

۱۰۹۸

دانشگاه تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه :

برای دریافت درجه دکتری

موضوع :

کنترل میکروبیولوژی ویتامین ب<sub>۱۲</sub> در فرآورده های

دارویی

برای عننائی :

استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمود رفیع زاده

نگارش :

اسماعیل شب انکیز

سال ۱۳۵۰ - ۵۱

شماره پایان نامه ۱۸۵۰



۱۰۹۸

این پایان نامه زیر نظر جناب آقای دکتر  
سیروس یزدانی تدوین گردیده است.

۱۰۹۱

صفحه	فهرست مطالب	موضوع
۱	-----	۱ - تاریخچه
۲		۲ - شیعی ویتامین B <sub>12</sub>
۶		۳ - فعالیت کوانزیمی و عمل بیولوژیکی B <sub>12</sub>
۹		۴ - کمبود ویتامین B <sub>12</sub>
۳		۵ - منابع ویتامین B <sub>12</sub>
۱۴		۶ - احتیاج به B <sub>12</sub>
۱۴		۷ - بیوسنتز
۳۵		۸ - تعیین مقدار B <sub>12</sub> روشهای دردسترس
۴۳ و ۴۴		۹ - تعیین مقدار بروش میکروبیولوژیک با استفاده از

U.S.F. روش Lactobacilus Leishmania

۱۰ - تهیه نمونه مورد آزمایش ، اعمال فیزیکی و شیمیایی و تهیه نمراتهای اختصاصی.

و تهیه محلولهای مورد نیاز

فصل دوم :

کارهای انجام شده ، برای تعیین مقدار

۶۵	۱ - درجه بندی الکترو فتومتر
۷۰	۲ - بدست آوردن مناسبترین غلظت برای محلول استاندارد
۷۱	۳ - آزمایش های تعیین مقدار نمونه های کپسول ، آمپول ، شربت .

بقیه فهرست مطالب

ردیف	موضوع	صفحه
۴ -	توضیح و محاسبه و تعیین مقدار و رسم منحنی های مربوطه .	۷۶
	فصل سوم :	
۸۳	کارهای انجام شده برای بررسی اثر نیازن روی دژاژ میکربی	
۸۵	آزمایش مقدار ماتی	
۸۶	آزمون T	
۸۹	آزمون $\chi^2$	
۹۰	آزمایش تأثیر نیازن باغلظت های متغیر در حضور ویتامین باغلظت ثابت	
۹۵	آزمایش تغییر مقدار رشد میکربی با تغییر مقدار ویتامین و ثابت بودن مقدار نیازن	
۹۶	آزمایش تغییر مقدار رشد میکربی با تغییرات مشابه و همان ویتامین و نیازن	
۹۸	رسم منحنی استاندارد	
۱۰۰	بررسی نتیجه حاصل از آزمایش های انجام شده با توجه به شکل منحنی های بدست	

آ. د .

## فصل اول

—————

معرفی :

پس از سالها کار متداول فاکتور ضد اتمی پرنسیوز عصاره جگر (که بعنوان

درمان کلینیکی مصرف میشد) در سال ۱۹۴۸ بوسیله ریکس و ساگرد انش (1)

واسمیت (2) جدا گردید. سایر محققین روی ترکیبات مشابه نهد رسایر فرآورد هها

یافت میشد مخالفه کرده بودند.

" فاکتور پروتئینی حیوانی " این فاکتور باعث رشد بیشتر حیواناتیکه تحت رژیم

پروتئین های گیاهی بودند میگردد و در مواردی مانند ، عصاره ماهی و پهن گاو-

یافت میشد و مشابه ترکیب جدا شده از عصاره بنگر بود.

پیش رفت سریع در جدا کردن ویتامین B<sub>12</sub> منجر به کشف این مطلب گردید که ماده

فعال را بوسیله کروماتوگرافی میتوان جدا کرد.

فعالیت ویتامین B<sub>12</sub> ضمن خال زردن بوسیله کنترل میکروبیولوژیک بررسی میشد.

