مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم الطبية – المجلد /16/ العدد /2/ 1414 هـ– 1994– م

وضع خطة لمعايرة الأفة لولول المصل الدموي البشري موضع التطبيق

د. سليمان عفارة*.

□ ملخص □

لقد قمت بوضع خطة لمعايرة الـ *atenolol* في المصل الدموي والغاية من ذلك تطبيق هذه الخطة في دراسة الحركية الدوائية لهذا المركب عند الانسان وخاصة عند المرضى الذين يعانون من قصور كلوي.

لقد اعتمدت في هذه المعايرة طريقة التفريق اللوني، السائل ذي الكفاءة العالية *(HPLC) HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.* يمكن تقسيم وضع خطة المعايرة إلى مرحلتين :

*المرحلة الأولى: إجراء التجارب على محاليل نقية للمادة المعايرة والشاهد الداخلي. وتم خلالها تعيين الطور المتحرك والطور الثابت وتبيان مدى تكرار التجارب.

*المرحلة الثانية: تحميل المصورة الدموية بالمادة المراد معايرتها وبالشاهد الداخلي ثم مزجها جيدا يلي ذلك استخلاص المادة المعايرة والشاهد الداخلي بمحل عضوي مناسب ثم نبخر المحل العضوي ونحل البقية الجافة في الطور المتحرك ويحقن حجم ثابت في عمود التفريق اللوني.

لقد كانت نسبة الاستخلاص لكلا المركبين بحدود *80.*٪ والنسبة المئوية لعامل الاختلاف بين تجربة وأخرى *CV%* بحدود *10.*٪. ولزيادة حساسية الطريقة أنقصنا حجم الطور المتحرك المستخدم لحل البقية الجافة إلى *150* ميكرولتر فتوصلنا إلى امكانية الكشف عن 5نانوغرام/مل بلازما. ولقد كررنا هذه الدراسة عدة مرات فحصلنا على نسبة سطح/*ATENOLOL* سطح الشاهد الداخلي. وكان عامل الارتباط في معظم الآحيان قريبا من الواحد، وبهذا الشكل أصبح بين أيدينا خطة معايرة جاهزة لتطبيقها على الإنسان المريض لدراسة حركية الـ *ATENOLOL* في العضوية.

* الدكتور سليمان عفارة الأستاذ المساعد في قسم الأدوية بكلية الطب في جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مدخل

منذ نهاية السبعينات احتلت دراسات الحركة الدوائية PHARMACOCINTIQUE مكانا في أبحاث علم الأدوية حيث إن كثيرا من الأدوية تتميز بدليل علاجي ضيق وقد ينجم عن هذا الهامش العلاجي المتدني بعض علامات التسمم بالمركب المستعمل .يعود ذلك إلى اطراح المركب نتيجة إصابة كبدية أو كلوية أو نتيجة التغيرات الكبيرة في امتصاص واطراح الدواء بين شخص وآخر.

هذا ويعود الفضل في إجراء دراسات الحركية الدوائية إلى التطور الكبير في الكيمياء التحليلية السريرية وإلى ماقدمته من طرق متطورة خدمت هذا العلم.

وقد اخترنا أحد حاصرات بيتا هو ATENOLOL الذي مضى على استعماله في ميدان المعالجة فترة طويلة. ومعروف أن هذا الدواء يطرح عن طريق الكلية دون أي تبديل، وغايتنا من ذلك إجراء دراسة الحركية الدوائية عند مرضى مصابين بدرجات مختلفة من القصور الكلوي وذلك بالتعاون مع قسم أمراض الكلية بالمشفى الجامعي.

*الغاية من البحث:

وضع خطة معايرة لمركب ATENOLOL في المصل الدموي عند الانسان. خطة المعايرة هذه يجب أن تكون ذات حساسية ودقة عالية ويمكن تطبيقها في مجال واسع وقابلة للتكرار دون حدوث أي خطأ.

