مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (7) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

الكشف عن مضادات الهستامين (الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين) في دم أجنة بيض الدجاج المخصب باستخدام طريقة استشراب الطبقة الرقيقة

سهام عجمي وادي ، محمد خالد شندالة
فرع الفسلجة والكيمياء الحياتية والادوية ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

المخلص

ان الهدف من الدراسة الحالية هو الكشف عن ضادات الهستامين (الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين) في دم أجنة بيض الدجاج المخصب في اليوم الثاني عشر من الحضن بجرعة (1ملغم/ بيضة عن طريق الحقن بالفسحة الهوائية) باستخدامطريقةاستشرابالطبقةالرقيقة Thin layer chromatography (TLC)التيتعد من ابسط اشكال تقنيات الاستشراب وهي من الطرق السهلة والنوعية والسريعة للكشف عن الادوية في السوائل البايولوجية وفصل العديد من المركبات العضوية من الاوساط الحيوية عن طريق قياس معدل عامل الاحتباس لهذه الادوية والمركبات . تم الكشف عن الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين فقد كانت قيم معدل عامل الاحتباس بالنسبة للكلورفينيرامين(0,289±) 0,15 ,0,14±0.272 , 0,13±0,285) للاوقات (120,60,30دقيقة) على التوالي وكان لون البقع للعقار ذات لون اصفر براق وهذه النتيجة جاءت مقاربة لقيم معدل عامل الاحتباس للمحلول القياسي للكلورفينيرامين (0,11±0,295)ولون بقعة المحلول القياسي للعقار اصفر براق ,اما بالنسبة للفيكسوفينادين فقد كانت قيم معدل عامل الاحتباس هي (0,11±0,214 , 0,13±0,222 , 0,17±0,219) للاوقات (120,60,30دقيقة) على التوالي وكان لون البقع للعقار ذات لون اصفر براق وهذه النتيجة جاءت مقاربة لقيم معدل عامل الاحتباس للمحلول القياسي للفيكسوفينادين(0,19±0,225) ولون بقعة المحلول القياسي للعقار اصفر براق مما يدل عل وصول ضادات الهستامين الى مجرى الدم في الاوقات السابقة الذكر وكذلك يفسر طبيعة هذه المركبات المحبة للدهون وسرعة امتصاصها من قبل الاوعية الدموية للغشاء اللقانقي المشيمي ووصوله الى مجرى دم اجنة بيض الدجاج المخصب. اكدت نتائج تجربتنا الخاصة بالكشف عن ضادات الهستامين باستخدام طريقة استشراب الطبقة الرقيقة ماتوصلت اليه الابحاث العلمية بأنها طريقة نوعية وسريعة وسهلة الاجراء للكشف عن المركبات الكيميائية .

المقدمة

تعد ضادات الهستامين (Antihistamines) من المركبات التي تعمل بالتنافس مع الهستامين الطبيعي الموجود بالجسم على الارتباط بالمستقبلات الخاصة بالهستامين والتي تشمل (H4,H3,H2,H1) وخاصة المستقبل H1 وتعمل على غلقه مما يؤدي الى توقف ظهور التأثيرات المحدثة بواسطة الهستامين على الجسم مثل الحساسية والالتهاب والحكة [1]. تستخدم ضادات الهستامين سريريا في مجالي الطب البشري والبيطري وذلك بسبب فعلها الضاد للهستامين حيث تعد علاجا فعالا لحالات الحكة المصاحبة للحساسية وفي معالجة التحسس الانفي الفصلي مثل حمى الكلأ والتدمع وحكة العينين ومخاطية الانف والشرى المزمنة والتهاب الملتحمة [2].

