جامعة المنيا
كلية الصيدلة
قسم الكيمياء التحليلية

إستخدام طرق لَصْفِيه وكروماتوجرافيه لِتعيين بعض العقاقير المستخدمه في علاج تضخم البروستاتا الحميد وزيادة حمض البوليك في الدم

رسالة مقدمة من

أبوبكر عبد الوهاب محمد أحمد

بكالوريوس العلوم الصيدلية - كلية الصيدلة - جامعة أسيوط (٢٠٠٥)

ماجستير العلوم الصيدلية (كيمياء تحليلية)- كلية الصيدلة - جامعة المنيا (٢٠١٥)

لإستيفاء متطلبات الحصول علي درجة دكتوراة الفلسفة في العلوم الصيدلية (كيمياء تحليلية)

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور

عبد المعبود إسماعيل محمد

أستاذ الكيمياء التحليلية الصيدلية - كلية الصيدلة - جامعة اسيوط

الدكتور

سيد محمد سيد دريع

أستاذ الكيمياء التحليلية المساعد ورئيس قسم الكيمياء التحليلية - كلية الصيدلة - جامعة المنيا

الأستاذ الدكتور

محمود أحمد عمر

أستاذ الكيمياء التحليلية - ووكيل الكليه لشئون الدراسات العليا والبحوث - كلية الصيدلة - جامعة المنيا

الدكتور

محمد عبد الخالق إسماعيل

أستاذ الكيمياء التحليلية المساعد والقائم بأعمال وكيل الكليه لشئون التعليم والطلاب - كلية الصيدلة – جامعة مدينة السادات

٢٠١٨

ملخص الرسالة باللغة العربية

تهدف هذه الدراسة الي إستحداث وتقييم طرق جديدة ذات دقه عالية بإستخدام الواح كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة و إستخدام الطرق اللصفية ذات الخطوات السهلة البسيطة لتعيين سبعة ادوية وهي؛ فيبوكسوستات- مثبط انتقائي جديد -غير بيوريني- لأوكسيديز الزانثين- لتقليل إنتاج حمض البوليك في الدم. كولشيسين و بروبينسيد- لعلاج النقرس إما بتخفيف الإلتهابات او بزيادة إخراج حمض البوليك من الجسم عن طريق الكلي. دوكسازوسين ميسيلات، هيدروكلوريد تيرازوسين وهيدروكلوريد الفوزوسين- لعلاج تضخم البروستاتا الحميد- وهي أدوية ذات إنتقائية في غلق المستقبلات الفا ١ الأدرينالينية. سيلودوسين وهواكثر تخصصاً ذو انتقائية في غلق المستقبلات الفا ١أ الأدرينالينية.

بسبب عدم وجود إنتقائيه أو انخفاض دقة الطرق المذكورة في التراث العلمي لتحديد هذه الأدوية،هناك حاجة ملحة لتطوير أساليب اكثر تخصصاً، ذات انتقائية و دقه عالية لتعيين تلك الأدويه في السوائل الحيوية.

من هذا المنطلق، تطبيق هذه الطرق المبتكره يقدم استراتيجيات جديدة في التحليل الحيوي للمركبات موضع الدراسة في السوائل الحيوية المختلفة مثل البلازما والبول أو في المستحضرات الصيدلية.

تضمنت الرسالة ثلاثة اجزاء وهي؛

<u>الجزء الأول</u>: مقدمة عامة

يشتمل هذا الجزء علي مقدمة عامة عن المركبات موضع الدراسة، من حيث الخصائص الطبيعية والكيميائية والدوائية وكذلك سرد لما ورد في التراث العلمي من طرق التحليل المستخدمة في تحليل تلك العقاقير وتم تقييم هذه الطرق حسب تقنيات التحليل المستخدمة، وأخيراً علي رؤية الرسالة وتحديد الهدف من إجراء هذه الدراسة.