*وضع خطة المعايرة:

1- المواد والأجهزة :

-لقد تم استخدام جهاز تفريق لوني ذي كفاءة عالية HPLC HIGH PERFORMANCEC LIQUID CHORMATOGRAPHY من ماركة KONTRON 450-MT2 مرتبط بمرجع يحتوي برنامجاً خاصاً بهذا النوع من التحليل وبقرص صلب لتخزين المعلومات. كما يرتبط بمقياس تآلف KONTRON S F 25 ---- الذي استخدم كمشعر لقياس كمية المادة المعايرة الخارجة من عمود التفريق اللوني حيث كان طول موجة التحريض 280 نانومتر وطول موجة الإصدار 305 نانومتر.

-استخدمنا نوعين من أعمدة التفريق اللوني NUCLEOSLILC8(5Nm)(250-4.6mm) وعمود NUCLEOSLILC18(10Nm)(250-4.6).

-قدمت لنا المادة قيد الدراسة (ATENOLOL) على درجة عالية من النقاوة من الشركة المصنعة.I.C.I pharma كما قدمت مادة NODOLOL المستخدمة كشاهد داخلي بشكل نقي جدا أيضاً من شركة.SQUIBB

-لقد استخدمنا محلات كيميائية نقية خاصة بطريقة HPLC من ماركة

FARMITALIA---CARLO-ERBAأو من ماركة MERCK,DARMSTADT.

-الماء المستخدم في تحضير المحاليل والتمديدات هو ماء ثنائي التقطير محفوظ في أوعية زجاجية PYREX.

-مصل دموي لأشخاص أصحاء غير معالجين مقدم من مركز نقل الدم ومحفوظ في الدرجة 4م.

***خطة العمل:**

1- وضع خطة المعايرة باستخدام محاليل مجهزة مخبريا دون اللجوء إلى المصل الدموي.لقد أبقينا على ثابتين طوال فترة العمل وهما حجم المحلول المحقون في عمود التفريق اللوني فكان 400 ميكروليتر ومعدل تدفق الطور المتحرك في عمود التفريق اللوني 1مل/دقيقة.وحضرنا في بداية العمل محلول من ATENOLOL ومحلول من NADOLOLفي الكحول الميتيلي بتركيز 10ملغ/100مل وتم حفظها في الدرجة +4.

أثناء العمل أجرينا التمديدات المناسبة.

لقد بدأنا العمل باستخدام عمودC8,5MIC SPHERISORB .

وبطور متحرك على النحو التالي:

-كحول متيلي50%

-ماء ثنائي التقطير49%

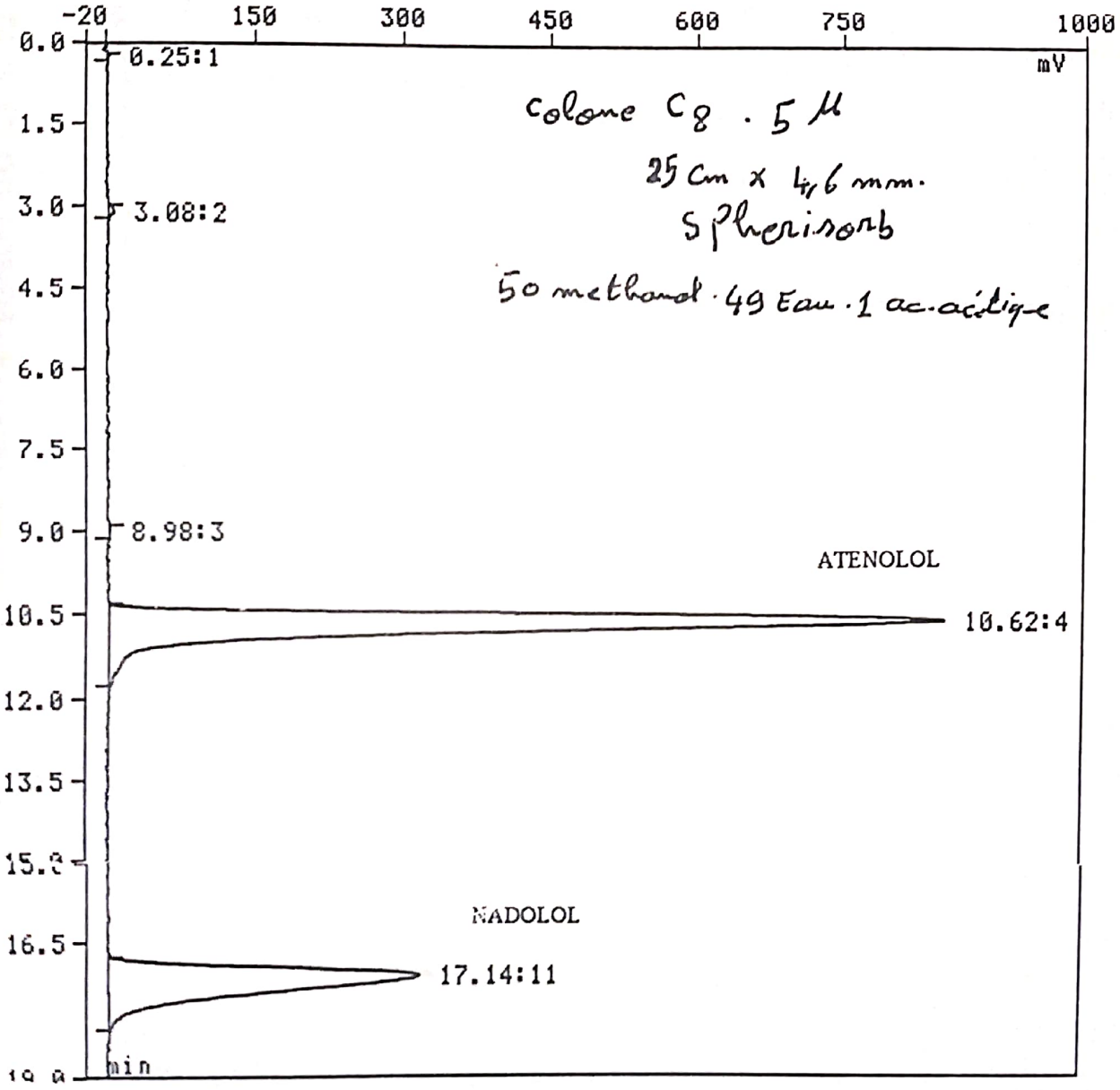
-حمض الخل الثلجي1%

-وحقنا في كل تجربة 400ميكروليتر من محلول ATENOLOL أو من محلول NADOLOLالمعتبر في هذا العمل كشاهد داخلي.

إن تركيز كل من المحلولين كان 10ميكروغرام/مل.

لقد كان انحلال المركبين وظهور قممهماجيدا لكن زمن الاحتفاظ كان طويلا بحدود 11دقيقة بالنسبة للـ ATENOLOL و 17دقيقة بالنسبة للـ NADOLOL شكل1)

KONTRON DATA SYSTEM 450-MT2 V3.300
SYSTEM2 - AT001.SMP: essai atenolol nadolol
No. 003 ATENOLOL
No text
channel 2:SFM

