١١٦.٩٥

دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ی شیمی تجزیه

عنوان

اندازه‌گیری همزمان تعدادی از تیوپورینها به روش اسپکتروفوتومتری در نمونه‌های آنزیمی با استفاده از روشهای کالیبراسیون چند متغیره و آنالیز فاکتوری

اساتید راهنما

دکتر محمدحسین سرورالدین　　دکتر محمدرضا رشیدی

استاد مشاور

دکتر عبدالحسین ناصری

پژوهشگر

محمدیاسرخانی

اطلاعات مدارک علمی پژوهشی
شعبه مدارک

۱۳۸۸/۶/۱۱

۱۱۶۰۹۵

تیرماه ۸۸

تقدیم به:

خانواده عزیزم

مخصوصاً

پدر و مادر مهربانم

با تشکر و سپاس فراوران از :

• اساتید راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد حسین سرورالدین و جناب آقای دکتر محمد رضا رشیدی که در طول دوره از محضر علمی و اخلاقی ایشان بهره مند بوده ام و همواره از راهنمائی های ارزنده شان استفاده کرده ام.

• استاد مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر عبدالحسین ناصری که از همکاری های علمی ایشان در انجام این پایان نامه بهره برده ام.

• استاد محترم جناب آقای دکتر محمد امجدی که امر داوری این پایان نامه را تقبل نموده اند.

• مدیریت محترم گروه شیمی تجزیه جناب آقای دکتر کریم اسدپور زینالی.

• اساتید محترم گروه شیمی تجزیه دانشکده شیمی و اساتید محترم گروه شیمی داروئی دانشکده داروسازی بخصوص جناب آقای دکتر عسگری که در دوران تحصیل همواره از محضر علمی و اخلاقی ایشان بهره برده ام.

• ریاست محترم دانشکده شیمی جناب آقای دکتر نمازی، معاونت محترم پژوهشی دانشکده شیمی جناب آقای دکتر نیائی و معاونت محترم آموزشی دانشکده شیمی جناب آقای دکتر خاندار.

• دوستان و همکاران ارجمندم در آزمایشگاه شیمی تجزیه محیط زیست دانشکده شیمی آقایان مسعود سعادتی، حاج مرتضی ایرانی‌فام، امین ایمانی، کاوه امینی، محمد فداکار، مجتبی کریمی، رضا فداکار، مشهدی جواد حسن زاده، مهدی پرتوی، جواد ولی پور و خانم خوش‌مرام و آزمایشگاه شیمی داروئی دانشکده داروسازی و تمامی دوستانی که در به ثمر رسیدن این پایان نامه همکاری داشتند.

• خانواده عزیزم که همواره در طول زندگی از حمایت های بی دریغ ایشان برخوردار بوده ام.

نام خانوادگی دانشجو: خانی **نام:** محمدیاسر

عنوان پایان نامه : اندازه‌گیری همزمان تعدادی از تیوپورینها به روش اسپکتروفوتومتری در نمونه‌های آنزیمی با استفاده از روشهای کالیبراسیون چند متغیره و آنالیز فاکتوری

اساتید راهنما: دکتر محمد حسین سرورالدین دکتر محمد رضا رشیدی

استاد مشاور: دکتر عبدالحسین ناصری

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** شیمی **گرایش:** تجزیه **دانشگاه:** تبریز

دانشکده: شیمی **تاریخ فارغ التحصیلی:** تیر ۸۷ تعداد صفحه:۶۳

کلید واژه ها: ٦-مرکاپتوپورین، ۸-اکسو-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید، اسپکتروفتومتری، *PLS*، *PCR*، *HPLC*

چکیده:

٦-مرکاپتوپورین یک ضدمتابولیت با فعالیت ضد سرطانی است و برای معالجه بیماری لوسمی استفاده می گردد. ٦-مرکاپتوپورین می تواند وارد مسیر کاتابولیسم شود که در آن دارو به فرم های غیرفعال تبدیل می شود. در این مسیر، ٦-مرکاپتوپورین از طریق حدواسط های ۸-اکسو-٦-مرکاپتوپورین یا ٦-تیوگزانتین به ٦-تیویوریک اسید اکسید می گردد. برای مطالعه مسیر متابولیسم یک دارو مانند مسیر متابولیسم اکسیداتیو ٦-مرکاپتوپورین، بایستی تمام ترکیبات نمونه آنالیز گردد. اندازه‌گیری همزمان چند ترکیب در محیط های بیولوژیکی، بویژه وقتی ویژگی های آنالیتیکی آنها شبیه همدیگر باشد، می تواند کار سختی باشد.گزانتین اکسیداز *(XO)* یک اکسیدوردوکتاز حاوی مولیبدن است. این آنزیم در متابولیسم ترکیبات متعددی ازجمله پورین ها مشارکت دارد.

