دانشکده شیمی

گروه شیمی تجزیه

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ی شیمی تجزیه

عنوان

اندازه گیری همزمان فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین*N*-اکسید در نمونه های آنزیمی به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از روش های کالیبراسیون چند متغیره و آنالیز فاکتوری

اساتید راهنما

دکتر محمد حسین سرورالدین **دکتر محمد رضا رشیدی**

استاد مشاور

دکتر عبدالحسین ناصری

پژوهشگر

کاوه امینی

اسفند۸۷

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

و برادرم کیوان

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 که در دوران تحصیل همواره از محضر علمی و اخلاقی ایشان بهره برده ام.

- اساتید گرانقدر گروه های شیمی فیزیک، شیمی آلی، شیمی معدنی و شیمی کاربردی.

- 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 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: امینی **نام:** کاوه

عنوان پایان نامه: اندازه گیری همزمان فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین *N*–اکسید در نمونه های آنزیمی به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از روش های 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:** اسفند ۸۷ تعداد صفحه: ۸۰

کلید واژه ها: فنانتریدین، فنانتریدینون، فنانتریدین *N*–اکسید، اسپکتروفتومتری ، *PLS*، *PCR*، برازش چند متغیره

چکیده:

اندازه گیری مواد سرطانزا و سمی در محیط های مختلف به ویژه در محیط های بیولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار بوده است. همچنین بررسی سینتیک آنزیم ها بهترین وسیله جهت درک برهمکنش های بیولوژیک در سطح مولکولی است. بدیهی است دسترسی به روش هایی حساس و دقیق برای مطالعه سینتیک آنزیمی در گرو توسعه روش های حساس و دقیق برای اندازه گیری سوبسترای آن آنزیم و متابولیت حاصله از واکنش آنزیم و سوبسترا می باشد.

آلدئید اکسیداز *(AO)* یک مولیبدوفلاووآنزیم می باشد که غالبا در کبد تولید می شود و در متابولیسم بسیاری از گزنوبیوتیک های فارماکولوژیک و توکسیکولوژیک دخالت دارد.گزانتین اکسیداز *(XO)* نیز یک اکسیدوردوکتاز حاوی مولیبدن است. این آنزیم در متابولیسم ترکیبات متعددی ازجمله پورین ها مشارکت دارد.

هدف از کار پژوهشی حاضر، ارائه یک روش حساس و دقیق اسپکتروفتومتریک، جهت اندازه گیری همزمان سه ترکیب سمی و سرطانزای فنانتریدین، فنانتریدینون، فنانتریدین *N*–اکسید در پلاسمی خون انسان اسپایک شده با این ترکیبات با بکارگیری روش های حداقل مربعات جزئی*(PLS)* و رگرسیون مولفه های اصلی*(PCR)* می باشد. اندازه گیری همزمان فنانتریدین، فنانتریدینون، فنانتریدین *N*–اکسید در مخلوط با ثبت طیف های جذبی در محدوده ۳۵۵–۲۱۰ نانومتر انجام شد. بازیافت‌های بدست آمده برای فنانتریدین، ۱۰۳–۹۶ درصد، برای فنانتریدینون، ۱۰۱–۹٤ درصد و برای فنانتریدین *N*– اکسید، ۱۰۵–۹۳ درصد می باشد.

همچنین از روش تفکیک منحنی چندمتغیره-حداقل مربعات متناوب *(MCR-ALS)* برای بررسی مسیر متابولیسم فنانتریدین به فنانتریدینون و احتمال حضور فنانتریدین *N*–اکسید به عنوان حدواسط در این مسیر استفاده و مشخص شد که اکسیداسیون فنانتریدین به فنانتریدینون با *AO* بدون گذر از حدواسط و بطور مستقیم انجام می پذیرد.