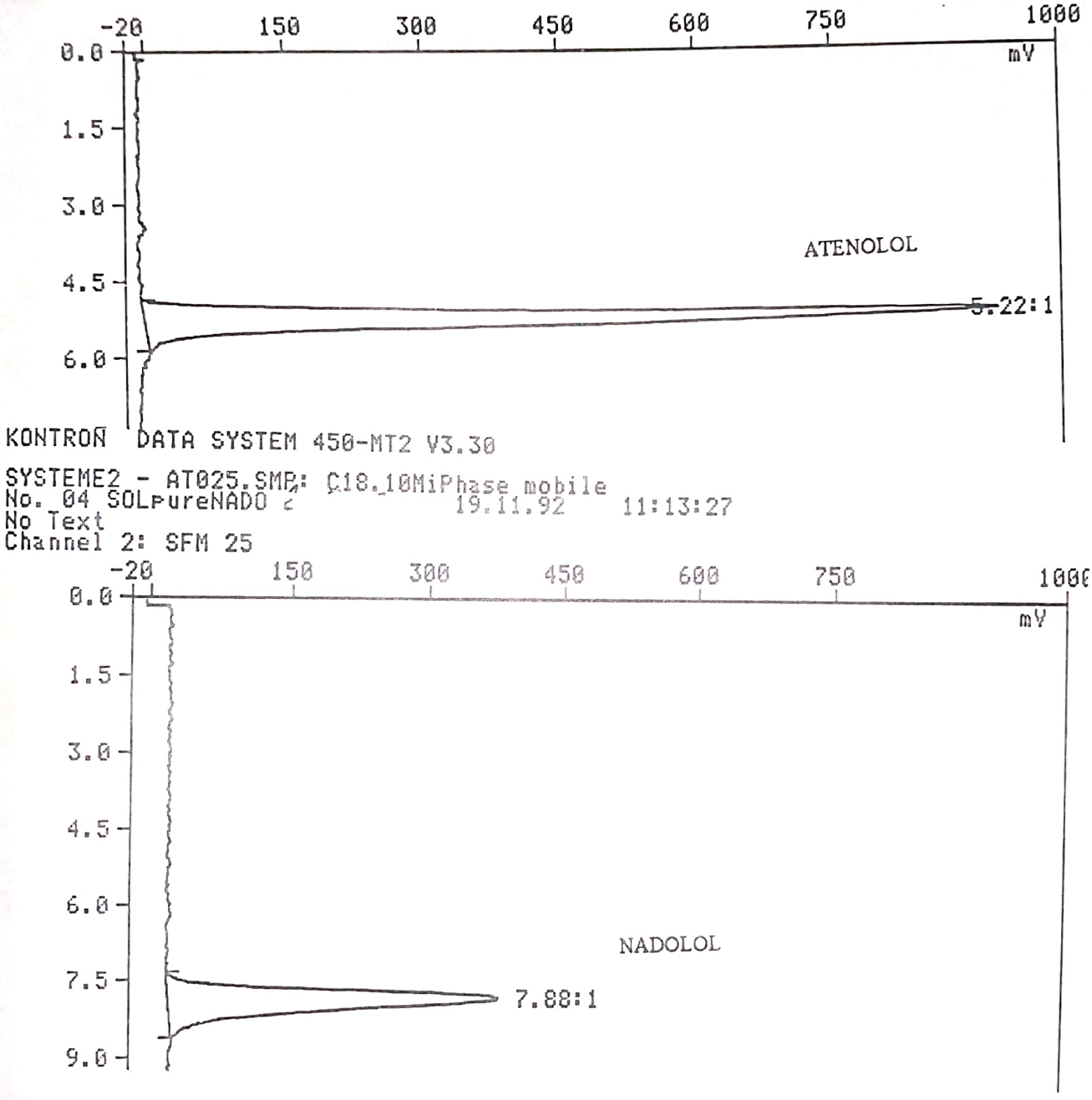


شكل رقم (1)

لقد زدنا كمية الكحول الميتيلي في عدة تجارب حتى وصلنا إلى نسبة 65٪. كما زدنا من تركيز حمض الخل الثلجي، لكن كل ذلك لم ينقص من زمن الاحتفاظ، مما أجبرنا على استبدال العمود المستعمل بعمود C18, 10MIC ثم أجرينا تعديلات بسيطة ف ينسب مكونات الطور المتحرك فتوصلنا إلى طور يعطي أفضل النتائج يتركب مما يلي:

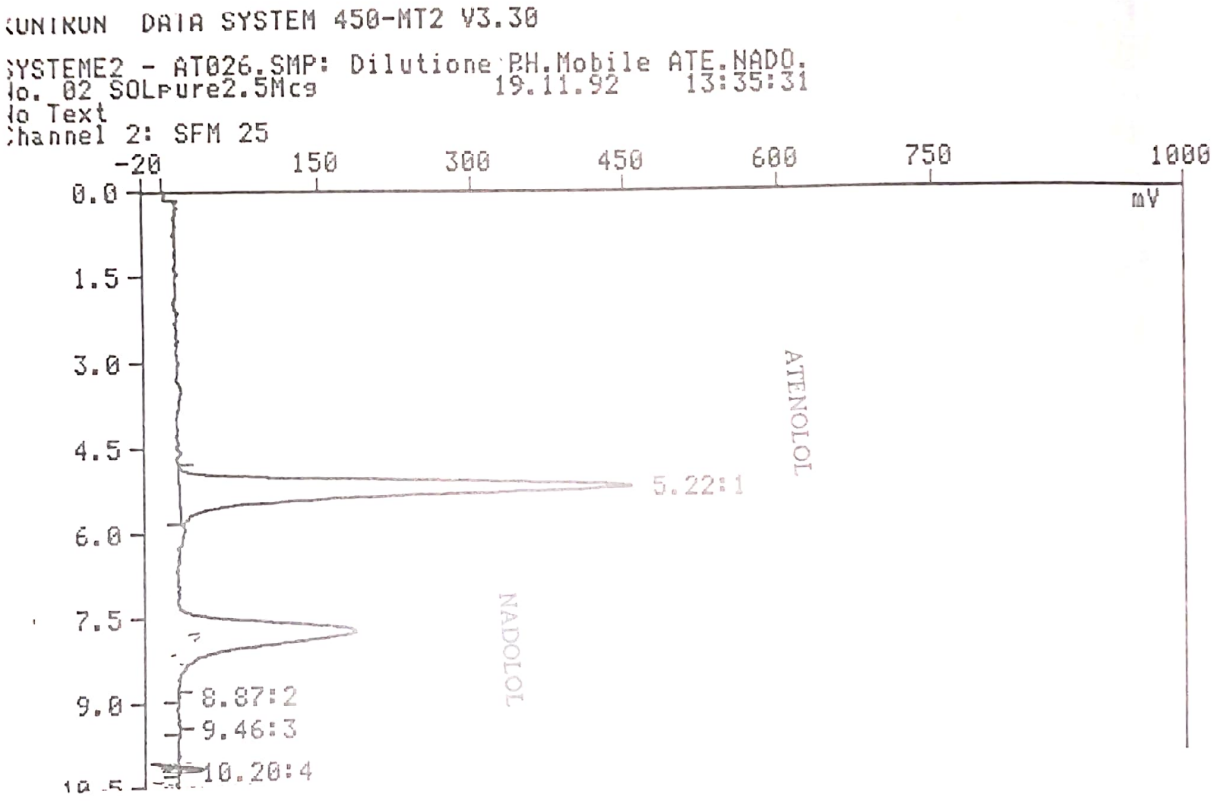
- كحول ميتيلي 47٪.
- ماء ثنائي التقطير 52٪.
- حمض الخل الثلجي 1٪.

وأضيف مركب صوديوم سلفات الهيبتان بنسبة 0.12٪ إلى الطور المتحرك كمادة مضادة للشوارد. وحصلنا على النتائج المبينة في الشكل رقم (2).


-20
150
300
450
600
750
1000
0.0
mV
1.5
3.0
ATENOLOL
4.5
5.22:1
6.0
KONTRON DATA SYSTEM 450-MT2 V3.30
SYSTEME2 - AT025.SMP: C18_10MiPhase mobile
No. 04 SOLpureNADO
19.11.92 11:13:27
No Text
Channel 2: SFM 25
-20
150
300
450
600
750
1000
0.0
mV
1.5
3.0
4.5
6.0
NADOLOL
7.5
7.88:1
9.0

الشكل رقم (2)

عند حقن 40ميكروليتر من محلول 10 ميكروغرام/مل من كل من NADOLOL,ATENOLOLأو حقن مزيج من المركبين بتركيز 5ميكروغرام/مل كما هو مبين بالشكل رقم(3



الشكل رقم (3)

أجرينا بعد ذلك اختبار الخطية وذلك باستخدام عدة تراكيز متزايدة من ATENOLOLمن التركيز0,05ميكروغرام/مل وأبقينا في جميع المحاليل المستخدمة تركيزاً ثابتاً من الشاهد الداخلي NADOLOL هو 5ميكروغرام/مل. بعد تبيان الثوابت الأساسية لخطة المعايرة مستخدمين محاليل من المادة المعايرة والشاهد الداخلي في الكحول الميتيلي وإجراء التمديدات بالطور المتحرك انتقلنا إلى تحميل المصل الدموي بالمادة المعايرة والشاهد الداخلي ثم إلى إجراء الاستخلاص في وسط

مناسب وبمحل عضوي مناسب وبعد مراحل استخلاص حتى تم الوصول إلى نسبة استخلاص مناسبة.

