



۱۳۷۸ / ۵ / ۱

دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده داروسازی



پایان نامه:

برای دریافت درجه دکترا

موضوع:

بررسی هم ارزی زیستی قرص انالاپریل و رابطه آن با ACE در
داوطلبان سالم

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر حسنیه تاجرزاده

همکار استاد راهنما:

جناب آقای دکتر مهرداد حمیدی

نگارش:

میترا شاهوردی

شماره پایان نامه: ۳۹۵۱

سال تحصیلی: ۱۳۷۷-۷۸

2518/2



هره فمپینی نگاران

تلفن: ۸۳۳۳۷۹۸۳۳۳۶۶

میدان هفت تیر، بالاتر از مسجد الجواد، جنب فروشگاه دانش تریکو، پلاک ۶/۲۹۹

حاصل تلاش اندکم، صمیمانه تقدیم به:

راهنمایان همیشه زندگی ام،

مادر و پدر بسیار عزیزم.

و تقدیم به روح پاک تنها خواهرم،

نسترن.

و تقدیم به یگانه همراه زندگی ام،

همسرم، حسین.

با تشکر فراوان از استاد ارجمندم، سرکار خانم دکتر حسنیه تاجرزاده،
به پاس زحمات و راهنمایی‌های گرانقدرشان.

و با تشکر فراوان از استاد گرامی، جناب آقای دکتر مهرداد حمیدی،
به پاس همراهی‌ها و راهنمایی‌ها و تلاش‌های بی‌شائبه و بیدریغشان.

و با تشکر از زحمات و راهنمایی‌های استاد ارجمند، جناب آقای دکتر
محمد رضا رویینی.

و با تشکر بسیار از استاد گرامی‌ام، جناب آقای محمد رامین ضیاء،
به پاس راهنمایی‌ها و همراهی‌های ارزشمندشان.

و با سپاس از زحمات و همراهی‌های صمیمانه سرکار خانم
لیدا حاکمی.

و همچنین با تشکر از زحمات جناب آقای محمد پدندر و نیز سایر اعضا و
دستیاران آزمایشگاه بیوفارماسی.

از همراهی‌های دوستان عزیزم، خانم دکتر پریسا سرخیل، خانم دکتر
مریم صالح پور و خانم دکتر مینو افشار بسیار سپاسگزارم.

همچنین از همراهی‌های دوستانم در ورودی بهمن ۷۰ در طی دوران
تحصیل و نیز از داوطلبانی که مرا در این پژوهش یاری دادند بسیار
متشکرم.

و با تشکر فراوان از زحمات خانم شکوفه دلاور که مرا صمیمانه در امر
حروفچینی همراهی کردند.

فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱	مقدمه
۴	فصل اول - آنالاپریل
۵	۱-۱ ویژگیهای فیزیکوشیمیایی
۹	۲-۱ روشهای شناسایی و تعیین مقدار
۹	۱-۲-۱ شناسایی و تعیین مقدار در محیط برون تنی
۱۰	۲-۲-۱ شناسایی و تعیین مقدار در محیط درون تنی
۱۱	۳-۱ فارماکودینامی و درمان شناسی
۱۱	۱-۳-۱ مکانیسم اثر
۱۴	۲-۳-۱ موارد کاربرد درمانی
۱۵	۳-۳-۱ عوارض جانبی
۱۶	۴-۳-۱ مقدار مصرف
۱۸	۵-۳-۱ اشکال دارویی موجود و نامهای تجارتي
۱۹	۶-۳-۱ تداخلهای دارویی
۲۰	۴-۱ فارماکوکینتیک
۲۰	۱-۴-۱ جذب
۲۰	۲-۴-۱ توزیع
۲۱	۳-۴-۱ غلظت خونی و اتصال پروتئینی
۲۱	۴-۴-۱ متابولیسم
۲۲	۵-۴-۱ حذف
۲۳	فصل دوم - فراهمی زیستی و هم ارزی زیستی