هدف این مطالعه توسعه روش اسپکتروفوتومتری ساده برای اندازه گیری همزمان ٦-مرکاپتوپورین و سه متابولیت آن، ۸-اکسو-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ٦-تیویوریک اسید در محلول های سنتزی و پلاسمای انسانی با استفاده از روش های حداقل مربعات جزئی *(PLS)* و رگرسیون مولفه های اصلی*(PCR)* می باشد. به منظور تائید و ارزیابی نتایج بدست آمده از روش‌های *PCR* و *PLS*، روش *HPLC* نیز استفاده گردید و نتایج این روشها مقایسه گردید. صحت روش نیز با استفاده از نمونه های اسپایک شده بررسی گردید و مقادیر بازیافت بدست آمده نیز رضایت بخش می باشند. از مزیت های آشکار روش های پیشنهادی سادگی روش تیمار و اندازه گیری و نیز هزینه پایین روش های *PLS* و *PCR* می باشد.

علاوه بر این، از روش تفکیک منحنی چندمتغیره-حداقل مربعات متناوب *(MCR-ALS)* و *HPLC* برای بررسی مسیر متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین به ٦-تیویوریک اسید و احتمال حضور ۸-اکسو-٦-مرکاپتوپورین و ٦-تیوگزانتین به عنوان حدواسط در این مسیر استفاده گردید و مشخص شد که اکسیداسیون ٦-مرکاپتوپورین به ٦-تیویوریک اسید توسط گزانتین اکسیداز بدون گذر از حدواسط انجام می پذیرد.

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱ مسیر احتمالی کاتابولیسم ٦-مرکاپتوپورین توسط گزانتین اکسیداز ٦

شکل ۳-۱ منحنی تغییرات جذب ٥ میکرومولار ٦-مرکاپتوپورین(λ max=325nm) ... ۳۰

شکل ۳-۲ طیف های جذبی محلول های استاندارد ٥ میکرو مولار ٦-مرکاپتوپورین(6MP) ... ۳۲

شکل ۳-۳ نمودار کالیبراسیون ٦-مرکاپتوپورین(λ max=325nm) ... ۳۳

شکل ۳-٤ کروماتوگرام ٦-مرکاپتوپورین(6MP)، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین(8H6MP) ... ۳٦

شکل ۳-٥ کروماتوگرامهای حاصل از تزریق پلاسمای اسپایک شده با ٦-مرکاپتوپورین(6MP) ... ۳۷

شکل ۳-٦ نمودار کالیبراسیون بدست آمده از اندازه گیری ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ... ۳۸

شکل ۳-۷ نمودار PRESS برای ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ... ٤۳

شکل ۳-۸ نمودار PRESS برای ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ... ٤۳

شکل ۳-۹ طیف های متوالی ثبت شده از محلول واکنش متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین به غلظت ٥۰μM ... ٤۸

شکل ۳-۱۰ طیف های متوالی ثبت شده از محلول واکنش متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین به غلظت ٥۰μM ... ٤۹

شکل ۳-۱۱ پروفایل غلظتی داده های متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین(٥۰μM) به ٦-تیویوریک اسید ... ٥۰

شکل ۳-۱۲ کروماتوگرام حاصل از متابولیسم ۵۰ میکرومولار ٦-مرکاپتوپورین توسط آنزیم... ۵۳

شکل ۳-۱۳ کروماتوگرام حاصل از متابولیسم ۵۰ میکرومولار ٦-مرکاپتوپورین توسط آنزیم... ۵٤

شکل ۳-۱٤ کروماتوگرام حاصل از متابولیسم ۵۰ میکرومولار ٦-مرکاپتوپورین توسط آنزیم... ۵۵