<u>الجزء الثاني</u>: طرق بإستخدام الواح كرماتوجرافيا الطبقه الرقيقه

ويشتمل هذا الجزءعلي فصلين؛

<u>الفصل الأول</u>: في هذا الفصل، تم تصميم طريقة مبتكره وحديثة بإستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة مصحوبة بقياس شدة اللصف لتعيين فيبوكسوستات بدقه و إنتقائيه عالية. اعتمدت الطريقة المقترحة علي تعرض فيبوكسوستات وهو على الواح كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة لأبخرة حمض الهيدروكلوريك، والذي ادي إلى تحسن كبيرجداً في اللصف الضعيف لفيبوكسوستات ، مما سمح لتلك الطريقة بتعيين فيبوكسوستات في البلازما البشرية الحقيقية والبول بدقه عالية؛وذلك بعد الإثارة عند ٣٤٥ نانومتر على الواح كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة بإستخدام الطولوين :خلات الايثيل: الميثانول : حمض الخليك الجليدي، بنسبة (٣٠: ١٠: ٥: ٠,١) كطور متحرك.وكانت قيمة معدل النزوح للفيبوكسوستات ٠,٣٣ ± ٠,٠٣ مع معامل ارتباط ٠,٩٩٧٤ عند تركيزات تتراوح بين ٢,٥-٥٠ نانوجرام لكل بقعة. عند استخدام الانحدار متعدد الحدود، تم تحسين معامل الارتباط بشكل كبير (٠,٩٩٩٩)،بحد كشفي ٠,٥٥ وكمي ١,٦٧ (نانوجرام لكل بقعة). وعلاوة على ذلك، وجد أن أقل قيمه للحد الكمي في البلازما والبول هي ٢,٧ و ٢,٥ نانوجرام لكل بقعة،علي الترتيب. والجديد في هذه

الدراسة يتأتي من؛ انه حتى الآن لم يتم نشر أي طريقة لتحديد فيبوكسوستات في البلازما البشرية الحقيقية أو البول بسبب إما عدم وجود خصوصية أو انخفاض دقة تلك الطرق، وذلك يرجع الي ان تلك الطرق اعتمدت علي القياس بإستخدام الأشعة فوق البنفسجية التقليدية. في حين أن الطريقة المقترحة اعتمدت علي إستخدام شدة اللصف في القياس وهي تعتبر الأولي من نوعها حتي الأن.

تم التحقق من صحة الطريقة المقترحة وفقا للمؤتمر الدولي للمواءمة وتوجيه الولايات المتحدة الأمريكية – واستخدمت الطريقة بنجاح لتعيين فيبوكسوستات بدقه وانتقائية في مستحضراته الصيدلية دون تدخل من السواغ. وعلاوة على ذلك، تم توسيع الطريقة المقترحة لتعيين هذا الدواء بكفاءة في عينات البلازما والبول الحقيقية للإنسان في وجود الأيض الخاص بهذا الدواء دون أي تداخل، مما يسمح بالتطبيق السريري للطريقة المقترحة للتعيين المباشر لفيبوكسوستات في السوائل الحيويه وكذلك في الدراسات الدوائية ومراقبة الجودة من حيث الجرعات الصيدلانية دون معالجة للعينة أو استخدام خطوات استخلاص مكلفه ومتعبه.

<u>الفصل الثاني:</u> يعرض هذا الفصل طريقة سريعه وبسيطة بإستخدام الواح كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة ، وذلك بقياس الانعكاس الامتصاصي لكلاً مِن كولشيسين وبروبينسيد في خاليطهم الثنائي،حيث انه تم فصل وتعيين العقارين في نفس الوقت كمياً بإستخدام السيليكا كطور ثابت وإستخدام الطولوين : خلات الايثيل: الميثانول : الأمونيا بنسبة (٣٠: ٢٠: ٢٠: ٠,١) كَطور متحرك مع إستخدام الإنعكاس الإمتصاصي في القياس عند طول موجي ٢٤٨ نانومتر لكلاهما معاً و ٣٥٤ نانومتر للكولشيسين بمفرده. ولقد تم فصل كلاً منهما عن الآخر على نحو مرض بمعدل نزوع ٠,٣٣ ± ٠,٠٣ و ٠,٦٠ ± ٠,٠٣ لكلٍ مِن بروبينيسيد والكولشيسين على الترتيب. وقد وجد أنه في ظل الظروف المثلي للطريقه ،هناك علاقة خطية مستقيمة بين قراءات مساحة المنحنيات والمركبات المدروسة عند تركيزات تتراوح بين ١٦-٣٢٠ و ١٢٠-٢٤٠٠ نانوجرام لكل بقعة وبحدود كميه ١٧,٥٩ و ٢٢٥,٨٢ نانوغرام لكل بقعة للكولشيسين و بروبينيسيد، على الترتيب عند ٢٤٨ نانومتر. بينما عند ٣٥٤ نانومتر كانت العلاقه الخطيه للكولشيسين تتراوح بين ١٦-٢٤٠ نانوجرام لكل بقعة بحد كمي ٥٤,٠٣ نانوجرام لكل بقعة. ولوحظ انه عند استخدام تحليل الانحدار متعدد الحدود امتدت نطاقات الاختبار التجريبية إلى حد كبير مع حدود كميه أقل١٥,٦٠ و ١١٦,١٣ نانوجرام لكل بقعة لكلٍ مِن كولشيسين و بروبينيسيد، على الترتيب عند ٢٤٨ نانومتر معاً، و ١٣,٢٠ نانوجرام لكل بقعة للكولشيسين عند ٣٥٤ نانومتر، ولقد تحسنت معاملات الارتباط كثيرا عند استخدام تحليل الانحدار متعدد الحدود. لذا إستُخْدِم النموذج التربيعي ليكون الأفضل لجميع النتائج. وقد تم التحقق من صحة هذه الطريقة وفقا للمبادئ التوجيهية للمؤتمر الدولي للمواءمة حيث قدمت الطريقه معاملات ارتباط جيده تتراوح بين (٠,٩٩٩٧-٠,٩٩٩٩) لكلاهما ، ولقد إستُخْدِمت الطريقه بنجاح لتعيين الأدوية موضع الدراسه في مستحضرها الصيدلي دون تدخل من أي سواغ.