۲۴	۱-۲ تعریف فراهمی زیستی و هم ارزی زیستی
۲۵	۲-۲ هدف از انجام مطالعه فراهمی زیستی
۲۶	۳-۲ فراهمی زیستی مطلق و نسبی
۲۷	۴-۲ روشهای ارزیابی فراهمی زیستی
۲۹	۵-۲ عوامل فردی مؤثر بر فراهمی زیستی
۳۰	۶-۲ مطالعه هم ارزی زیستی
۳۲	فصل سوم - آزمایشهای برون تنی
۳۴	۱-۳ مواد و روشها
۳۴	۱-۱-۳ مواد
۳۵	۲-۱-۳ دستگاه
۳۵	۳-۱-۳ روش کروماتوگرافی
۳۵	۱-۳-۱-۳ آزمونهای ارزشیابی
۳۵	۱-۱-۳-۱-۳ تهیه منحنی استاندارد
۳۶	۲-۱-۳-۱-۳ حداقل غلظت قابل تشخیص
۳۶	۳-۱-۳-۱-۳ بازیابی مطلق (صحت روش)
۳۶	۴-۱-۳-۱-۳ تغییرهای روزانه و بین روزانه (دقت روش)
۳۷	۵-۱-۳-۱-۳ پایداری نمونهها
۳۷	۶-۱-۳-۱-۳ بازیابی داروی اضافه شده به دارونما (بازیابی نسبی)
۳۸	۴-۱-۳ آزمون یکنواختی محتوا
۳۹	۵-۱-۳ آزمون انحلال
۴۱	۲-۳ دستاوردها و بحث
۴۱	۱-۲-۳ روش کروماتوگرافی
۴۲	۱-۱-۲-۳ آزمونهای ارزشیابی

۴۲ ارتباط خطی	۱-۱-۲-۳
۴۳ حداقل غلظت قابل تشخیص	۲-۱-۱-۲-۳
۴۳ باز یابی مطلق (صحت روش)	۳-۱-۱-۲-۳
۴۴ تغییرهای روزانه و بین روزانه (دقت روش)	۴-۱-۱-۲-۳
۴۵ پایداری نمونه ها	۵-۱-۱-۲-۳
۴۵ باز یابی داروی اضافه شده به دارونما (باز یابی نسبی)	۶-۱-۱-۲-۳
۴۶ آزمون یکنواختی محتوا	۲-۲-۳
۴۶ آزمون انحلال	۳-۲-۳
۴۸	فصل چهارم - آزمایشهای درون تنی	
۵۳ مواد و روشها	۱-۴
۵۳ مواد	۱-۱-۴
۵۳ دستگاه	۲-۱-۴
۵۳ روش تهیه نمونه	۳-۱-۴
۵۴ روش کروماتوگرافی	۴-۱-۴
۵۴ آزمونهای ارزشیابی	۱-۴-۱-۴
۵۴ تهیه منحنی استاندارد	۱-۱-۴-۱-۴
۵۵ حداقل غلظت قابل تشخیص	۲-۱-۴-۱-۴
۵۵ باز یابی مطلق (صحت روش)	۳-۱-۴-۱-۴
۵۵ تغییرهای روزانه و بین روزانه (دقت روش)	۴-۱-۴-۱-۴
۵۶ انتخاب داوطلبان سالم	۵-۱-۴
۵۷ مشخصات داوطلبان	۱-۵-۱-۴
۵۸ آزمایشهای بالینی	۲-۵-۱-۴
۵۸ تعیین میزان پایه فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین در داوطلبان	۳-۵-۱-۴

۵۹	۴-۱-۵ روش نمونه‌گیری از داوطلبان
۵۹	۴-۱-۶ تعیین پارامترهای فارماکودینامیک دارو
۶۰	۴-۲ دستاوردها و بحث
۶۰	۴-۲-۱ روش کروماتوگرافی
۶۱	۴-۲-۱-۱ آزمونهای ارزشیابی
۶۱	۴-۲-۱-۱-۱ ارتباط خطی
۶۲	۴-۲-۱-۲ حداقل غلظت قابل تشخیص
۶۲	۴-۲-۱-۳ بازیابی مطلق (صحت روش)
۶۳	۴-۲-۱-۴ تغییرهای روزانه و بین روزانه (دقت روش)
۶۴	۴-۲-۲ منحنیهای مهار فعالیت آنزیم نسبت به زمان
۷۰	۴-۲-۳ پارامترهای فارماکودینامیک دارو
۷۱	۴-۲-۴ فراهمی زیستی نسبی
۷۲	فصل پنجم - آزمونهای آماری
۷۳	۵-۱ انجام آزمونهای آماری برای بررسی هم ارزی زیستی قرص انالاپریل
۷۴	۵-۲ نتایج آزمونهای آماری
۷۵	فصل ششم - نتیجه‌گیری