در سال ۱۹۴۸ اعلان این خبر که یک ترکیب بلوری بنام B<sub>12</sub> وقتی با دوز بسیار

کم به مریض داده شود علائم آنمی پرنسیوز را تخفیف میدهند. سروصدای -

---

1- Rickes

2- Smith

عظیمی در جهان بر اه انداخت و شاید کشف هیچ ویتامین دیگری این چنین

توجه وسیع جهانی را بخود جلب نکرده باشد .

این گزارشات پس از کشف ترکیبی بنام فاکتور ضد آنمی پرنسیوز در جگر که هم جنبه

هماتولوژیک و هم جنبه نورولوژیک بیماری را بهبود می بخشد ، سر و صد ا را با وج خود

رسانید .

تقریباً ۱۶ سال بعد یعنی در سال ۱۹۶۴ دکتر دروتی هاچکین ( ۹۱۲ )

بخطار کار منحصر بفرد یکه بکمک اشعه X در سالهای ۱۹۵۰ و بعد از آن انجام

داده و منجر به شناسائی ساختمان ویتامین B<sub>۱۲</sub> گردید جایزه نوبل در شیمی

را دریافت کرد .

شیمی ویتامین B<sub>۱۲</sub>

بلورهای سیانوکوبالامین بدون مزه و بی بو است . یک گرم آن در ۸۰ میلی لیتر آب در

حرارت آزمایشگاه حل میشود و یک محلول خنثی تولید میکند . ماده خالص در الکل

کاملاً " محلول و در اثر اترواستن غیر محلول است .

محلول آبی سیانوکوبالامین دارای سه جذب ماکزیمم است ۲۷۸ و ۳۶۱ و ۵۵۰ میلی

مو با ضریب خاموشی (  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  ) بترتیب ۱۱ و ۱۰۷ و ۶۴۹ ملگول کوبالامین