شکل ۳-۱۵ کروماتوگرام حاصل از متابولیسم ۵۰ میکرومولار ٦-مرکاپتوپورین توسط آنزیم... ۵٦

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۳-۱ داده های تجزیه ای نمودار کالیبراسیون در اندازه گیری اسپکتروفتومتری ... ۳٤

جدول ۳-۲ داده‌های تجزیه‌ای نمودار کالیبراسیون در اندازه‌گیری HPLC ... ۳۹

جدول ۳-۳ مشخصات غلظتی مجموعه کالیبراسیون ٤۰

جدول ۳-٤ نتایج حاصل از اندازه‌گیری نمونه‌های سنتزی بااستفاده از روش‌های PLS و PCR ٤٤

جدول ۳-۵ مقادیر پارامترهای آماری ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین،٦-تیوگزانتین و ... ٤٤

جدول ۳-٦ اعداد شایستگی برای روش های PLS وPCR ٤٦

جدول ۳-۷ بازیافت ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ٦-تیوبوریک اسید ... ٤٦

جدول ۳-۸ اعداد شایستگی MCR-ALS برای بررسی متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین ۵۱

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل ۱ : مقدمه و بررسی منابع	
۱-۱- اهمیت اندازه گیری داروها	۱
۱-۱-۱- نیاز برای آنالیز بیوفارماسوتیک	۱
۱-۱-۲- مطالعات میزان دسترسی زیستی و بیواکی والانسی	۱
۱-۱-۳- توسعه داروهای جدید	۱
۱-۱-٤- فارماکوسنتیک پزشکی و تحقیق در محیط های بیولوژیکی	۲
۱-۲- آنزیم گزانتین اکسیداز	۲
۱-۳- ترکیبات و داروهای وابسته به تیوپورینها	۳
۱-۳-۱- فارماکولوژی تیوپورینها	٤
۱-۳-۲- نقش آلدهید اکسیداز و گزانتین اکسیداز در اکسیداسیون پورینها	٥
۱-۳-۳- متابولیسم تیو پورین ها	٦
۱-٤- روش های کمومتریکس	۷
۱-٤-۱- انواع روش های کمومتریکس	۸
۱-٤-۲- روش های کالیبراسیون چند متغیره	۹
۱-٤-۳- رگرسیون خطی چند متغیره(*MLR*)	۱۱
۱-٤-٤- رگرسیون اجزاء اصلی(*PCR*)	۱۲
۱-٤-٥- حداقل مربعات جزئی(*PLS*)	۱۲
۱-٤-٦- تفکیک منحنی چندمتغیره-حداقل مربعات متناوب(*MCR-ALS*)	۱٦
۱-٤-۷- مفهوم سیگنال خالص آنالیت و روش هایی بر اساس آن	۱۷
۱-٥- کاربرد روش های کمومتریکس در بررسی واکنش های آنزیمی	۱۸
۱-٦- روشهای اندازه گیری تیوپورینها	۱۸
۱-۷- هدف از کار پژوهشی حاضر	۲۱
فصل ۲ : مواد و روش ها	
۲-۱- مواد مورد نیاز	۲۲
۲-۲- دستگاهها و نرم افزار های مورد استفاده	۲۲

۲-۳- روش تهیه آنزیم از کبد موش صحرایی و خوکچه‌ی هندی ۲۳

۲-٤- طرز تهیه محلول ها ۲٤

۲-٥- طرز تهیه بافر *سورنسون*(*pH*=۷) ۲٤

۲-٦- بررسی تاثیر *pH* بر روی طیف‌های جذبی و شدت جذب ۲٤

۲-۷- روش های کالیبراسیون برای اندازه گیری ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین به روش اسپکتروفوتومتری ۲٥

۲-۸- روش‌های کالیبراسیون با استفاده از تکنیکهای *PLS* و *PCR* در اندازه گیری اسپکتروفوتومتری همزمان ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین ۲٥

۲-۹- شرایط جداسازی ٦-مرکاپتوپورین ،٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین با استفاده در روش *HPLC* ۲٦

۲-۱۰- اندازه‌گیری ٦-مرکاپتوپورین ،٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین به روش *HPLC* ۲٦