تعتبر كل ضادات الهستامين شادات عكسية (Inverse agonist) لمستقبلات الهستامين قسمت ضادات الهستامين الى جيل اول وهي عبارة عن جزيئات صغيرة محبة للدهون وتمتلك هذه المركبات خصائص منها عبورالحاجزالدموي الدماغي (Blood Brain Barreir) وعدم تخصصها للارتباط بمستقبلاتها مثل التثبيط التنافسي القوي للمستقبل الماسكارني (Muscarinic receptor) لذلك تسبب تأثيرات مضادة للحساسية (Anticholenergic effects) وتثبط مستقبل السيروتونين (Serotonin receptor) والالفا ادرينيرجك (Alpha adrenergic receptor) وتسد قنوات الصوديوم (Sodium channels) ومن امثلتها الكلورفينيرامين [3].وللتقليل من تلك التاثيرات الجانبية المذكورة في اعلاه والناتجة من عدم تخصصها لذلك ظهرت مركبات دوائية تابعة للجيل الثاني من ضادات الهستامين مثل التيرفينادين والفيكسوفينادين ,وهي تمتاز بعدم عبورها الحاجز الدموي الدماغي وتخصصها للارتباط بمستقبلات الهستامين [4],وكما هو معروف فقد أثارت ضادات الهستامين الجيل الثاني (التيرفينادين) ضجة كبيرة وذلك لاحداثه وفيات عديدة ناتجة عن احداثه تأثيرات سمية على عضلة القلب لذلك تقرر سحبه من السوق [5–6] واستبدل بمركب الفيكسوفينادين والذي يعتبر من النواتج الايضية للتيرفينادين [7–8–9].

ان أستخدام نموذج اجنة بيض الدجاج المخصب بسبب امتلاكه ميزات عدة منها الحساسية العالية للمركبات الدوائيةبالاضافة الى قلة فترة الحضن والتطور السريع وكونها اقتصادية اكثر ولاتحتاج الى تكاليف التربية والتغذية والعناية و سهولة التعامل معها [10–11].ان الكشف بطريقة استشراب الطبقة الرقيقة Thin chromatography (TLC) layer يعتبر من ابسط اشكال تقنيات الاستشراب Chromatography Techniques[12]. وتعتبر هذه الطريقة طريقة سهلة سريعة وملائمة ورخيصة الثمن وسهلة الاجراء لكشف وفصل العديد من المركبات العضوية من الاوساط الحيوية عن طريق قياس معدل عامل الاحتباس Retention factor (R_f) لهذه المركبات [13–14]. وكذلك تستخدم للتعرف على مدى نقاوة المركبات الدوائية [15–16–17] وتعتمد طريقة الفصل هذه على تفاوت الانتقال لكل من المركبات العضوية خلال وسط هلامي تحت تأثير المادة المذيبة (الطور المتحرك Mobile phase) حيث يتم فيها تبادل المكونات باستمرار بين الطور المتحرك والطور الساكن

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

(Stationary phase)معتمدا على درجة القطبية (Polarity) لكل منهما التي يحصل خلالها التحرك والانتقال ,تنتقل المواد الكيميائية ذات القطبية العالية لمسافات قريبة من خط البداية (Starting line) في حين تنتقل المواد الكيميائية ذات القطبية القليلة او غير القطبية بعيدا عن خط البداية [18].

تكون معظم المواد العضوية إما ذات طبيعة حامضية أو طبيعة قاعدية أوتكون ذات طبيعة متعادلة ,لذا فان هناك مذيبا خاصا لكل منهم يستخدم في هذه التقنية الذي يمثل الطور المتحرك[19] ,وبما ان الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين مواد ذات طبيعة متعادلة وتميل الى الطبيعة القاعدية بعد الاختبارات التي اجريتها عليها لذلك استخدمت المواد المذيبة الخاصة بالمواد ذات الطبيعة القاعدية وذات القطبية القوية والتي تمثل الطور المتحرك والتي هي مزيج من متجانس الامونيا :الميثانول النقي بنسبة 1.5 :100(حجم :حجم) ويتم تصفية الطور المتحرك باستخدام المرشح ذي الفتحات الدقيقة بقطر (0.45 مايكرون) [19–20].

المواد وطرائق العمل

هدف الدراسة: الكشف عنضادات الهستامين (الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين) في دم اجنة بيض الدجاج المخصب في اليوم الثاني عشر من الحضن وبالجرعة (1ملغم /بيضة , عن طريق الحقنبالفسحة الهوائية) باستخدامطريقةاستشرابالطبقةالرقيقة Thin layer chromatography (TLC) .