حتى الآن، تعد هذه هي المحاولة الأولى لتطوير طريقه، بسيطة، ذات إنتقائية عاليه وبسيطه، لتعيين كولشيسين و بروبينسيد في وقت واحد في نفس الجرعة. ولقد عرضت الطريقة المطروحه عددا من الميزات بما في ذلك الدقة العالية، والفصل الجيد ، في وقت قصير، وأقل تكلفه،وقياس عينات كثيره في نفس الوقت، بكميات ضئيلة من المذيبات.لذا يمكن اعتبار الطريقة المقدمة بديلاً جيدا لأساليب الفصل الكروماتوجرافي الموجودة بالفعل والتي تتطلب خطوات استخلاص مكلفه.

الجزء الثالث: الطُرق اللَّصْفِيه

ويتألف هذا الجزء من أربعة فصول؛

الفصل الأول: يصف هذا الفصل طريقة لصفيه بسيطة وسريعة ومحددة وحساسه للغاية لتعيين فيبوكسوستات في مستحضراته الصيدليه و وكذلك في البلازما البشرية الحقيقية. ولقد اعتمدت الطريقه المقترحه علي دراسة شدة اللصف لعقار فيبوكسوستات في محلول حمضي مائي. حيث انه تم قياس شدة اللصف عند طول موجي ٤٠٠ نانومتر بعد الإثارة عند طول موجي٣٣٥ نانومتر. ولقد كانت هناك علاقة خطية مستقيمة بين قراءات شدة اللصف والتركيزات المدروسه عند نطاق ٠,٥-٢٠,٠ نانوجرام لكل ملليليتر، بحد كشفي ٣٨,٩ وكمي ١١٧,٣ (بيكوجرام لكل ملليليتر). وكانت حساسية الطريقة المقترحة عالية مما سمح بتطبيقها لتعيين فيبوكسوستات في البلازما البشرية الحقيقية بنسب استرجاع جيده (٨١,٧٣ ± ٢,٦٪). وتم توسيع نطاق تطبيق الطريقة المقترحة لتشمل دراسات ثبات فيبوكسوستات بعد التعرض لمختلف ظروف الانحلال القسري، مثل الظروف الحمضية والقلوية والأكسدة، وذلك للمره الأولي ، وفقا للمبادئ التوجيهية للمؤتمر الدولي للمواءمة.

عرضت الطريقة المقدمة عدداً من الميزات بما في ذلك تحسين الحساسية، وارتفاع نسبة الإسترجاع، عملية بسيطة ووقت تحليل قصير وكذلك منخفض التكلفة وصديقة للبيئة بالمقارنه بالطرق المنشوره. مع الأخذ بعين الاعتبار، أن الطريقة اللصفية المقترحة هي الطريقة الأكثر حساسية لتعيين فيبوكسوستات في البلازما البشرية الحقيقية حتى الآن. ولذلك، فإن الطريقة المقترحة لم تتمكن فقط من تحديد فيبوكسوستات في البلازما البشرية الحقيقية، ولكن أيضاً بحساسية أعلى من الطرق المنشوره سابقاً. بالإضافة إلى ذلك، تم تطبيق الطريقة المقدمة بنجاح، لدراسات الثبات في فيبوكسوستات كوسيلة جديدة لتلك الدراسة. وأخيرا، يمكن أن تكون هذه الطريقة مفيدة لتعيين فيبوكسوستات في العينات الحيوية أو في التطبيقات السريرية للمرضى الذين يتعاطوا هذا الدواء.