۲-۱۱- اندازه گیری همزمان ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین در داخل پلاسمای خون انسان با استفاده از روش های کالیبراسیون چند متغیره ۲۷

۲-۱۲- آماده سازی پلاسمای اسپایک شده با تیو پورینها برای اندازه گیری همزمان ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین با استفاده از روش *HPLC* ۲۸

۲-۱۳- بررسی مکانیسم متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین به وسیله‌ی آنزیم گزانتین اکسیداز موجود در کبد موش صحرایی وخوکچه‌ی هندی و مطالعه‌ی حد واسط‌های احتمالی ۲۸

فصل ۳ : بحث و نتیجه گیری

۳-۱- نتیجه گیری و بحث در ارتباط با شرایط و داده های تجزیه ای اندازه‌گیری انفرادی ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین، ٦-تیویوریک اسید و ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین به روش اسپکتروفوتومتری و *HPLC* ۳۰

۳-۱-۱- بهینه‌سازی *pH* وتاثیر *pH* روی شدت جذب و شکل طیف های جذبی ۳۰

۳-۱-۲- ویژگیهای طیفی ماوراءبنفش ، ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ۳۱

٦-تیوگزانتین و ٦-تیوریک اسید

۳-۱-۳- مشخصات تجزیه‌ای در اندازه‌گیری ٦-مرکاپتوپورین، ۳۲
۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦ -تیوگزانتین و ٦-تیوریک اسید

۳-۲-۱- اندازه گیری ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین ۳۵
و ٦-تیوریک اسید با استفاده از روش *HPLC*

۳-۲-۲- مشخصات تجزیه‌ای در اندازه‌گیری ٦-مرکاپتوپورین، ۳۷
۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ٦-تیوریک اسید به روش *HPLC*

۳-۲-۳- داده‌های تجزیه‌ای و پارامترهای آماری ٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین ۳۸
۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، و ٦-تیوریک اسید با استفاده از روش *HPLC*

۳-۳-۱- طراحی ترکیبات غلظتی نمونه‌های کالیبراسیون و پیش‌بینی در اندازه‌گیری همزمان ۳۹
٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و
٦-تیوریک اسید با استفاده از روش‌های *PLS* و *PCR*

۳-۳-۲- استفاده از روش معتبرسازی تقاطعی و نمودار *PRESS* برای تعیین تعداد فاکتورهای ٤۱
معنی‌دار

۳-۳-۳- اندازه‌گیری نمونه‌های سنتزی بااستفاده از روش‌های *PLS* و *PCR* ٤٤

۳-۳-٤- اندازه‌گیری ٦-مرکاپتوپورین، ۸-هیدروکسی-٦-مرکاپتوپورین، ٦-تیوگزانتین و ٤٦
٦-تیوریک اسید با استفاده از روش‌های *PLS* و *PCR* و *HPLC* در پلاسمای
انسانی

٤-٤-بررسی متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین به وسیله‌ی آنزیم گزانتین اکسیداز کبد موش صحرایی ٤۸
و خوکچه‌ی هندی و مطالعه‌ی حد واسط‌های احتمالی

٤-٤-۱- بررسی متابولیسم به وسیله‌ی *MCR – ALS* ٤۸

٤-٤-۲- اعداد شایستگی *MCR-ALS* برای بررسی متابولیسم ٦-مرکاپتوپورین ۵۰

٤-٤-۳- بررسی متابولیسم٦-مرکاپتوپورین توسط فراکسیون کبدی موش صحرایی و ۵۲
خوکچه‌ی هندی به وسیله‌ی روش *HPLC*

نتیجه گیری ۵۸

پیشنهادات ۵۹

منابع ٦۰

فصل اول:

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- اهمیت اندازه گیری داروها

۱-۱-۱- نیاز برای آنالیز بیوفارماسوتیک[۱]

روشهای اندازه گیری داروها در محیط های بیولوژیک اهمیت فراوانی دارند. مسائل مربوط به بیواکی‌والانسی، دسترسی زیستی، توسعه داروهای جدید، استفاده غیر مجاز دارو، داروسازی پزشکی و تحقیقات دارویی عمدتا به روش های آنالیز بیوفارماسوتیک (مطالعه ویژگی های شیمیایی و فیزیکی داروها) وابسته اند. نقش آنالیز بیوفارماسوتیک در هریک از این حوزه ها در بخش های بعدی بررسی شده است.