هذا وقد أجرينا عدة تجارب أولية على نوعية المحل العضوي المستخدم في الاستخلاص ودرجة قلوية وسط الاستخلاص.

وتوصلنا إلى خطة الاستخلاص التالية مستخدمين خلات الايتيل كمحل استخلاص.

1 -مل مصل دموي.

100 -ميكروليتر من محلول الشاهد الداخلي.

100 -ميكروليتر من محلولالمادة المعايرة.

1 -مل محلول صودا (1نظامي).

8 -مل خلات الايتيل (المحل العضوي).

*خض الأنابيب المغلفة مدة 15 دقيقة في خضاض دائري.

*تثفيل لمدة 15 دقيقة.

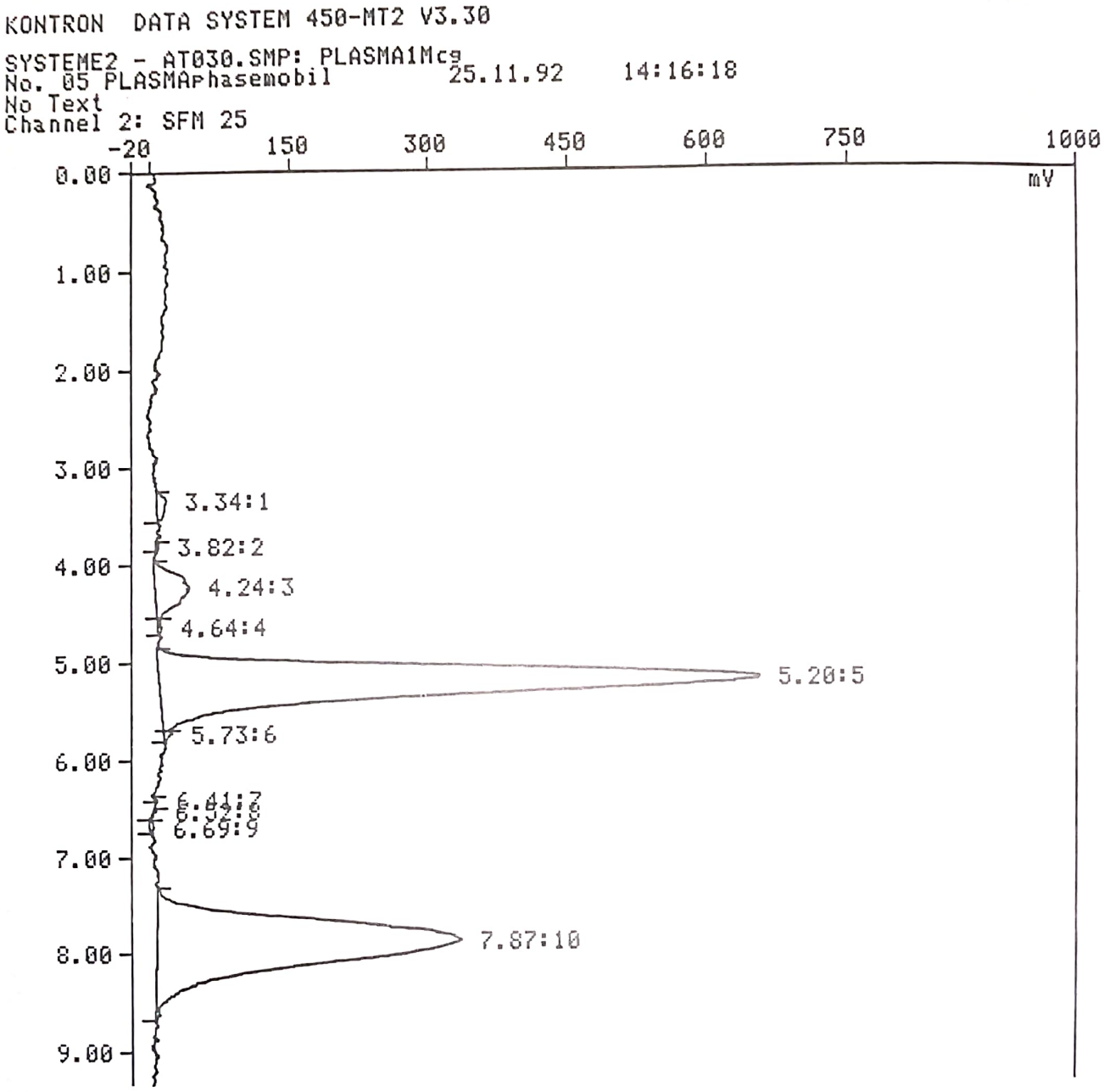
*فصل الطور العضوي بواسطة ممص زجاجي ووضعه في أنابيب ذات قعر مخروطي.