المحاليل والمواد المستخدمة في التجربة:

1- الميثانول Methanolعالي النقاوة .

2- الامونيا Ammonia.

3- محلول هيدروكسيد الامونيوم ( ) Ammonium hydroxide 2N.

4- الكلوروفورم Chloroform.

5- صفيحة TLC والمغطاة بهلام السليكا وذات الابعاد (10×10 $سم^2$).

6- برمنكنات البوتاسيوم Potassium permanganate (1%).

تحضير محلول هيدروكسيد الامونيوم 2N (NH4 OH): 2N Ammonium hydroxide:

تم تحضير محلول هيدروكسيد الامونيوم (2N)عن طريق تخفيف (31.25مل) من هيدروكسيد الامونيوم (6.4N) الى حد (100مل)باستخدام ماء مقطر ليكون المحلول جاهزا لاجراء التجربة [21].

تحضير المحاليل القياسية للادوية:

تم تحضير المحاليل القياسية Standard solutionsللادوية المراد الكشف عنها وهي الكلورفينيرامينوالفيكسوفينادين وذلك باذابة (1ملغم) من كل عقار في (1مل) من الميثانول وبذلك يكون جاهزا لاستخدامه في التجربة .

تحضير الغشاء اللقانقي المشيمي لاجنة بيض الدجاج المخصب لاجراء التجربة :

استخدم بيض مخصب من نوع روز-308 والتي تم الحصول عليها من مفقس الاخوين في مدينة الموصل وبعمر (5) أيام وتم التأكد من وجود الجنين بواسطة الفحص الضوئي Candling وكان البيض المستخدم (56) بيضة بوزن واحد (2±50) غم، تم متابعة الحضن في الحاضنة التابعة لفرع الفسلجة والكيمياء الحياتية والادوية / كلية الطب البيطري /جامعة الموصل.

وبدرجة حرارة 37 مْ ونسبة رطوبة 60 % حتى يصل الجنين إلى العمر المطلوب لإجراء التجربة (12–15) يوماً من الحضن اذ تكون الأوعية الدموية للغشاء اللقانقي قد وصلت الى مرحلة النضوج الكامل [22–24]. تم عمل فتحة صغيرة في قشرة البيضة وتم تعقيم مكان حقن البيض بالايثانول 70 % تم حقن ضادات الهستامين (الفيكسوفينادين والكلورفينيرامين) (الشركة العامة لإنتاج الأدوية والمستلزمات الطبية / سامراء / العراق) وبجرع (1 ملغم /بيضة عن طريق الفسحة الهوائية) وبحجم جرعة (0,5 مل/بيضة) من خلال الفتحة الصغيرة وتم حقن مجموعة السيطرة بالماء المقطر المعقم وكان مكان الحقن في الفسحة الهوائية للبيضة ، تم إغلاق الفتحة بواسطة شمع البرافين [25] .وجرت عملية الحقن في ظروف معقمة وحُضن البيض داخل حاضنة معقمة وبدرجة حرارة 37 مْ ونسبة رطوبة 60 %وبعد مرور (120,60,30دقيقة)من المعاملة تم اخراج البيض من الحاضنة بحسب المواقيت المذكورة اعلاه ثم ازيل مقطع محدد من قشرة البيضة الخارجية بمساحة 4$سم^2$ باستخدام جهاز ثقب البيض الدوار وبعدها تم سحب الدم من أحد الاوعية الدموية الكبيرة بحجم (0.25 مل) بواسطة انبوب شعريCapillary tube وجمعه في انبوبة اختبار زجاجية خاصة معقمة حاوية على مانع التخثر (الهيبارين) للاحتفاظ بدرجة (4مْ) لمدة (2–3) ساعة لحين الانتهاء من جمع عينات الدم وفي الاوقات المختلفة واجراء التجربة مباشرة ,وقد تمت جميع هذه الخطوات في حجرة الزرع وتحت ظروف معقمة.قسمت مجاميع التجربة الى ثمانية مجاميع مجموعتين سيطرة حقنت بالمحلول القياسي لكل من الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين وبقية المجاميع الست حقنت بالكلورفينيرامين والفيكسوفينادين بجرعة (1ملغم/ بيضة في الفسحة الهوائية) وبعد مرور الاوقات (120,60,30 دقيقة) من المعاملة سحب الدم وحفظ ثم اجراء التجربة وبواقع سبع بيضات لكل مجموعة .