۱-۱-۲- مطالعات میزان دسترسی زیستی و بیواکی والانسی

در گذشته میزان دسترسی زیستی (سرعت و شدت جذب دارو ها از سیستم های تحویل دارو)داروها مورد تاکید قرار نگرفته بود. لیکن امروزه مشخص شده است که فاکتور فرمولاسیون میتواند دسترسی زیستی داروها را در پستانداران تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین تعیین میزان دسترسی زیستی بوسیله اندازه گیری سطح خونی داروها بعد از استفاده از دزهای دارویی رایج شده است. این آنالیزها امکان ارائه گرافیکی میزان دسترسی را می دهند و باید توجه داشت که اطلاعات بیواکی والانسی و میزان دسترسی زیستی داروها بدون روش شناسی تجزیه ای و همچنین اندازه گیری درست داروها در محیط های بیولوژیکی امکان پذیر نیست.

---

[۱]-*Biopharmacutic*

۱-۱-۳- توسعه داروهای جدید

مسائل مربوط به میزان دسترسی داروها و وضعیت بیولوژیکی داروها به منظور توسعه داروهای جدید اهمیت زیادی دارند. همچنین، اگر میزان جذب دارو بعد از مصرف دهانی پایین باشد و یا نیمه عمر آن در بدن کم باشد، از لحاظ عملی مزیتی ندارد. وقتی که تعیین انواع اطلاعات کمی موردنیاز باشد روشهای اندازه گیری داروها در مایعات بیولوژیکی اهمیت زیادی می یابند. بررسی متابولیسم داروها می تواند در رسیدن به داروهای جدید موثر باشد و همچنین در تعیین مکانیسم عملکرد بسیاری از داروها نقش مهمی را ایف نمایند. همانند بررسی میزان دسترسی زیستی، مطالعات تبدیل زیستی داروها نیز بطور وسیعی به آنالیز فارماسوتیک وابسته است.

۱-۱-٤- فارماکوسنتیک پزشکی و تحقیق در محیط های بیولوژیکی

یک تعداد از داروهای ضروری دارای شاخص های درمانی پایینی هستند. که درآن میزان دز درمانی/دز سمی کمتر از ۱۰ می‌باشد. در حقیقت برای برخی ازداروها مانند تئوفیلین و دیگوکسین، اگر سطح خونی آنها بیش از دو برابر غلظت درمانی دارو شود، اثرات جانبی شدیدی را نشان می دهند و وقتی بیماران از این داروها استفاده می کنند با مشکلات جدی مواجه می شوند و این مسئله نیزاهمیت آنالیزهای بیوفارماسوتیک را نشان می‌دهد.

بسیاری از علوم با عملکرد داروها در محیط های بیولوژیکی در ارتباط هستند و علاوه بر این تحقیقات زیادی وجود دارند که اجرای آن نیاز به اندازه گیری داروها به خصوص در مایعات زیستی است.

۱-۲- آنزیم گزانتین اکسیداز[۱] (XO)

گزانتین اکسیداز یک آنزیم اکسیداز و یک فلاوو آنزیمی می باشد که شامل یک اتم مولیبدن و چهار مرکز گوگرد-آهن به عنوان گروه پروستتیک می باشد و از آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز می-باشد[۱]. گزانتین اکسیداز آنزیم غیراختصاصی می باشد که در اغلب جانداران به طور وسیع به ویژه شیر گاو و کبد گوساله به میزان زیادی وجود دارد. این آنزیم با گونه‌هایی که خاصیت الکترون دهندگی دارند واکنش داده و واکنش‌های صورت گرفته می تواند در شرایط هوازی و بی‌هوازی کاتالیز گردد. این آنزیم در متابولیسم ترکیبات گوناگونی از جمله پورینها مشارکت دارد. همچنین کاربرد بیوسنسورهای حاوی گزانتین اکسیداز بصورت تجاری بسیار توسعه یافته است[۲]. همچنین گزانتین اکسیداز در متابولیسم داروهای مختلف از جمله آلوپورینول، ٦- دی اکسی اسیکلوویر ، ٦- مرکاپتوپورین و..... نقش مهمی را ایفا می کند. علاوه بر این، آنزیم گزانتین اکسیداز در بیماریهای بالینی از جمله بیماریهای مرتبط با متابولیسم پورین ها از قبیل *Xanthinuria* و *Hyperuricaemia* ، نقرس، جراحات بافتی همراه با بیماریهایی از قبیل حمله قلبی و تپش قلبی و نیز متابولیسم ترکیبات شیمیایی مختلف نقش اساسی را دارد[۳].