در حدود ۳۵ / ۴ درصد کبالت دارد . وزن ملکولی آن ۱۳۵۵ بر اساس فرمول

-----  
(9-12) Dr. Dorothy Hodgkin

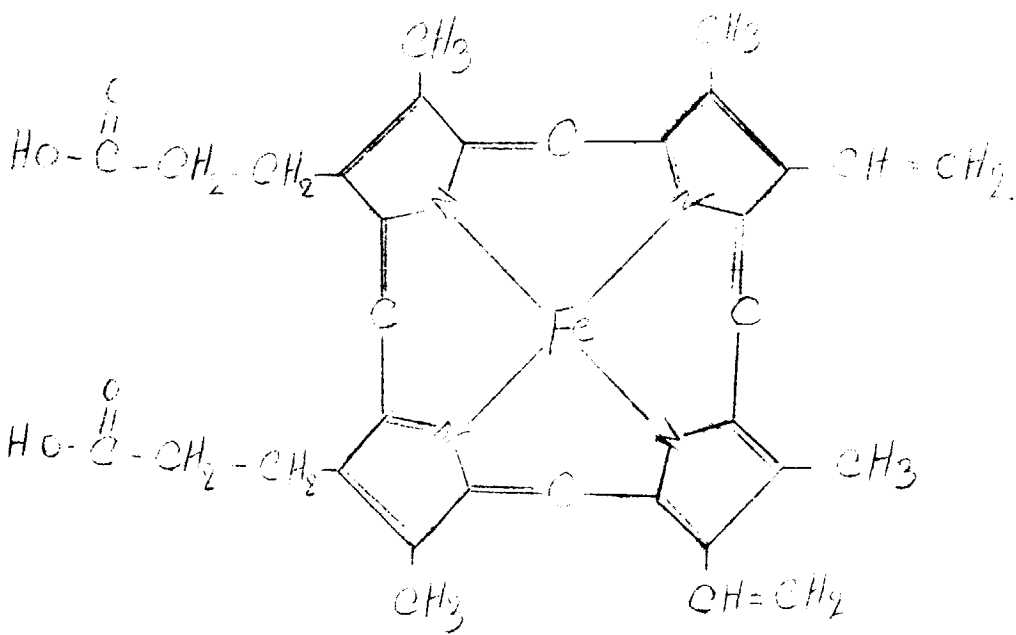
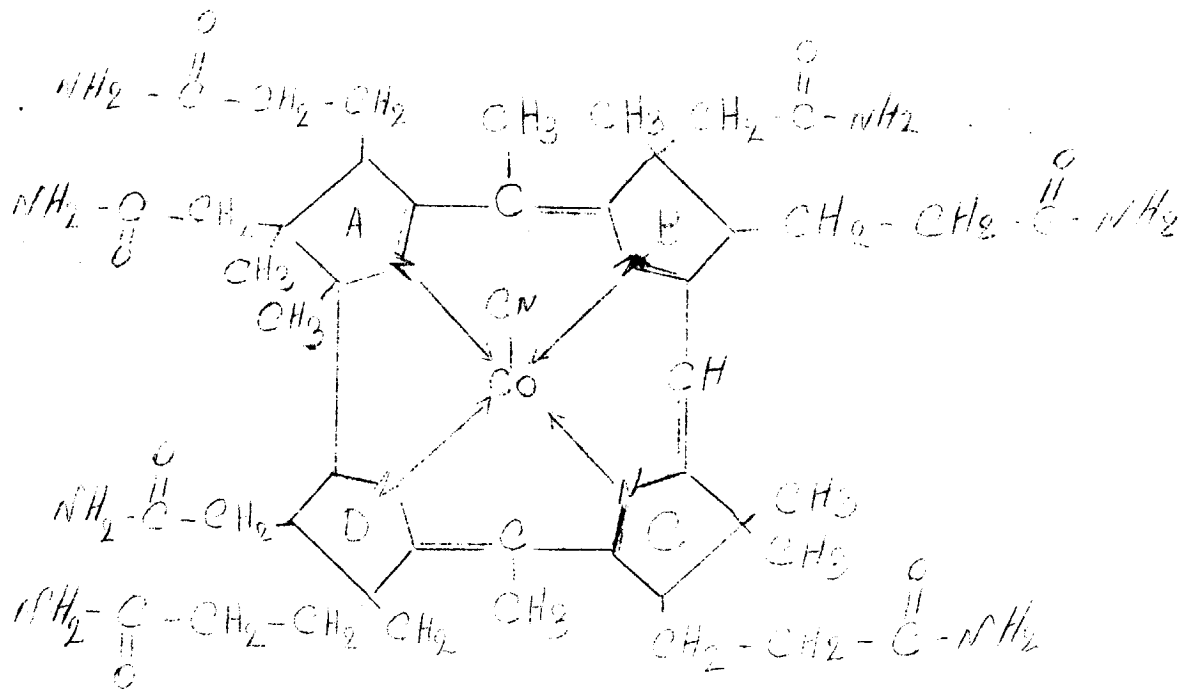
نشان داده شده میباشد ( شکل ۱ )

گروه ویتامین B<sub>۱۲</sub> شامل تعداد زیادی ترکیبات اند که دارای يك ساختمان عمومی میباشند . این ساختمان شامل يك حلقه پیریمین شکل و يك اتم کبالت در مرکز آن حلقه است . این هسته توسط يك زنجیر کربن با يك اتصال پپتیدی به آمینوپروپانول متصل است . که این آمپتو پروپانول به ملکول فسفات متصل میگردد و فسفات نیز از طریق ناحیه ۳ - ریبوز به آن متصل میشود ، همچنین ریبوز به يك بنزایپ میدازول با يك پورین متصل است .

اتم کبالت دارای عدد کوانتاسیون ۶ است ، يك اتصال ککورد بنانس با گروه CN - ، يك اتصال با ازت پیرول و يك اتصال نیز با ازت ۶ و ۵ دیامتیل بنزایمیدازول .

تشابه سیانوکوبالامین با پورفیزین نائبال است . در ویتامین B<sub>۱۲</sub> تنهایی تفاوت با پورفیزین ها مشاهده میشود که در کمپلکس { حلقه D و حلقه A و بعضی يك پل متنی ( = CH - ) مستقیماً با يك اتصال ساده بهم وصل شده اند . ( شکل ۲ )

تشابه بین حاصل هیدرولیز ویتامین B<sub>۱۲</sub> و سایر پیورفیرین های معمولی رابطه بین این دو نوع ترکیب را نشان میدهد .