في البداية تم سكب الطور المتحرك (الامونيا المركزبحجم 1.5 :الميثانول بحجم 100) داخل حاوية الاظهار الخاصة ب TLC (Developing container) بحيث يكون ارتفاعه داخل الحاوية اقل من 0.5 سم ,وتغلق الحاوية باحكام لمدة 30–60 دقيقة [12–19]وفي اثناء ذلك يتم استخلاص الادوية الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين من عينات الدم (للمجاميع كلها عدا مجموعتي السيطرة) المراد الكشف عن وجود الادوية فيها ,عن طريق اخذ (0.25 مل) من الدم الموجود في

انبوبة الاختبار الزجاجية الخاصة والمعقمة ويضاف له (0.06 مل) من محلول هيدروكسيد الامونيوم (2N) لتأكيد القاعدية وبعدها يضاف (1.25مل) من الكلوروفورم الذي يعمل على سحب أو استخلاص الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين من الدم المراد الكشف عن وجودهما فيه ,نلاحظ ان المزيج بعد قليل ينفصل تلقائيا الى طبقتين ,السفلى تكون عبارة عن سائل صاف ورائق وهي الطبقة الحاوية على الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين مع الكلوروفورم ,والعليا هي عبارة عن طبقة داكنة حاوية على خلايا الدم والمواد الكيميائية الاخرى ,تهمل هذه الطبقة العليا ويتم أخذ الطبقة السفلى الصافية وتوضع في الحمام المائي بدرجة (45م°) لحين تبخر مادة الكلوروفورم وبقاء الادوية الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين مركزة لوحده كلا على حدة ثم يضاف لكل منها (100)مايكرولتر من الميثانول النقي ويمزج جيدا [12].تم استخدام الأنبوب الشعري الزجاجيوذلك عن طريق غمسه في العينة (السائل الحاوي على الكلورفينيرامين أوالفيكسوفينادين) حيث نلاحظ امتلاءه بالسائل بواسطة الخاصية الشعرية , وبعدها يتم استخدام الصفيحه الخاصة بالاختبار والمغطاة بالسليكا جل (الطور الثابت) وذات الأبعاد 10 x 10 سم (الطول X العرض) [19] ويتم تحديد خط البداية Starting line بقلم الرصاص على مسافة 0.5 سم من الحافة السفلى للصفيحة , بعدها تم إسقاط قطره من السائل الموجود داخل الأنبوب الشعري(20 مايكرو لتر) والذي يعتقد بأنه حاوي على الكلورفينيرامين أوالفيكسوفينادين كلا على حدة وبالأوقات (90,60 , 120) دقيقه من المعامله وكذلك قطرة من المحلول القياسي على أن لايزيد قطر القطره الموضوعه عن 5 ملم وان يكون هناك مسافة كافيه بين قطره وأخرى لتجنب المزج بينهم مع التعليم على مكان كل قطره بقلم الرصاص[26]مباشرة تنقل الصفيحة إلى الحاويه الخاصة ب TLC والحاوية على الطور المتحرك (المذيب) بحيث يكون المذيب أسفل خط البداية مباشرة ولايلامسه ثم تغلق الحاوية بإحكام , حيث نلاحظ استشراب الصفيحة بالمذيب عن طريق الخاصية الشعرية بالاتجاه الأعلى للصفيحةومعتمدا على درجة القطبية آخذا معه الكلورفينيرامين أوالفيكسوفينادين المراد الكشف عنه وكذلك الموجود في المحلول القياسي إلى حين وصول الاستشراب إلى مايقارب ثلاث أرباع ارتفاع الصفيحة و بعدها تم ازاله الصفيحة من الحاوية وتحديد خط انتهاء الاستشراب (مقدمة المذيب)Solvent front بقلم الرصاص وتترك الصفيحة لتجف , وبعدها تم استخدام المادة المثبتة Location reagent (برمنكنات البوتاسيوم 1%) على شكل رش على صفيحة TLC بمرشة خاصة , حيث يلاحظ ظهور بقع دائرية (Spots) صفراء اللون برّاقة تسمى بمناطق المذاب (Solute zones) على مستوى واحد تقريبا والتي تمثل التركيز العالي من الكلورفينيرامين أو الفيكسوفينادين المستخدم وبالأوقات (60 , 90 , 120) دقيقة من المعاملة على الغشاء اللقانقي المشيمي والتي كانت على مستوى مساو تقريبا لبقعة المحلول القياسي , تم تحديد البقع التي ظهرت بالقلم الرصاص وذلك لاختفائها بعد فترة قصيرة من تعرضها للهواء الجوي, تم حساب قيمة معدل عامل