*اضافة 7مل خلات الايتيل إلى المصورة وإجراء نفس المراحل من الخض والتثفيل ثم فصل الطور العضوي ووضعه مع الخلاصة الأولى.

*تبخير الطور العضوي بالدرجة 37م وتحت تيار غاز الأزوت حتى البقية الجافة.

نتابع العمل بحل البقية الجافة بوساطة 250ميكروليتر من الطور المتحرك ثم نحقن 40ميكروليتر في عمود التفريق اللوني من كل أنبوب اختبار.

هذا وقد حصلنا على القمم التالية(الشكل4) بعد تحميل 1مل مصل دموي ب (1) ميكروغرام ATENOLOL. و (1) ميكروغرام.NADOLOL


KONTRON DATA SYSTEM 450-MT2 V3.30
SYSTEME2 - AT030.SMP: PLASMA1Mcg
No. 05 PLASMAphasemobil 25.11.92 14:16:18
No Text
Channel 2: SFM 25
-20
150
300
450
600
750
1000
mV
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
3.34:1
3.82:2
4.24:3
4.64:4
5.20:5
5.73:6
6.41:7
6.69:9
7.87:10

الشكل رقم (4)

لتبيان مدى صلاحية الطريقة لابد من حساب نسبة استخلاص ATENOLOL و NADOLOLمن المصل ومدى تكرارية طريقة المعايرة.ولهذا الغرض أجريت خمس عشرة تجربة فكانت نسبة الاستخلاص 76,8٪ و الانحراف المعياري 8,2 ونسبة عامل الاختلاف.CV%=11,5

أما بالنسبة للـ NADOLOL نسبة الاستخلاص 84,4٪ ، والانحراف المعياري6,2 CV%=7,5 فقد أجرينا الدراسة الخطية، بعد تحميل المصورة الدموية بعدد كبير من التراكيز.

في البداية أجرينا هذه الدراسة بتحميل 1مل من المصورة بحجم ثابت من محلول ATENOLOLيحتوي على تراكيز مختلفة من المادة المعايرة تمتد من 500نانوغرام حتى 1000نانوغرام وبحجم آخر من محلول الشاهد الداخلي NADOLOL يحتوي على تركيز ثابت في جميع الأنابيب قدرة 1ميكروغرام.

إن زيادة التركيز من ATENOLOL رافقها زيادة طردية من نسبة:

سطح / ATENOLOL سطح الشاهد الداخلي بحيث حصلنا على معادلة مستقيم هي التالية:

$$y = 9,30 + 0,14\ X$$

حيث y= تركيز ATENOLOL و= x سطح /ATENOLOL سطح الشاهد الداخلي.

وكان معامل ارتباط بين النقاط R.0,985=

كررنا هذه الدراسة الخطية عدة مرات فكانت العلاقة بين تركيز ATENOLOL ونسبة سطح المادة المعايرة/ سطح الشاهد الدالي خطية دائما وكانت قيم R هي التالية:

0,985 -0,952 - 0,986

ولزيادة حساسية الطريقة قمنا بحل البقية الجافة بعد الاستخلاص بالمحل العضوي والتبخير ب 150 ميكروليتر من الطور المتحرك بدلا من 250ميكروليتر فتوصلنا بهذا الاجراء إلى الكشف عن 5نانوغرام/مل من ATENOLOL.