در نهایت یک روش بر اساس برازش چند متغیره برای بررسی سینتیک *AO* با استفاده از فنانتریدین به عنوان سوبسترا توسعه داده شد. از جمله محاسن این روش نسبت به روش لینویور– برک استفاده از فقط یک غلظت اولیه سوبسترا و عدم نیاز به منطقه جذبی انتخابی می باشد. برای نشان دادن کارائی روش پیشنهادی برای بررسی سایر سیستم های آنزیمی، سینتیک *XO* نیز با استفاده از سوسبترای گزانتین و نیز سینتیک متابولیسم ٦–دی اکسی پن سیکلوویر که توسط هر دو آنزیم*AO* و*XO* متابولیته می گردد توسط این روش مطالعه شد که نتایج بدست آمده همخوانی خوبی با نتایج روش لینویور– برک داشت.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل ۱ : مقدمه و بررسی منابع	
۱- اهمیت، منابع، جداسازی، تخلیص و طبقه بندی آنزیم ها	۱
۱-۱-۵- مولیبدنیم هیدروکسیلازها	۴
۱-۱-۶- آلدئید اکسیداز (AO)	۵
۱-۱-۷- گزانتین اکسیداز(XO)	۶
۱-۱-۸- اندازه گیری فعالیت آنزیم و سینتیک واکنش های آنزیمی	۷
۱-۲ -آزارین ها	۹
۱-۳- روش های اندازه گیری فنانتریدین و متابولیت های آن	۹
۱-۴- روش های کمومتریک و کاربرد آنها در بررسی واکنشهای آنزیمی	۱۰
۱-۴-۱- کلیات	۱۰
۱-۴-۲-دسته بندی روشهای کمومتریک	۱۱
۱-۴-۳- تحلیل به مولفه های اصلی(PCA)	۱۲
۱-۴-۴- تفکیک مقدار منفرد(SVD)	۱۳
۱-۴-۵- روشهای کالیبراسیون چند متغیره	۱۳
۱-۴-۶- رگرسیون چند گانه خطی(MLR)	۱۴
۱-۴-۷- حداقل مربعات کلاسیک(CLS)	۱۴
۱-۴-۸- حداقل مربعات معکوس(ILS)	۱۵
۱-۴-۹- رگرسیون مولفه های اصلی(PCR)	۱۶
۱-۴-۱۰- حداقل مربعات جزئی(PLS)	۱۶
۱-۴-۱۱-تفکیک منحنی چندمتغیره-حداقل مربعات متناوب($MCR\text{-}ALS$)	۱۶
۱-۴-۱۲- مفهوم سیگنال خالص آنالیت و روش هایی بر اساس آن	۱۹
۱-۴-۱۳-کاربرد روش های کمومتریک در بررسی واکنش های آنزیمی	۲۰
۱-۵ - هدف از کار پژوهشی حاضر	۲۱
فصل ۲ : مواد و روش ها	
۲-۱- مواد مورد نیاز	۲۳
۲-۲- دستگاه ها و نرم افزارهای مورد استفاده	۲۳
۲-۳- روش تهیه‌ی مولیبدنیم هیدروکسیلازهای نسبتا خالص	۲۴
۲-۴- طرز تهیه‌ی محلولها	۲۵
۲-۵- بهینه‌سازی pH برای اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتریک فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدینN- اکسید	۲۶
۲-۶- اندازه‌گیری فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدینN- اکسید به روش	۲۶