الاحتباس Retention factor(R_f) لكل عينه ومقارنتها مع قيمة معدل عامل الاحتباس للمحلول القياسي وباستخدام المعادلة التالية [12-19-27].

$$\text{معدل عامل الاحتباس } (R_f) = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المذاب (المادة)}}{\text{المسافة التي يقطعها المذيب}}$$

حيث أن لكل مركب كيميائي معدل عامل الاحتباس خاص به وبالاعتماد على قياس معدل عامل الاحتباس للنموذج القياسي للمركب النقي يمكن تحديد ومعرفة نوعية المركب المستخدم على أن لايكون هناك فرق كثير في معدلعامل الاحتباس بين قياس النموذج القياسي وبين النموذج المستخدم. علما إنمعدلR_f لايتجاوز العدد 1 .

التحليل الإحصائي :Statistical Analysis

تم تحليل البيانات إحصائياً باستخدام إختبار التباين One way Analysis Of Variance (ANOVA) تبعه إختبار الفرق المعنوي الأدنى Least Significant Difference وكان مستوى المعنوية لجميع الإختبارات أ < 0,05 [28-30].

النتائج

تم الكشف عن الكلورفينيرامين في دم أجنة بيض الدجاج المعامل بالكلورفينيرامين بجرعة (1ملغم / بيضة ,عن طريق الحقن في الفسحة الهوائية) وكان معدل عامل الاحتباس للاوقات (0.285±0.13,0.272±0.14,0.289±0.15) (120,60,30) دقيقة من المعاملة على التوالي وكان لون البقع للكلورفينيرامين أصفر لكل الاوقات مشابه للون بقعة المحلول القياسي ، وكانت هذه القيم مقاربة لقيم معدل عامل الاحتباس للمحلول القياسي للكلورفينيرامين (0.295±0.11) (الجدول رقم 1) .

تم الكشف عن الفيكسوفينادين في دم أجنة بيض الدجاج المعامل بالفيكسوفينادين بجرعة (1ملغم /بيضة ,عن طريق الحقن في الفسحة الهوائية) وكان معدل عامل الاحتباس للاوقات (0.219±0.17,0.222±0.13,0.214±0.11) (120,60,30)دقيقة من المعاملة على التوالي وكان لون البقع للفيكسوفينادين أصفر لكل الاوقات مشابه للون بقعة المحلول القياسي ، وكانت هذه القيم مقاربة لقيم معدل عامل الاحتباس للمحلول القياسي للفيكسوفينادين (0.225±0.19) (الجدول رقم 2).

الجدول رقم (1) يوضح معدل عامل الاحتباس ولون البقعة للكلورفينيرامين (1ملغم/بيضة,عن طريق الحقن في الفسحة الهوائية) في دم اجنة بيض الدجاج المخصب

المجاميع		معدل عامل الاحتباس	لون البقعة الدائرية
	المحلول القياسي للكلورفينيرامين 0,1	0,11±0,295	اصفر
الكلورفينيرامين 1 ملغم/بيضة	بعد مرور 30 دقيقة من المعاملة	0,15±0,289	اصفر
	بعد مرور 60 دقيقة من المعاملة	0,14±0,272	اصفر
	بعد مرور 120 دقيقة من المعاملة	0,13±0,285	اصفر