الفصل الثاني: هذا الفصل يعرض طريقة لصفيه جديدة، انتقائية وحساسة للتحديد الكمي لكلِ مِن دوكسازوسين ميسيلات، هيدروكلوريد تيرازوسين وهيدروكلوريد الفوزوسين في مستحضراتهم الصيدلية والبلازما البشرية. ولقد اعتمدت الطريقه علي اشتقاق العقاقير المدروسة بكفاءه بإستخدام أورثو-فثالالدهيد، في وجود ٢-ميركابتوايثانول في منظم للأس الهيدروجيني(الرقم الهيدروجيني ٩,٧) للحصول علي مشتقات ايزوانول ذات اللصف العالي، والتي يمكن أن تحسن بقوة اللصف الخاص بالأدويه موضع الدراسه ، مما يسمح بتعيينها بحساسية عند طول موجي ٤٣٠ نانومتر بعد الإثارة عند طول موجي ٣٣٧ نانومتر. ولقد كانت هناك علاقة خطية مستقيمة بين قراءات شدة اللصف والتركيزات المدروسه علي نطاقات ١٠,٠-٤٠٠,٠ (نانوجرام لكل ملليليتر). وبحدود كشف وكم تتراوح بين ٠,٥٢-٣,٨٨ (نانوجرام لكل ملليليتر) و ١,٥٩-١١,٧٦ (نانوجرام لكل ملليليتر)، على الترتيب. تم التحقق من صحة الطريقة المقترحة وفقا للمبادئ التوجيهية للمواءمة الدولية للمؤتمرات، وطبقت بنجاح لتعيين المستحضرات الصيدلانية للأدوية المدروسة. وعلاوة على ذلك، الحساسية

العالية للطريقة المقترحة يسمح بتطبيقها بنجاح لتحليل الأدوية موضع الدراسه في بلازما الإنسان بنسب استرجاع عاليه تتراوح بين ٩٦,١٢ ± ١,٣٤ -١٠٠,٦٦ ± ٠,٥٧(٪).

مما سبق، يتبين أن الطريقة المقترحه تقدم العديد من المزايا منها؛ البساطة، الكفاءة والحساسيه العاليه. وعلاوة على ذلك، فإنه لا تتطلب العديد من خطوات المعالجة أو الكواشف باهظة الثمن. من هذه النقاط، فإنه يمكن أن توفر الجهد والوقت والمال بالمقارنة بالطرق اللصفية الأخري المنشوره. لذلك قدمت الطريقة المقترحة بديلاً مناسباً للتحليل الروتيني للأدوية المدروسة في العينات الحيويه والدراسات السريرية.

الفصل الثالث: يشرح هذا الفصل طريقة طيفية محددة وبسيطة وسريعة لتعيين هيدروكلوريد تيرازوسين ودوكسازوسين ميسيلات بكفاءه في المستحضرات الصيدلانية. ولقد اعتمدت الطريقة المقترحه علي تكوين شكل شبه كينويد من الأدويةموضع الدراسه في منظم للأس الهيدروجيني (الرقم الهيدروجيني ٩,٨)، مما أدى إلى مما ادي الي تحسن ملحوظ وكبير في شدة اللصف الخاص بالعقاقير موضع الدراسه، وقياسها عند طول موجي ٣٨٧ بعد الإثارة عند طول موجي ٢٤٦ نانومتر لكلاً مِن دوكسازوسين أو تيرازوسين، بحدود كشف ٠,٠٥ و ٠,١٤ نانوجرام لكل ملليليتر و حدود تعيين كمي ٠,١٤ و ٠,٤٣ نانوجرام لكل ملليليتر في نطاقات تركيز تتراوح بين ٠,٢-٣٠ نانوجرام لكل ملليليتر و ٠,٥-٣٠ نانوجرام لكل ملليليتر لتيرازوسين و دوكسازوسين ، على الترتيب. ولقد تم التحقق من صحة الطريقة المقترحة وفقا للمبادئ التوجيهية للمواءمة الدولية للمؤتمرات، وطبقت بنجاح لتعيين المستحضرات الصيدلانية للأدوية المدروسة. وعلاوة على ذلك، فإنها إمتدت إلى أداء اختبار التوحيد المحتوى وتعيين الأدوية في بلازما الإنسان بنسب ارتجاع جيده ودقيقه تتراوح بين ٩٦,٠٠ ± ٠,٤٥ -١٠١,٤٢ ± ١,٢٠ (٪).