شکل ۲ - مقایسه سیتوکرومین با پورفیرین ها



مشتقات دیگری از ویتامین B<sub>۱۲</sub> فعال وجود دارد که گروپمان سیانور در آنها بوسیله گروپ های دیگر جانشین شده و ترکیباتی نظیر سیدروکسی کبلا لامین . کلروکوبالامین ، نیتروکوبالامین و یتوسیانوکوبالامین را بوجود آورد هاند . تمام این ترکیبات در مجاورت سیانور به سیانوکوبالامین تبدیل میشوند .

#### فعالیت کوآنزیمی و عمل بیوفیزپولوژیکی B<sub>۱۲</sub>

بسیاری از میکرو اورگانیزم ها برای رشد به ویتامین B<sub>۱۲</sub> احتیاج دارند . از جمله لاکتوباسیل ها نسبت به کمبود ویتامین B<sub>۱۲</sub> کاملاً "حساس" میباشند و این کمبود از رشد آنها جلوگیری بعمل میآورد . احتیاج بعضی از باکتریها به ویتامین B<sub>۱۲</sub> از طریق سنتز بوسیله متیونین و یکی از شبه کوبالامین ها برآورده میشود . برخی میکرو اورگانیزم ها میتوانند ویتامین B<sub>۱۲</sub> را بیش از احتیاج خود سنتز نمایند .

فاکتور پروتئینی حیوانی ( A.P.F. )<sup>\*</sup> تا قبل از کشف ویتامین B<sub>۱۲</sub> بعنوان يك ماده اصلی غذایی در رشد حیوانات آزمایشگاهی شناخته میشد ولی بعد از کشف ویتامین B<sub>۱۲</sub> ثابت شد که این جسم دارای فعالیت زیاد در رشد بوجه است . این ویتامین برای رشد بسیاری از حیوانات آزمایشگاهی و حیوانات غیر نشخوار کننده اهلی ضروریست . همچنین يك فاکتور اساسی در تغذیه انسان است .

\* A.P.F. = Animal Protein Factor.

مخصوصاً ویتامین B<sub>۱۲</sub> در بسیاری از واکنش‌های متابولیکی دخالت دارد این طرز عمل یعنی دخالت در واکنش‌های متابولیکی در اغلب موارد روشن نیست و اختلاف نظر همان قابل ملاحظه‌ای نسبت به آن وجود دارد.

یک فرم کوآنزیمی B<sub>۱۲</sub> ، ۶۹۵ دی متیل بنزایمیدازول کوبالامید کوآنزیم است که مانند ویتامین B<sub>۱۲</sub> می‌باشد، بجزاینده در محل رادیکال CN - اتم کبالت به آدنین - نوکلئوزید متصل شده است. قند مربوطه ه - د زوکسی - ریبوز می‌باشد و اتصال بین کبالت و کربن ه - است ( 3 )

این کوآنزیم کاتالیزر سیستم آنزیمی می‌باشد که ایزومریزاسیون متیل مالونیل کو-آنزیم A رابه سوکسینیل کوآنزیم A در متابولیسم پستانداران و میکروارگانیسم‌ها کاتالیز کرده و همچنین ایزومریزاسیون متیل آسپاراتات رابه گلوتمات در میکروارگانیسم‌ها انجام می‌دهد.

یکی دیگر از کوآنزیم ویتامین B<sub>۱۲</sub> دارای یک گروه مان متیل متصل به اتم کبالت در محل د زوکسی آدنوزین نوکلئوزید است این کوآنزیم در تشکیل میتونین از هموسیستئین در حضور N<sup>5</sup>-متیل ویا FH<sub>4</sub> و سایر عوامل شرکت می‌کند.

بعضی را عقیده بر این است که متیل B<sub>۱۲</sub> کوآنزیم، یک فرم واسطه‌ای در انتقال گروه متیل می‌باشد، این کوآنزیم همچنین در متیلاسیون حلقه پورین در

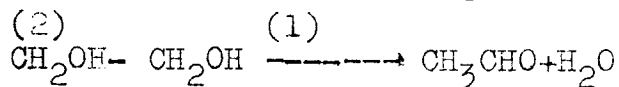
سنتز تیامین شرکت می‌کنند .