۱-۳- ترکیبات و داروهای وابسته به تیوپورینها

در سال ۱۷۷٦یوریک اسید ازسنگ مثانه جداسازی گردید. اگرچه شناسایی ساختار آن تا صد سال دیگر صورت نگرفت لیکن این واقعه بعدا باعث شد که نام عمومی پورین برای سیستم های هتروسیکل استفاده گردد. گزانتین و هیپوگزانتین به عنوان اعضای دیگر این سیستمها به ترتیب در

---

[۱] -*Xanthine oxidase*

سال ۱۸۳۸ و ۱۸۵۰ شناسایی گردیدند. در سال ۱۸۸۰واژه "نوکلئیک اسید" توسط آلتمان[۱] معرفی گردید و روش‌های عمومی برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک از منابع متفاوت بوسیله این محقق توسعه یافت. سپس پورینها و پیریمیدینها دراسیدهای نوکلئیک کشف و از اسیدهای نوکلئیک در سال ۱۸۹٤جداسازی گردید[٤-٥].

دراوایل دهه ۱۹٤۰، اولین مطالعات روی ترکیبات پورینی به عنوان آنتی متابولیتها توسط هاچینگ[۲] و همکارانش [٦] صورت گرفته است که درآن ۸-آزاگوانین و ۲،٦-دامینوپورین بخاطر فعالیت ضد سرطانی قابل ملاحظه آنها تحت مطالعه قرار گرفته اند. پس از آن، ٦-مرکاپتوپورین سنتز و مشخص شد که داروی ضد لوسمی (سرطان خون) قدرتمندی می باشد. این کشف نقش مهمی را در توسعه عامل های ضدسرطان وایمنی داشت .ترکیبات زیادی از این به بعد تهیه گردید که درآنها حلقه پورینی واستخلافهای حلقه اصلاح گردیدند. مشخص شده است که بیشتر آنالوگهای ضدتومور و ضدویروس به یک عامل فعال تبدیل می شوند که درداخل بدن به ریبونوکلئوتیدها مبدل می‌گردد.آزاتیوپورین مشتق دیگر ٦-مرکاپتو پورین است که به عنوان بازدارنده ایمنی[۳] برای پیش گیری و یا به تاخیر انداختن دفع پیوند استفاده می گردد.

۱-۳-۱- فارماکولوژی تیوپورینها

٦-مرکاپتوپورین وآزاتیوپورین داروهای پورینی هستند که در موقعیت کربن ٦ خود دارای استخلافهای گوگرددار می باشند. اگرچه این داروها بیش از چهل سال است که مورد استفاده قرار

---

۱ -Altman
۲ -Hitching
۳ -immunisuppressant

می گیرند، اما بسیاری از جنبه‌های متابولیسم و فارماکولوژی پیچیده آنها هنوز مبهم باقی مانده است[۷].

۶-مرکاپتوپورین توسط الیون[۱] و همکارانش در سال ۱۹۵۲به عنوان عامل ضدتومور سنتز گردید. درسال ۱۹۵۳ بطورموفقیت‌آمیزی برای مداوای لوسمی در انسان استفاده شد. امروزه از ۶-مرکاپتوپورین و متوترکسات[۲] برای مداوای لوسمی لنفوستیک حاد کودکان بخصوص برای مواردی که دوره طولانی برای بهبود نیاز است، استفاده می گردد [۸].

میزان دسترسی ۶-مرکاپتوپورین بعد از مصرف آن درانسان کم و خیلی متغیر می باشد. مکانیسم این دسترسی تا حالا مشخص نگردیده است. اما ممکن است ترکیبی از تفاوت های سرعت جذب، واجذب، حذف و متابولیسم مربوط به عبور اول دارو باشد. بعد از ۶-مرکاپتوپورین، آزاتیوپورین سنتز گردید که شاخص درمانی بالاتر از ۶-مرکاپتوپورین را داشت.