ثم قمنا بعدها بدراسة خطية المعايرة ابتداءمن تركيز قدره 5 نانوغرام/مل حتى 100نانوغرام/مل. كررنا هذه الدراسة عدة مرات فحصلنا على تناسب طردي من الدرجة الأولى بين تركز ATENOLOL والنسبة سطح /ATENOLOL سطح الشاهد الداخلي.

وكانت معادلات المستقيمات هي التالية:

$$y1=4,44+7,21x1$$
$$y2=7,32+7,38x2$$
$$y3=4,02+6,77x3$$

وعامل ارتباط R على التوالي:

$$R1=0,989$$
$$R2=0,977$$
$$R3=0,967$$

وهكذا توصلنا إلى وضع خطة لمعايرة حاجب مستقبلات بيتا في المصل الدموي باستخدام جهاز التفريق اللوني ذي الكفاءة العالية المربوط بجهاز تألق طيفي.

طريقة المعايرة هذه فائقة الحساسية (توصلنا للكشف عن 5نانوغرام/مل) كما أنها قابلة للتطبيق ضمن مجال واسع لتغيرات تركيز هذه المادة في مصل دموي.

يغطي المجال من 5 نانوغرام/مل حتى 1000نانوغرام/مل.

بقي لدينا تطبيق خطة المعايرة هذه في دم المرضى الذين يأخذون هذا الدواء وذلك بغرض تحديد مختلف معايير الحركية الدوائية لديهم وخاصة هؤلاء المعالجين بهذا الدواء والذين يعانون من قصور كلوي حيث إن معايير الحركية الدوائية تختلف حسب شدة الاصابة الكلوية.

ومعرفتنا بهذه المعايير وارتباطها بدرجة القصور الكلوي يسمح لنا بملاءمة جرعة هذا الدواء المستعمل بشكل واسع كمضاد الارتفاع الضغط الشرياني مع درجة القصور الكلوي.

لكن فترة إقامتي في مخبر علم الأدوية السريري في ليون - فرنسا لم تتح لي فرصة تطبيق هذه الخطة على معايرة ATENOLOLعند المرضى وذلك لما يتطلبه جمع عينات الدم من المرضى من وقت طويل حيث لابد من عدد كاف كي نتمكن من اجراء الدراسة الاحصائية ودراسة الحركية الدوائية.

❒ Resumé ❒

J'ai mis au point une méthode de dosage de L'ATENOLOL dans le sérum humain en vue de l'appliquer dans les études cimétiques chez l'homme et surtout chez les insuffisants rénaux.

J'ai utilisé dans ce dosage la méthode de chromatographie liquide à haute performance.

On peut diviser le travail en deux etapes: la première: les experiences ont été faites en utilisant des solutions de la molecule en question et l'étalon interne, pendant cette étape on a précisé la phase mobile et la phase stationnaire et la reproductiblité des essaies.

La deuxième: on a chargé le sérum par la molecule et l'étalon interne, on a extrait les produits après agitation, par un solvant organique convenable puis on a évaporé le solvant et on a fait dissoudre le résidu dans la phase mobile et injecter un volume fixe dans la colonne de l'appareil.

Le pourcentage de l'extraction des deux produits a été vers 80% et le coéfficient de variation a été vers 10%. On a diminué le volume de la phase mobile utilisé pour faire dissoudre le résidu jusqu' à 150 microlitre pour augmenter la sensibilité de la méthode, en conséquence on est arrivé à preciser 5 nanograme par mililitre du sérum. On a repeté cette étude plusieur fois en rapportant la surface de l'atenolol sur la surface de l' étalon interne. Le coéfficient de correlation a été presque un. Donc on a actuellement une méthode de dosage pret à appliquer dans les études cinétiques chez l'homme de l'atenolol.

المراجع

REFERENCES:

- N.FERRY. N. BERNARD . N. POZET.E. GARDES.
- M. BRUGUIER. GCUISINAUD AND J.SASSARD
- BR.J.CLIN.PHARMAC.1991..32.39.44.