kozlovsky, A; Goldberg, S; Natour, I; Rogatky-Gat, A; Gelernter, I; Rosenberg, M (1996). "Efficacy of a 2-phase oil: Water mouthrinse in controlling oral malodor, gingivitis, and plaque". Journal of periodontology 67 (6): 577–82. doi:10.1902/jop.1996.67.6.577. PMID 8794967.

47- Pader, M. (October 1994). "Oral rinses". Cosmetics & Toiletries 109 (10): 59–68. ISSN 0361-4387.

48- ole, P; Rodu, B; Mathisen, A (2003). "Alcohol-containing mouthwash and oropharyngeal cancer: A review of the epidemiology". Journal of the American Dental Association 134 (8): 1079–87. doi:10.14219/jada.archive.2003.0322. PMID 12956348.

49- Carretero Peláez, MA; Esparza Gómez, GC; Figuero Ruiz, E; Cerero Lapiedra, R (2004). "Alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. Critical analysis of literature". Medicina oral 9 (2): 120–3, 116–20. PMID 14990877.

50- Lachenmeier, Dirk W (2008). "Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity". Journal of Occupational Medicine and Toxicology 3: 26. doi:10.1186/1745-6673-3-26. PMC 2596158. PMID 19014531.

51- Mashberg, A; Barsa, P; Grossman, ML (1985). "A study of the relationship between mouthwash use and oral and pharyngeal cancer". Journal of the American Dental Association 110 (5): 731–4. PMID 3859544.

52- Elmore, J; Horwitz, R (1995). "Oral cancer and mouthwash use: Evaluation of the epidemiologic evidence". Otolaryngology - Head and Neck Surgery 113 (3): 253–61. doi:10.1016/S0194-5998(95)70114-1. PMID 7675486.

53- Cole, P; Rodu, B; Mathisen, A (2003). "Alcohol-containing mouthwash and oropharyngeal cancer: A review of the epidemiology".

54- Gandini S, Negri E, Boffetta P, La Vecchia C, Boyle P (2012). "Mouthwash and oral cancer risk quantitative meta-analysis of epidemiologic studies". Ann Agric Environ Med. 19 (2): 173–80. PMID 22742785.

55- Cawson RA, Odell EW, Porter S. (2002). Cawson's essentials of oral pathology and oral medicine. (7th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone. ISBN 0443071063.

56- Molina ,M.E etal., contaminated anterior cruciate ligament :the efficacy of sterilization agent ."Arthroscopy , V.16:4 , 373-378 (2000).

57- Food and drug administration.international conference on harmonization.guideline on the validation of analytical procedures.methology,availabitiy.us:food and drug administration;1997.

58- Veronika R.Admovics .Chromatographic analysis of pharma ceuticals , second edition , p:135-184 , Marcel Dekker , INC , New York , 1997.

59- United states Pharmacopoeia (USP30-2007)

60- Food and drug Administration . International conference on Hermonization . Guideline on the validation of analytical procedures . Methodology , availability . US : Food and Drug Administeration ; 1997.

61- ICH Q2 (R1) validation of analytical procedures :text and methodology , 1995.

62- ICH International conference on harmonization , validation of analytic procedures November 1996.