۱-۳-۲- نقش آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز در اکسیداسیون پورینها

پورینها سوبسترای خوبی برای گزانتین اکسیداز می باشند. در مقایسه با ترکیبات N-هتروسیکلیک دیگر، اکسیداسیون پورین ها شامل حمله هسته دوستی در اتم کربن با کمبود الکترون می باشد که معمولا نزدیک به اتم نیتروژن حلقه می باشد. اگرچه واکنش، از نوع هیدروکسیلاسیون است، محصول واکنش تمایل زیادی به توتومریزاسیون به فرم لاکتام دارد. ازآنجائیکه سه اتم کربن الکترون دوست وجود دارد اکسیداسیون کاتالیز شده توسط مولیبدنیوم هیدروکسیلازها متابولیتهای استخلاف شده در موقعیت های ۲،۶و۸ حلقه‌ی پورینی می‌دهد[۹].

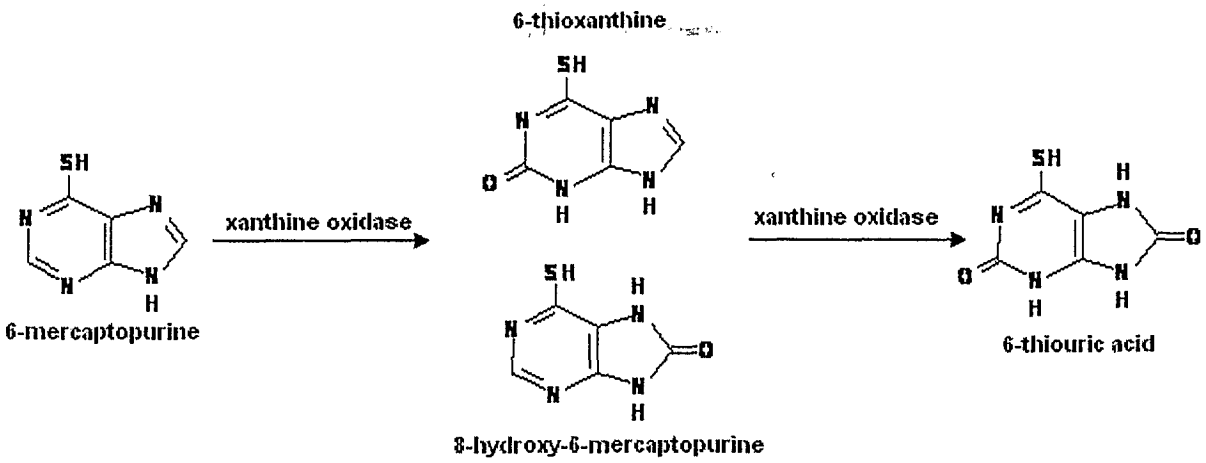
---

۱ - Elion
۲- Methoterexate

١-٣-٣- متابولیسم تیوپورین ها

٦-مرکاپتوپورین ممکن است هم وارد مسیرهای کاتابولیک و هم وارد مسیرهای آنالولیک شود. مسیر آنابولیکی مسئول تبدیل ٦-مرکاپتوپورین به فرم‌های فعال است، در حالیکه در مسیر کاتابولیک، دارو از طریق دو مرحله آنزیمی به فرم های غیر فعال تجزیه می گردد. مسیر دوم حدس زده می شود که شامل اکسیداسیون اولیه ٦-مرکاپتو پورین به ٨-اکسو-٦-مرکاپتوپورین و سپس تبدیل به ٦-تیویوریک اسید باشد[١٠]. زیم[1] و همکارانش وجود ٦-تیوگزانتین را در نمونه ادرار بعضی از مریض هایی که ٦-مرکاپتوپورین را از طریق تزریق داخل وریدی دریافت نموده بودند،نشان دادند، که نشان دهنده‌ی تبدیل ٦-مرکاپتوپورین از طریق حدواسط ٦-تیوگزانتین به ٦-تیویوریک اسید است. غیر فعال سازی اکسایشی ٦-مرکاپتوپورین به گزانتین اکسیداز موجود در کبد و مخاط روده نسبت داده می شود و نیز مطالعاتی حضور٨-اکسو-٦-مرکاپتوپورین در مسیر اکسیداسیون ٦-مرکاپتوپورین را مشخص کرده اند. از آنجاییکه وجود حدواسط های احتمالی در مسیر اکسیداسیون ٦-مرکاپتوپورین به وضوح گزارش نشده است روشن نمودن مسیر متابولیسم نیاز به بررسی دارد(شکل١-١)[١٢-١١].