اسپکتروفوتومتری	
۲-۷- روش‌های کالیبراسیون با استفاده از تکنیک‌های PLS و PCR در اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتری همزمان فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدینN- اکسید	۲۶
۲-۸- روش استفاده از برازش چند متغیره در بررسی سینتیکی واکنش‌های مختلف آنزیمی	۲۷
۲-۹- روش بررسی مکانیسم متابولیسم فنانتریدین به وسیله‌ی آنزیم آلدئیداکسیداز و مطالعه‌ی حد واسطهای احتمالی	۲۸
۲-۱- اندازه گیری ثوابت سینتیکی اکسیداسیون فنانتریدین توسط آلدئیداکسیداز	۲۸
فصل ۳ : بحث و نتیجه گیری	
۳- ۱- اندازه‌گیری همزمان فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N- اکسید با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری	۳۰
۳-۱-۱- بهینه‌سازی pH	۳۰
۳-۱-۲ ویژگیهای طیفی ماوراءبنفش فناتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدینN-اکسید	۳۱
۳-۱-۳- مشخصات تجزیه‌ای اندازه‌گیری فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N- اکسید	۳۳
۳-۱-۴- طراحی ترکیبات غلظتی نمونه‌های کالیبراسیون و پیش‌بینی در اندازه‌گیری همزمان فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N- اکسید با استفاده از روش‌های PLS و PCR	۳۸
۳-۱-۵- تعیین تعداد و فاکتورهای معنی‌دار	۴۰
۳-۱-۶- استفاده از روش‌های PLS و PCR در اندازه‌گیری نمونه‌های سنتزی	۴۶
۳-۱-۷- اندازه‌گیری فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N- اکسید به صورت همزمان در پلاسمای خون انسان	۴۹
۳-۲- بررسی فرایند متابولیسم فنانتریدین به وسیله‌ی آنزیم آلدئیداکسیداز و مطالعه‌ی حد واسطهای احتمالی	۵۱
۳-۲-۱- بررسی متابولیسم به وسیله‌ی $MCR-ALS$	۵۱
۳-۲-۲- بررسی متابولسیم فنانتریدینN – اکسید	۵۵
۳-۳- استفاده از روش برازش چند متغیره جهت بدستآوردن پارامترهای سینتیکی واکنش‌های مختلف آنزیمی و مقایسه‌ی آن با روش لینویور – برک	۵۹
۳-۳- بررسی سینتیک واکنش متابولیسم	۶۱
۳-۳-۱- بررسی سینتیک با استفاده از روش لینویور- برک	۶۱
۳-۳-۲- بررسی سینتیک با استفاده از روش کمومتریک (برازش چند متغیره)	۶۴
منابع و مآخذ	۷۶

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه!!**

شکل ۱-۱ فرمول ساختاری فنانتریدین و فنانتریدینون و فنانتریدین N-اکسید	۱۰
شکل ۱-۳ منحنی تغییرات جذب۵ میکرومولار از فنانتریدین ، فنانتریدینون فنانتریدین N- اکسید در محدوده pH ۱-۱۴.	۳۰
شکل ۲-۳ طیف های جذبی محلول های فنانتریدین ، فنانتریدینون وفنانتریدین N- اکسید ! !	۳۲
شکل ۳-۳ نمودار کالیبراسیون فنانتریدین! !	۳۳!
شکل ۴-۳ نمودار کالیبراسیون فنانتریدینون! !	۳۴!
شکل ۵-۳ نمودار کالیبراسیون فنانتریدین N- اکسید! !	۳۵
شکل ۶-۳ طیف جذبی فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N-اکسید و همچنین طیف مخلوط آنها در حالت تجربی (E) و تئوری (T)! !	۴۱!
شکل ۷-۳ نمودار $PRESS$ برای فنانتریدین بر حسب تعداد فاکتورهای انتخابی در روش PLS	۴۳
شکل ۸-۳ نمودار $PRESS$ برای فنانتریدین بر حسب تعداد فاکتورهای انتخابی در روش PCR	۴۳
شکل ۹-۳ نمودار $PRESS$ برای فنانتریدینون بر حسب تعداد فاکتورهای انتخابی در روش PLS	۴۴
شکل ۱۰-۳ نمودار $PRESS$ برای فنانتریدینون بر حسب تعداد فاکتورهای انتخابی در روش PCR	۴۴
شکل ۱۱-۳ نمودار $PRESS$ برای فنانتریدینN- اکسید بر حسب تعداد فاکتورهای انتخابی در روش PLS	۴۵
شکل۱۲-۳ نمودار $PRESS$ برای فنانتریدینN- اکسید بر حسب تعداد فاکتورهای انتخابی در روشPCR	۴۵
شکل ۱۳-۳ طیف های متوالی ثبت شده از محلول واکنش متابولیسم فنانتریدین	۵۲
شکل ۱۴-۳ پروفایل غلظتی داده های سر هم زده شده متابولیسم فنانتریدین به فنانتریدینون	۵۲
شکل ۱۵-۳ طیف های متوالی ثبت شده از محلول واکنش متابولیسم فنانتریدین N-اکسید	۵۶
شکل ۱۶-۳ پروفایل غلظتی حاصل از تحلیل داده های طیفی مربوط به انکوباسیون فنانتریدین N-اکسید	۵۶
شکل ۱۷-۳ نمودار لینویور- برک برای واکنش متابولیسم فنانتریدین به فنانتریدینون	۶۲
شکل ۱۸-۳ نمودار لینویور- برک برای واکنش متابولیسم گزانتین به اوریک اسید	۶۳
شکل ۱۹-۳ نمودار لینویور- برک برای واکنش متابولیسم ۶- دی اکسی پن سیکلوویر به پن سیکلوویر	۶۴
شکل ۲۰-۳ طیف های خالص فنانتریدین و فنانتریدینون	۶۷
شکل ۲۱-۳ برازش داده‌ها و پروفیل های غلظتی مربوط به واکنش متابولیسم فنانتریدین به فنانتریدینون	۶۸
شکل ۲۲-۳ طیف های خالص گزانتین و اوریک اسید	۶۹
شکل ۲۳-۳ برازش داده‌ها و پروفیل های غلظتی مربوط به واکنش متابولیسم گزانتین به اوریک اسید	۷۰
شکل ۲۴-۳ طیف های خالص ۶- دی اکسی پن سیکلوویر و پن سیکلوویر	۷۱
شکل ۲۵-۳ برازش داده‌ها و پروفیل های غلظتی مربوط به واکنش متابولیسم ۶- دی اکسی پن سیکلوویر به پن سیکلوویر	۷۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه!!**