ویتامین B<sub>12</sub> در متابولیسم کلاسترول ، بیوسنتز پورنیرین و سایر متابولیسم ها نیز شرکت دارد . یکی دیگر از اعمال کوآنزیمی که آمینو آنزیم ها شرکت در متابولیسم ۲۵۱ گلاپکول ها می‌باشد .

آبلز و سایر محققین (4) نشان دادند که عصاره بدو سلول آئروباکتر آئروژنز- که با زغال مجاور شده قابلیت کاتالیزری خود را در تبدیل اتیلن گلی کول به استالئید و پروپان دی اول به پروپیون الدئید از دست می‌دهد ، در اثر مجاورت عصاره با کوآنزیم کوآمید مجدداً تمام فعالیت خود را بازمی یابد .

مطالعات بیشتر بوسیله محققین نشان داد که واکنش آنزیماتیک مبنی بر انتقال

نید روژن از کربن C<sub>1</sub> به C<sub>2</sub> و از دست دادن یک ملکول آب می‌باشد .



مطالعات دقیق تر روی آنزیم ، که دی ال نشید را ز نامیده میشود نشان داد که

هیدورکسی کوبالا مین و سیانو کوبالا مین ، این همیپتورهای این آنزیم هستند

واکنش داخلی بخصوصی بین آنزیم و کوآنزیم فرض میشود و چنین تصور میگردد

که این عمل بستگی به فعالیت کاتالیتیکی داشته باشد .

## کمبود ویتامین B<sub>۱۲</sub>

جانسون ( 5 ) متدهائی برای ایجاد کمبود ویتامین B<sub>۱۲</sub> در شوکتها ، بوجهها و موشها مورد بررسی قرار داده است . در یک رژیم "Soya-Protein Synthetic Milk" در شوکتها علامت کمبود ویتامین B<sub>۱۲</sub> ظاهر میگردد . که توام با رشد کم ، پیدایش عناصر غیر طبیعی در شوکتها بالاخره مرگ حیوان است . از این عوارض با اضافه نمودن ویتامین B<sub>۱۲</sub> به رژیم غذائی میتوان جلوگیری بعمل آورد .

سهولت ایجاد کمبود ویتامین B<sub>۱۲</sub> در شوکتها جوان باعث شده از این حیوان در مطالعه راههای متابولیکی که ویتامین B<sub>۱۲</sub> در آن نقشی دارد استفاده - شود .

موشها و بوجهها نیز به رژیم های کمبود ویتامین B<sub>۱۲</sub> حساس هستند ، در آنها نیز رشد کم میشود و در موشها علاوه بر آن پاهای فلج دارند میشوند و پرفیرین\* ویسکر توسعه می یابد .

در نشخوارکنندگان متابولیسم B<sub>۱۲</sub> به کبالت موجود در غذای آنها بستگی دارد . در انسان کمبود غذائی ویتامین B<sub>۱۲</sub> نادر است . در یک بررسی علامت کمبود

---

\* Porphyrinwisker

ویتامین ۱۲ B در اشخاصیکه از رژیم فاقد محصولات حیوانی تغذیه می‌کردند دیده شده است. رابطه بین ویتامین ۱۲ B و آنمی پرنسیوز انسانی و سایر امراض مورد توجه است.

کاستل و سایرین ( 6 ) چند سال قبل پیشنهاد کرد که رآنمی پرفسیوز کمبود و عامل جذب نظر میکند .

یک عامل شخصی\* یا فاکتور معدی\*\* و یک عامل خارجی یا فاکتور تغذیه\*\*\*. چنین تصور میشود که و فاکتور با هم ترکیب شده و آنچه را که برای رشد گلبولهای قرمز خون مورد نیاز است ایجاد می‌کند. اکنون ثابت شده است که عامل خارجی کاستل ویتامین ۱۲ B میباشد .

فاکتور شخصی یک کوکوپروتئین با وزن ملکولی کم است که بنامور محمولی در شیر مده وجود دارد. از آنجائیکه ویتامین ۱۲ B در فقدان فاکتور شخصی جذب نمی‌گردد ، آنمی پرنسیوز بدلت فقدان این عامل میباشد .