القيم تمثل المعدل± الخطأ القياسي بواقع سبع عينات لكل مجموعة

الجدول (2): يوضح معدل عامل الاحتباس ولون البقعة للفيكسوفينادين (1 ملغم/بيضة،عن طريق الحقن في الفسحة الهوائية) في دم أجنة بيض الدجاج المخصب

المجاميع		معدل عامل الاحتباس	لون البقعة الدائرية
	المحلول القياسي للفيكسوفينادين 0,1 %	0,19±0,225	اصفر
الفيكسوفينادين 1 ملغم/بيضة	بعد مرور 30 دقيقة من المعاملة	0,11±0,214	اصفر
	بعد مرور 60 دقيقة من المعاملة	0,13±0,222	اصفر
	بعد مرور 120 دقيقة من المعاملة	0,17±0,219	اصفر

القيم تمثل المعدل± الخطأ القياسي بواقع سبع عينات لكل مجموعة

المناقشة

اظهرت نتائج تجربة استشراب الطبقة الرقيقة (TLC) بان قيم معدل عامل الاحتباس (R_F) للمجاميع المعاملة بالكلورفينيرامين والفيكسوفينادين بجرعة (1ملغم/ بيضة, عن طريق الحقن في الفسحة الهوائية) في الاوقات (120,60,30) دقيقة من المعاملة كانت مشابهة لقيمة معدل عامل احتباس المحلول القياسي للكلورفينيرامين والفيكسوفينادين كذلك لون وموقع البقعة للادوية مما يدلل على وصول الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين الى مجرى الدم في الاوقات السابقة وبذلك تكون قيم معدل عامل الاحتباس في دراستنا الحالية هي للكلورفينيرامين (0,15±0,289, 0,14±0.272 ,0,13±0,285)على التوالي (الجدول رقم 1) متفقة مع ماتوصلت اليه [31] بان معدل عامل الاحتباس للكلورفينيرامين في الجرذان المعاملة بجرعة (4 ملغم/ كغم من وزن الجسم ,عن طريق العضلة) كانت(0.270)وان لون بقعة الكلورفينيرامين كانت ذا لون اصفر براق. اما بالنسبة للفيكسوفينادين فقد كانت قيم معدل عامل الاحتباس هي (0,214±0,11 , 0,222±0,13 , 0,219±0,17) على التوالي (الجدول رقم 2) وان لون بقعة الفيكسوفينادين كانت ذا لون اصفر براق,وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما اشار اليه سوبرانه وجماعته [32] وقد يعود الاختلاف في معدل عامل الاحتباس الى الاختلاف في الظروف المختبرية بالاضافة الى الاختلافات في المذيبات ودرجة نقاوتها.

ان ظهور ضادات الهستامين الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين في دم اجنة بيض الدجاج يفسر طبيعة هذه الادوية المحبة للدهون [33–34] وسرعة امتصاصه من قبل الاوعية الدموية للغشاء اللقانقي المشيمي ووصوله الى مجرى دم اجنة بيض الدجاج المخصب.

ان استخدام طريقة استشراب الطبقة الرقيقة الخاصة بالكشف عن ضادات الهستامين (الكلورفينيرامين والفيكسوفينادين) في دم اجنة بيض الدجاج اكدت ماتوصلت اليه الابحاث العلمية بانها طريقة نوعية وسريعة وسهلة الاجراء للكشف عن المركبات الكيميائية [13–15].

المصادر

1. Bertram G.Katzung,MD. Basic and clinical pharmacol ogy .16thed .,Mc Graw –Hill compa-nies, Inc., United States of America ; 2009: 271-275.
2. Lorenz, P.T.,. Dogs electrocardiography, translated by Rezakhani, A. Shiraz, Shira Z University publication, 2nd Edition; 2000:, 21-25,39-64.
3. Bakker RA;Wieland K; Timmerman H;Leurs R. Constitutive activity of the histamine H1 receptor reveals inverse agonism of .histamine H1receptor antagonists.Eur J Pharmacol:2000 ;387: R5 -7.
4. Simons FER, Akdis CA, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF Jr, Simons FER.Histamine and H1-antihistamines. In: Adkinson NF Jr, Middleton's allergy: principles and practice. 7th ed. St Louis: Mosby (an affiliate of Elsevier Science). 2009: 1517-48.
5. AHFS Drug Information .American Society of Health –System Pharmacists , Bethesda, Md.2000:2-45.
6. Leurs R, Church MK and Taglialatela M (2000). H1antihistamines:inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects .Clin. Expressed Allerge. 2000;32ed:489-498.
7. Salata, J.J., N.K. Jurkiewicz; A.A. Wallace, R.F. III Stupienski. P.J.Jr. Guinosso and J.J.Jr. Lynch. Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1 receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheneramine and pyrilamine. Circ. Res., 1995;76:110-119.