وعرضت الطريقة المقترحه عددا من المزايا، بما في ذلك السرعة والحساسية والخصوصية والبساطة وقصر وقت التحليل دون ظروف ردود الفعل الحرجة أو الكواشف باهظة الثمن بالمقارنة مع الطرق اللصفيه الأخرى التي ذكرت في التراث العلمي. وبناءاً علي حساسية هذه الطريقه فلقد امتدت لتعيين الأدوية موضع الدراسه في بلازما الإنسان بكفاءة عالية. وعلاوة على ذلك، طبقت الطريقة المقترحه في اختبار مواءمة المحتوى. في نهاية المطاف، يمكن أن تكون هذه الطريقة مفيدة لتعيين إما تيرازوسين أو دوكسازوسين في العينات الحيويه أو في دراسات التطبيقات السريرية.

الفصل الرابع: يصف هذا الفصل تطوير وتحقق من طريقة لصفيه جديده ذات حساسية وإنتقائية لتعيين سيلودوسين في مستحضره الصيدلي والبلازما البشرية. و لقت بنيت هذه الطريقه على تفاعل إحلال نيوكليوفيلي لسيلودوسين ب-٥- (ديميثيل أمينو) نفثالين-١-سلفونيل كلوريد في وجود كربونات الصوديوم ٥,٠ × ١٠-٤ مولار (الرقم الهيدروجيني ١٠,٥٠) لإنتاج مشتق ذو لصف عالي تم قياسه عند طول موجي ٤٣٥ نانومتر بعد الإثارة عند طول موجي ٣٤٧ نانومتر. وقد درست العوامل التجريبية المختلفة التي تؤثر على تطوير وثبات ناتج التفاعل بعناية ووبطريقه مثلي. وفي ظل الظروف المثلي هناك علاقة خطية مستقيمة مع معامل ارتباط جيد (٠,٩٩٧٩) بين شدة اللصف والتركيزات المدروسة عند تركيزات تتراوح بين ٣٠,٠ - ٢٠٠،0 نانوجرام لكل ملليليتر، بحد كشفي ٥,٤٤ نانوجرام لكل ملليليتر وحد كمي ١٦,٤٧ نانوجرام لكل ملليليتر.ولقد تم التحقق

من صحة الطريقة المقترحة وفقا للمبادئ التوجيهية للمواءمة الدولية للمؤتمرات، وتطبيقها بنجاح لفحص سيلودوسين في كبسولاته وكذلك إجراء إختبار التوحيد المحتوى.

ولقد سمحت الحساسية العالية للطريقة المقترحة بتطبيقها بنجاح في تحليل سيلودوسين في البلازما البشرية المتراكبة مع نسب استرجاع تتراوح بين ٩٢,٨٨ ± ١,٠٥-١٠٠,٧٣ ± ٠,٧٥ (٪)، وتم توسيع تطبيق الطريقة المقترحة كذلك ليشمل دراسات الثبات لسيلودوسين بعد التعرض لمختلف ظروف الانحلال القسري، مثل الظروف الحمضية والقلوية والأكسدة، وفقا للمبادئ التوجيهية للمواءمة الدولية للمؤتمرات، حيث يصف هذا العمل المحاولة الأولى لتعيين سيلودوسين في وجود نواتج الإنحلال نتيجه للأكسدة وكذلك في البلازما. ومن الجدير بالذكر أنه لم يتم نشر أي طريقة لصفيه لتعيين سيلودوسين في البلازما البشرية حتى الآن.

في نهاية المطاف، تم التحقق من معايير التحقق للطرق المقترحه بشكل جيد. وقد تم تحليل الطرق المقترحة إحصائياً ومقارنتها بالنتائج التي تم الحصول عليها بالطرق المنشورة وجاءت جميع النتائج متوافقة إحصائياً، مما يدل على دقة جيدة و ملاءمة الطرق المقترحة لتحديد الأدوية المدروسة في أشكالها النقية، والتركيبات الصيدلانية والسوائل الحيويه (البلازما والبول).

هذا وتتكون الرساله من ثلاثة أجزاء تضمنت؛(٥٢) جدولاً و (٥٩) شكلاً توضيحياً و(٦) مخططاً وقائمة من (٢٣٢) مرجعاً، رُتِبَت حسب ورودِها بالرساله و اخيراً تنتهي بموجز عربي.