فهرست شکلها

<u>عنوان</u>	<u>صفحه</u>
شکل ۱- طیف جذب ماورای بنفش محلول انالاپریل مالئات.....	۶
شکل ۲- شمای عملکردهای سیستم «رنین - آنژیوتانسین» در حفظ شرایط طبیعی بدن.....	۱۳
شکل ۳- مکانیسم عمل سیستم «رنین - آنژیوتانسین».....	۱۳
شکل ۴- کروماتوگرام انالاپریل.....	۴۲
شکل ۵- رابطه خطی بین غلظت انالاپریل و پاسخ حاصل از روش HPLC.....	۴۲
شکل ۶- کروماتوگرام حداقل غلظت قابل تشخیص انالاپریل.....	۴۳
شکل ۷- منحنی روند زمانی انحلال دارو از فرآورده‌های آزمون و مرجع.....	۴۷
شکل ۸- فرمول ساختمانی اسید هیپوریک.....	۵۲
شکل ۹- کروماتوگرام اسید هیپوریک.....	۶۱
شکل ۱۰- رابطه خطی بین غلظت اسید هیپوریک و پاسخ حاصل از روش HPLC.....	۶۱
شکل ۱۱- کروماتوگرام حداقل غلظت قابل تشخیص اسید هیپوریک.....	۶۲
شکل ۱۲- منحنیهای درصد مهار آنزیم نسبت به زمان به دنبال تجویز فرآورده‌های آزمون و مرجع در داوطلبان سالم.....	۶۵-۶۸
شکل ۱۳- منحنیهای میانگین درصد مهار آنزیم نسبت به زمان به دنبال تجویز فرآورده‌های آزمون و مرجع در داوطلبان سالم.....	۶۹

فهرست جداول

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱۹	جدول ۱- تداخلهای دارویی مهارگرهای ACE
۴۳	جدول ۲- بازیابی مطلق (روش برون تنی)
۴۴	جدول ۳- تغییرهای روزانه (روش برون تنی)
۴۴	جدول ۴- تغییرهای بین روزانه (روش برون تنی)
۴۵	جدول ۵- پایداری ۲۴ ساعته نمونه‌ها (روش برون تنی)
۵۷	جدول ۶- مشخصات سنی و وزنی داوطلبان
۵۸	جدول ۷- میزان پایه فعالیت ACE در داوطلبان
۶۲	جدول ۸- بازیابی مطلق (روش درون تنی)
۶۳	جدول ۹- تغییرهای روزانه (روش درون تنی)
۶۳	جدول ۱۰- تغییرهای بین روزانه (روش درون تنی)
۷۰	جدول ۱۱- پارامترهای فارماکودینامیک در داوطلبان
۷۱	جدول ۱۲- فراهمی زیستی نسبی فرآورده آزمون به مرجع در داوطلبان
۷۴	جدول ۱۳- نتایج آزمونهای آماری

خلاصه

بیماریهای قلبی - عروقی یکی از مشکلاتی فراگیر جوامع انسانی می‌باشند. پرفشار خونی، یکی از بیماریهای یاد شده و نیز زمینه‌ای برای ابتلا به سایر بیماریهای قلبی - عروقی محسوب می‌شود. یکی از سیستمهای تنظیم و تعدیل‌کننده فشار خون، سیستم رنین - آنژیوتانسین است. یکی از عوامل مهم فیزیولوژیک مرتبط با این سیستم، آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) می‌باشد که با تبدیل کردن آنژیوتانسین I به آنژیوتانسین II موجب افزایش فشار خون می‌گردد. داروهای مهارکننده ACE از داروهای رده اول کنترل فشار خون و نیز مورد مصرف در درمان نارسایی احتقانی قلب و انفارکتوس قلبی حاد می‌باشند. انالاپریل یکی از داروهای مهارکننده ACE با ویژگیهای برتر می‌باشد که به فرم پیش دارو بوده، در کبد به فرم فعال خود یعنی انالاپریلات تبدیل می‌شود.