جدول ۱-۱ طبقه بندی آنزیم ها بر اساس نوع واکنش	۴
جدول ۱-۳ داده های تجزیه ای نمودار کالیبراسیون در اندازه گیری اسپکتروفتومتری فنانتریدین،فنانتریدینون و فنانتریدین N – اکسید!!	!۳۷
جدول ۲-۳ مشخصات غلظتی مجموعه کالیبراسیون!!	!۳۸
جدول ۳-۳ نتایج اندازه‌گیری نمونه‌های سنتزی با استفاده از روش PLS و PCR!!	!۴۶
جدول ۴-۳ پارامترهای آماری برای فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N- اکسید در سری پیش‌بینی!!	!۴۷
جدول ۵-۳ اعداد شایستگی برای روش های PLS وPCR!!	!۴۸
جدول ۶-۳ بازیافت فنانتریدین، فنانتریدینون و فنانتریدین N-اکسیداز پلاسمای انسان اسپایک شده!!	!۵۰
جدول ۷-۳ اعداد شایستگی $MCR\text{-}ALS$ برای بررسی متابولیسم فنانتریدین!!	۵۴
جدول ۸-۳ مقادیر ویژه و مقادیر ویژه متوالی برای حاصل از تحلیل داده های طیفی مربوط به انکوباسیون فنانتریدین N-اکسید	۵۷
جدول ۹-۳ نتایج سینتیکی حاصل از روش لینویور- برک و مدل سازی سخت	۷۳

فصل اول:

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- آنزیمها

۱-۱-۱- اهمیت آنزیمها

آنزیم ها پروتئین هایی هستند که برای کاتالیز کردن واکنش های بیولوژیک اختصاصی می باشند و در بین همه بیومولکول ها به اختصاصی بودن و قدرت کاتالیتیک بالا معروفند. کلمه ی آنزیم از لغت یونانی "*en*" به معنای " در" و "*Zyme*" به معنای " مخمر" درسال ۱۸۷۸ و به منظور تاکید بر وجود عاملی در مخمر، غیر از خود مخمر که فرآیند تخمیر را انجام می دهد، اقتباس گردید. تا سال ۱۹۲٦ اطلاع درستی از ترکیب شیمیایی آنزیم ها در دست نبود تا اینکه *Summer* آنزیم اوره آز را که در واکنش هیدرولیز اوره به آمونیاک و دی اکسید کربن شرکت دارد به شکل متبلور به دست آورد و به این ترتیب ثابت شد که این بلورها ماهیت پروتئینی دارند [۱]. ازآن زمان به بعد مطالعات آنزیم شناسی مشخص کرد که اغلب آنزیم ها ازجنس پروتئین هستند. مطالعه ی آنزیم ها از لحاظ ساختمان، فعالیت کاتالیزوری، تولید، تخلیص، مکانیسم عمل و کاربرد آنها مورد بحث و بررسی بوده است. از دانش شناخت آنزیم ها، به دلیل اهمیت آن در مباحث علمی زیست شناسی، شیمی فیزیک، میکروب شناسی، ژنتیک، گیاه شناسی، جانورشناسی، تغذیه، داروشناسی، شناخت سموم، آسیب شناسی فیزیولوژیک، پزشکی و بالاخره شیمی و مهندسی شیمی استفاده بسیاری شده است [۲].