[1] -Zimm



شکل ۱ مسیر احتمالی کاتابولیسم ٦-مرکاپتوپورین توسط گزانتین اکسیداز

آزاتیوپورین می تواند تحت دو مسیر متابولیسم متفاوت قرار گیرد. در مسیر اول ابتدا آزاتیوپورین بطورعمده به ٦-مرکاپتوپورین تبدیل می شود، سپس ٦-مرکاپتوپورین تولید شده، طبق مسیرهای گفته شده متابولیزه می گردد. در مسیر دوم، آزاتیوپورین ممکن است بطور مستقیم توسط آلدئید اکسیداز به ۸-اکسو-آزاتیوپورین کاتالیز گردد و در ادامه اکسیداسیون ۸-اکسو-آزاتیوپورین بوسیله گلوتاتیون ۸-اکسو-٦-مرکاپتوپورین را می دهد که ممکن است بعدا به بوسیله گزانتین اکسیداز به ٦-تیویوریک اسید اکسید شود[۱۰].

۱-٤- روش های کمومتریکس

با رشد و تکامل سریع دستگاههای مورد استفاده در شیمی، حجم اطلاعات تولید شده در آزمایش‌ها به حدی رسید که نیاز به روش‌هایی جهت کاهش داده ها و استخراج داده‌های مفیدتر را آشکار ساخت. با پیشرفت علوم کامپیوتری در دهه‌های اخیر و بکارگیری ریاضی، آمار پیشرفته و کامپیوتر در شیمی، شاخه‌ای جدید به نام کمومتریکس بوجود آمد[۱۳]. برای اولین بار واژه کمومتریکس توسط سوانت ولد، که یک شیمی فیزیک دان بود مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه

سوانت ولد و شیمی تجزیه دان آمریکایی به نام کوالسکی مقدمات تاسیس انجمن بین المللی کمومتریکس(*ICS*)[۱] را فراهم آوردند[۱٤]. کمومتریکس در جنبه‌های دیگری شیمی مانند شیمی دارویی و بیوشیمی، بخصوص در طراحی داروها با استفاده از برقراری رابطه ما بین ساختار شیمیایی و داروهای مورد نظر استفاده گردیده است[۱۵]. فرانک و کوالسکی در سال ۱۹۸۲ کمومتریکس را کاربرد آمار، ریاضی و کامپیوتر در طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی و برقراری ارتباط مابین نتایج آزمایش و همچنین استخراج اطلاعات از داده‌های‌آزمایشگاهی‌تعریف کردند[۱٦]. در سال ۱۹۹۱ از نظر مالینوسکی کمومتریکس علمی برای استفاده از روش‌های آماری و ریاضی به منظور کنترل، تفسیر و پیش بینی داده‌های شیمیایی تعریف گردید[۱۷].

۱-٤-۱- انواع روش های کمومتریکس

نمونه‌برداری، اندازه‌گیری و تفسیر نتایج مراحل اصلی یک فرایند تجزیه ای را تشکیل می دهند و تفسیر نتایج با استفاده از روش‌های اصلی کمومتریکس که شامل تحلیل واریانس، طراحی آزمایش و مدل سازی می باشد، صورت می گیرد. روشهای کمومتریکس معمولا به به دو دسته کلی زیر تقسیم می شوند:

الف- تکنیک های مدل سازی سخت[۲] :

این روش ها ارتباط بین پاسخ آزمایش و متغیرها را مشخص می کنند و با استفاده از اطلاعات موجود در سیستم های شیمیایی، مدل ریاضی برای آن سیستم ها طراحی می گردد و در ادامه با بدست آوردن پارامترهای معادله و استفاده از آنها اطلاعاتی از سیستم مورد مطالعه بدست می آید.

۱- International Chemometrics Society
۲ -Hard Modeling