در این پژوهش، هم ارزی زیستی قرص ۲۰ میلی‌گرمی انالاپریل مالئات ساخت شرکت داروسازی دکتر عبیدی با فرآورده دارویی مرجع (قرص ۲۰ میلی‌گرمی Renitec، ساخت شرکت داروسازی MSD اتریش) مورد ارزیابی قرار گرفته است. شایان ذکر است که در هر دو مرحله از این مطالعه، یعنی مراحل برون‌تنی و درون‌تنی، روشهایی جدید، ساده و قابل انجام با صحت، دقت و تکرارپذیری قابل قبول ارائه گردید. جهت ارزیابی برون‌تنی این فرآورده از سیستم HPLC با فاز معکوس استفاده شد و در این راستا، آزمونهای یکنواختی محتوا و انحلال فرآورده‌ها (ی آزمون و مرجع) انجام شد. روش مورد استفاده برای بررسی برون‌تنی این دارو در محدوده غلظتی ۰/۲۵ تا ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر انالاپریل مالئات دارای ارتباط خطی و نیز حایز دقت، صحت و حد تشخیصی مناسب با دوره آزمایش نسبتاً کوتاه (حدود ۱۰ دقیقه) تشخیص داده شد. حاصل آنکه نتایج

آزمونهای برون تنی در محدوده قابل قبول فارماکوپه قرار دارد.

برای انجام ارزیابی درون تنی این فرآورده از روش غیرمستقیم استفاده شد.

در این روش پس از مجاورت نمونه‌های بیولوژیک (سرم) با یک سوبسترای صناعی (HHL)، تعیین مقدار اسید هیپوریک آزاد شده از سوبسترا با استفاده از سیستم HPLC با فاز معکوس صورت گرفت. روش ارائه شده برای بررسی درون تنی دارو در محدوده غلظتی ۰/۲۵ تا ۱ میلی مولار اسید هیپوریک، دارای ارتباط خطی و نیز حایز دقت، صحت و حد تشخیصی مناسب با دوره آزمایش نسبتاً کوتاه (حدود ۱۰ دقیقه) تشخیص داده شد. برای بررسی درون تنی دارو، ۱۶ نفر داوطلب مرد سالم انتخاب شدند و در دوره زمانی متقاطع به فاصله ۱۰ روز، فرآورده‌های آزمون و مرجع به آنها تجویز شده، نمونه‌های خونی آنها مورد بررسی قرار گرفت. سپس پارامترهای فارماکودینامیک دارو ($E =$ درصد مهار ACE توسط دارو) برای ارزیابی غیرمستقیم در نظر گرفته شد. بیشینه مهار ACE توسط دارو بعنوان E_{max} و زمان رسیدن به آن، t_{max} و سطح زیر منحنی درصد مهار آنزیم نسبت به زمان بعنوان AUC در نظر گرفته شدند و موارد فوق در دو فرآورده آزمون و مرجع با هم مقایسه آماری شدند. با بررسیهای آماری انجام شده (با استفاده از آزمون t و آزمون محدوده اطمینان) مشاهده شد که این دو فرآورده در سطح معنی داری ۰/۰۵ با هم تفاوت ندارند و بنابراین هم‌ارز زیستی می‌باشند.

مقدمه

امروزه ابتلا به بیماریهای قلبی - عروقی بعنوان یکی از مشکلاتی فراگیر جوامع انسانی به شمار می‌رود. پر فشار خونی ضمن آن که خود یکی از بیماریهای یاد شده محسوب می‌شود، زمینه ابتلا به سایر بیماریهای قلبی - عروقی را نیز فراهم می‌نماید (۳،۲،۱). از این رو، توجه به ساز و کارهای فیزیولوژیک تنظیم‌کننده فشار خون در درمان این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است.