8. Barbey JT, Anderson M,Ciprandi G, Frew AJ, Morad M and Priori SG. Cardiovascular safety of second –generation antihistamines.Am J Rhinol; 1999;13:235-43.
9. Pratt C, Brown AM, Rampe D, Mason J, Russell Tand Reynolds. cardiovascular safety of fexofenadine HCL. Am J cardiol.1999; 83:1451-4
10. Vinardell, M. P. and Mitjans, M. The chorioallantoic menmbrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvent. Toxicol. In Vitro. 2006; 20: 1066- 1070.
11. Bhanushali, M., Bagale, V., Shirode, A., Joshi, Y. and Kadam, V. An in- vitro toxicity testing – reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. Inter. J. Adv. Pharma. Sci. 2010; 1: 15-13.
12. Clarke, E. G. C. Isolation and identification of drugs in pharmaceutical, body fluids and post mortem material, Pharmaceutical press, London.1978 ; 24(1): 43- 58.
13. Dumitrescu, A, I., Stefanescu, E.Toxicological study in case of intoxications with antiemetic drugs .Univer .Anna.Medica.Acien. 2003:1(1)(Abstract).
14. Margoob, M.A., Majid, A., Wani, Z.A., Husain A., Ahmed, M., Ahmed, I., Jehangeer,I., Abbas, Z.,Tanveer, M., Murtaza, I., Dhuha, M and Huda, M. (2004).Thin layer chromatography (TLC) in detection of current nature of drug abuse vin Kashmir .JK-Practitionar.2004; 11:257-260.
15. Renger ,B.,Vegh, Z. and Ferenczi-Fodor, KValidation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. J. Chromatogr. A, 2011;12(18):2712-2721.
16. Kruiswijk, B.Thin layer chromatography visualization reagents, 2005: (http://www.Namedorganiceactions.co.uk/example% 20tlc.pdf).
17. Kale, E., Risha, P. and Layloff, T.h.TLC for pharmaceutical anallysis in resource limited countries. J. Chromatogr, A; 2011; 1218:2732-2736.
18. Pool, C.F. (2003). Thin layer chromatography: challenge and opportunities. J.Chromatogr. A; 1000:2003 963-984.
19. Watson, D.G. Pharmaceutical analysis: A Textbook for pharmacy students and Pharmaceutical Chemists. 2nd ed. University of Strathclyde, Glasgow, UK.; 2005: 316-318.
20. Fried, B. and Sherman, J. Thin-Layer Chromatography, Fourth Edition, revised and expanded, Marcel Dekker Inc., New York - Basel, 1999; 8222- 8247.
21. Aboul-Enein, H. Y., Hefnawy, M.M. and Nakashima, K .Drug monitoring and clinical chemistry handbook of analytical separations, Elsevier, B.V. Amsterdam, Netheralands. 2004;5:15-75.
22. Saw, C.L.L., Olivo, M., Chin,W.W.L., Soo,K.C. and Heng, P.W.S. Transport of hypericin across chick chorioallantoic membrane and photodynamic therapy vasculature assessment. Biol.Pharm. Bull.2005 ; 28 :1054-1060.
23. Vargas, A., Zeisser - Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R. and Delie. F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews.2007; 59 : 1162–1176
24. Pegaz. B., Debefve, E., Ballini. J. P., Wagnieres, G., Spaniol, S., Albrenchi, V., Scheglmann. D. V., Nifantiev, N. A., Van den Bergh, H. and Konan – Kouakou, Y. N. Photothrombic activity of m-THPC – loaded liposomal formulation: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model .Eur J. Pharm .Sci . 2007; 28: 134- 140.
25. Pushpanjali, A. K., Pal, R. L., Parsad,S. K., Singh, A. and Kumar, S. B. J. In ovo embryotoxicity of α- endosulfan adverselyinfluence liver and metabolism and the immune system in chickens pestic. Biochem. Physiol.2005; 82: 103- 114.
26. Al-Abachi, M. Q. and Al- Ghabashi,T.S. (1986). Fundamentals of analytical chemistry .Mosul university press . Mosul. Iraq.1986. 467- 487.
27. Smith, R.M. Before the injection modern methods of sample preparation for separation technique .J.chromatoger A;1000: 2003; 3-27.
28. Runyon, R.P. Non Parametric statistics: A contemporary approach.Addison- Wesley Publishing Co., reading, Massachusetts.1977, 212-217.
29. Petrie, A. and Watson, P. Statistics for veterinary and Animal Sciences. Blackwell Sci , Oxford; 1999. 90-140.
30. Katz, M.H. Bivariate statistics. In: Katz, M.H., ed. Study design and statistical analysis. Cambridge University Press, New York, USA;2006. 66-119.
31.Aljubory, Z.S. H. An investigation and determination of drugs in biological fluids by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. ph. D. Thesis, University of Mosul, Mosul, Iraq; 2012
32. Suprana S.Tandulwadkar,Snehal J.More ,Atul S. Rathore, Ajinkya R. Nikam, Lohidasan Sathiyanarayanan and Kakasaheb R. Mahadik., (2012). Methode Development and validation for the simultaneous determination of Fexofenadine Hydrochloride and Montelukast Sodium in drug formulation using normal phase High-performance Thin–Layer Chromatography ISRN Analytic Chemis - try J Articale ID 2012, 1-7.
33. Bousquet J,Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria. Workshop Group; World Health Organization .Allergic rhinitis and its impact on asthma .J Allergy Clin Immunol.2001;108:147-334.
34. Lachapelle JM, Decroix J, Henrijean A,Roquet – gravy pp, De Swerdtdine A, Boonen H, et al. Desloratadine 5mg once dialy improves the quality of life of patients with chronic idiop- athic urticaia .J Eur Acad Dermatol venereal.2006;20:288-92.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (7) 2016