مکانیسمیکه طبق آن فاکتور شخصی موجب جذب میگردد هنوز روشن نیست. بهر حال چنین تصور میشود که فاکتور شخصی ویتامین را از کمپلکس پروتئینی طبیعی

\*. Intrinsic Factor (I.F.)

6. Castle

\*\* . Stomach Factor (S.F.)

\*\*\*. Food Factor (F.F.)

که با پروتئین های حیوانی دارد جدا میکند. فاکتور شخصی موجب جذب ویتامین  
 راد رسلولهای مونسال بکمک پاک فاکتور از شیر رود که فاکتور رهاکننده نامیده  
 \*  
 میشود فراخ می کند .

هربرت ( 7 ) منبع این فاکتور را در موش مطالعه کرده و دریافت که این منبع نزدیک  
 انتهای رود کوچک است.

این موضوع معلوم شده است که فاکتور معدنی در گونه های مختلف حیوانات اختصاصی  
 است ولی خوشبختانه فاکتور معدنی خوراکی انسان عمل مشابهی را دارا میباشند .  
 در دوزهای بالا ویتامین B<sub>12</sub> بدن وجود فاکتور معدنی در انسان جذب میشود  
 ولی نه بآن مقدار که غذای معمولی وجود دارد .

دوزهای کم غیر ضروری (تزیستی) در حالات کمبود بسیار موثرند .

بعد از جذب در خون ویتامین B<sub>12</sub> به پروتئین های پلاسمات متصل میشود و ممکن  
 است با شکل فعال متلفی منتشر شود . این پروتئین تبدیل به کوآنزیم شده

بدون غمزه در کبد ذخیره میشود . متادیر کم ویتامین B<sub>12</sub> در خون اش را

سالم وجود دارد . تغییرات مقداری آن در خون وسیع است . در حدود . . . میلی میکروگرم

\* Releasing Factor. 7. Herbert.

تا چند صد میلی میکرو میلی لیتر خون پیدا شده است. ولی در اشخاص مبتلا به آنمی

گرم گرم در هر

پرنسیوز از این مقدار کمتر و تا حد ۱ / ۰ میلی میکرو گرم در میلی لیتر وجود دارد .

مدفوع اشخاص مبتلا به آنمی پرنسیوز پس از تجویز B<sub>۱۲</sub> خوراکی در صورتیکه

فاکتور محدودی داده نشود حاوی مقدار پیرزادی از ویتامین B<sub>۱۲</sub> میباشد .

یک نوع فاکتور محدودی با قدرت زیاد که از مخاط پیلور و دوازده تهیه شده به طور کلی نیکی

دارا قدرت در سطح ۳ / ۰ میلی گرم است. یعنی میتواند جذب ویتامین B<sub>۱۲</sub> را

در بیماران مبتلا به آنمی پرنسیوز تا این سطح بالا ببرد . وزن ملکولی آن حدود

پنج هزار است. این ماده دارای ده درصد نیتروژن و کمتر از سه درصد گلوکز آمین

است. ظرفیت اتصال آن به ویتامین B<sub>۱۲</sub> در لوله آزمایش\* برابر سه میکرو گرم

از ویتامین B<sub>۱۲</sub> برای هر میلی گرم بدست آمده است. چنین بنظر میرسد در دیگر

فاکتور شخصی اثر جذب ویتامین B<sub>۱۲</sub> بوسیله بافتها باشد .

فرآورده های فعال ویتامین B<sub>۱۲</sub> که همراه با فاکتور شخصی میباشد باعث میشوند

که جذب ویتامین B<sub>۱۲</sub> در بافتها، جگر افزایش می یابد و آزمایش های با جگر

پرفوزین شده جذب B<sub>۱۲</sub><sup>60</sup> - ۰۰ بمقدار کمی انجام میگردد ولی در حضور فاکتور

شخصی جذب بمقدار سرسام آوری افزایش می یابد .

سربیتول ( قند الکلی آنالوگ گلوکز ) جذب B<sub>۱۲</sub> را در انسان افزایش میدهد .

\* Invitro.