سیستمهای متعددی در تنظیم و تعدیل فشار خون نقش اساسی بر عهده دارند که یکی از آنها سیستم «رنین - آنژیوتانسین» است (۵،۴،۲).

آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE)، مرتبط با این سیستم و از عوامل مهم فیزیولوژیک در تنظیم فشار خون می‌باشد (۷،۶،۴). این آنزیم یک ترکیب گلیکوپروتئینی متصل به غشا است که در بسترهای مویرگی (عمدتاً در ریه) (۷،۶) و در سلولهای اپیتلیال (در روده و کلیه) و نیز بصورت آزاد و محلول در پلاسما در بدن موجود می‌باشد (۸،۶). ACE با تبدیل کردن آنژیوتانسین I غیرفعال به آنژیوتانسین II فعال موجب افزایش مقاومت عروقی محیطی و در نتیجه سبب بالارفتن فشار خون می‌شود.

گروهی از ترکیبهای دارویی، با مهار ACE موجب کاهش فشار خون می‌شوند و بدین جهت این داروها یعنی مهارگرهای ACE از مؤثرترین عوامل کنترل پرفشار خونی و در زمره داروهای رده اول مورد استفاده در این بیماری محسوب می‌شوند (۸،۴،۳،۲،۱). علاوه بر این، داروهای یاد شده در درمان نارسایی احتقانی قلب (CHF)، انفارکتوس قلبی حاد و آزمونهای تشخیصی کارکرد سیستم رنین - آنژیوتانسین - آلدوسترون نیز کاربرد دارند (۹،۲،۱).

یکی از داروهای مؤثر این دسته، انالاپریل می باشد که با دارابودن ویژگیهای درمانی برتر، امروزه مورد توجه فراوانی قرار گرفته است (۲). انالاپریل یک پیش دازو است که توسط کبد به فرم فعال یعنی انالاپریلات تبدیل می شود و بدین ترتیب اثر درمانی خود را نشان می دهد (۱، ۱۰، ۱۱). از این رو کارآیی فرآورده دارویی فوق برای ایجاد اثر از اهمیت خاصی برخوردار است که بررسی این کارآیی با انجام مطالعه فراهمی زیستی ممکن می گردد.

بررسی فراهمی زیستی یک دارو با در نظر گرفتن عوامل فیزیولوژیک وابسته به بیمار و نیز عوامل فیزیکوشیمیایی مرتبط با شکل دارویی از رهگذر ارزیابی پارامترهای فارماکوکینتیک حاصل از تجویز دارو می تواند ضمن رفع اشکالها و ابهامهای موجود مرتبط با کارآیی فرآورده های دارویی، ما را در طراحی بهتر رژیم درمانی یاری رساند. به دلیل وجود متغیرهای مداخله گر متعدد مرتبط با فراهمی زیستی انالاپریل نظیر سطح پایه ACE، روندهای جذب، توزیع و حذف و بالاخره تأثیر فعالیت کبدی بر میزان تبدیل پیش دارو به دارو، پیش بینی و تفسیر عملکرد درون تنی اشکال دارویی غالباً با مشکل مواجه می گردد.

ویژگیهای فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد انالاپریل شامل بیشینه طیف جذب نوری نامشخص واقع در طول موج پایین، میزان جذب نوری کم، تشابه ویژگیهای جذبی با ترکیبهای درونزا و بالاخره غلظت پلاسمایی نسبتاً کم، طراحی روش مناسب برای تعیین مقدار این دارو را با مشکلاتی همراه نموده است (۱۲، ۱۳). بنابراین طراحی یک روش مناسب از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد.

در این پژوهش، هم ارزی زیستی قرص انالاپریل مالئات ۲۰ میلی گرمی ساخت ایران (شرکت داروسازی دکتر عبیدی) با فرآورده استاندارد مرجع (قرص Renitec ۲۰ میلی گرمی ساخت شرکت MSD اتریش) و عوامل مؤثر بر آن مورد بررسی قرار گرفته است.