Detection of Antihistamines (Chlopheneramine and Fexofenadine) in blood of fertilized hens eggs embryos by using Thin Layer Chromatography method

Siham agmee wadee , Mohammad Kailed Shindala
Dep.of Physiology,Biochemistry and Pharmacology, College of Veterinary Medicine,Uni. of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The aim of the present study was to detect the of antihistamines (Chlorpheneramine and Fexofenadine) in blood of fertilized hens eggs embryos at 12^{th} day of incubation in doses (1mg/ egg injection into air sell) by using thin layer chromatography method (TLC). TLC method cosider simplest form of chromatography techniques and cosider simple,rapid and qualitative technique to identification of drugs in a biological fluids and separation of some organic compoundsfrom living media by estimation arange of retention factor to the drugs and compounds.deteced about Chlorpheneramine and Fexofenadine, the retention factor of Chlorpheneramine (0.289±0.15, 0.272±0.14, 0.285± 0.13) at (30, 60, 120 minute) respectively the color of spot is bright yellow this result is approach to the value of retention factor of standerd solution of Chlorpheneramine (0.295±0.11) and the colore of spot is bright yellow,While the retention factor of fexofenadine (0.214±0.11, 0.222±0.13, 0.219±0.17) at (30,60,120 minute) respectively the colore of spot is bright yellow this resulte is approach to the value of retention factor of standerd solution of Fexofenadine (0.225±0.19) and the color of spot is bright yellow this indicate on fact the antihistamines drugs reached to blood supply during this time and also discussed the nature of this drug of highy lipid solubility and fast absorption by blood vessles of chorioallantoic membrane and reached to blood supply of fertilized hens eggs embryos.The result of current study to detected the antihistamines by using thin layer chromatography (TLC) demonstrated the result of scentific research about TLC metod described here is simple and rapid qualitative technique to identification of chemical compounds .