امروزه از آنزیم ها در زمینه های پزشکی و صنعتی به دلیل فعالیت کاتالیتیک و انتخابگری بالای آن ها، بطور گسترده استفاده می شود. کاربرد آنزیم ها در صنعت، از قرن بیستم آغاز شد. غالب این آنزیم ها به گروه هیدرولازها تعلق دارند. این آنزیم ها در محیط آبی، مواد غذایی اصلی مانند چربی ها، پروتئین ها و قندها را تجزیه می کنند[۲]. تشخیص بیماری ها نیز از طریق تعیین

میزان آنزیم ها در مایعات بیولوژیک به ویژه در سرم و ادرار به علت افزایش فعالیت آنها در بدن در نتیجه بیماریهای خاص مورد توجه بوده است[۳]. مهارکننده های آنزیمی برای درمان بیماری ها و همچنین طراحی داروها استفاده شده است و در واقع بسیاری از داروها یا مستقیما بر روی آنزیم اثر می کنند و یا بطور غیر مستقیم آنزیم را تحت تاثیر قرار می دهند. برخی از تداخل های دارویی و عوارض جانبی داروها به نحوی ریشه در مهار آنزیم ها دارند. تعدادی از داروها آنزیم های کبدی را مهار و تعدادی آنها را القاء می کنند که این مهار و القاء می تواند منجر به افزایش یا کاهش سطح سرمی داروهای دیگر و بروز تداخل های دارویی گردد[٤].

همچنین آنزیم ها برای اندازه گیری انواع متابولیت ها مورد استفاده قرار می گیرند، به طوری که آنزیم ها در واکنش با سوبسترای مورد نظر آن را به متابولیت یا متابولیت های مربوطه تبدیل کرده و سپس با توجه به خواص سوبسترا و محصول میزان این تبدیل تعیین می شود[۵]. همچنین از آنزیم ها برای تعیین مقدار سوبسترا های ناپایدار که با روش های معمول شیمیایی قابل تعیین نیستند استفاده می شود. آنزیم ها همچنین بعنوان دارو برای درمان برخی بیماریهای خاص مانند سرطان، بیماری های اختلال ژنتیکی و از بین بردن سموم از خون مورد استفاده قرار می گیرند .

۱-۱-۲- منابع آنزیمها

گیاهان وحیوانات به عنوان منابع سنتی آنزیم ها از ابتدا برای تهیه ی این ماکرومولکول های بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفته اند، از جمله آنها می توان به آنزیم سیستئین پروتئاز که ازشیرهء انجیر و آنزیم لیپاز و تریپسین که ازحیوانات بدست می آید، اشاره کرد. میکروارگانیسم ها درمحیط کشت مناسب تعداد زیادی از آنزیم های مفید را می توانند تولید و ترشح کنند. ازمزیت های

میکروارگانیسم ها ترشح آنزیم به خارج ازسلول و عدم نیاز به شکستن دیواره سلولی و در نتیجه جداسازی راحت آنزیم می باشد[۵].

۱-۱-۳ – جداسازی و تخلیص آنزیمها

جداسازی هر آنزیم نیاز به روش خاصی دارد ولی روش های معدودی دراین رابطه معرفی شده اند . معمولا با بکارگیری تلفیقی ازاین روش ها و بهره گیری از ویژگی هریک ، آنزیمهای زیادی قابل استخراج و خالص سازی اند.

اولین مرحله استخراج آنزیم از بافت های حیوانی و گیاهی و همین طور میکروارگانیسم ها تقریبا مشابه است که شامل خرد کردن و همگن کردن بافت مورد نظر در یک تامپون مناسب می باشد. مرحله بعد سانتریفوژ کردن است که ازاین طریق اجزاء و اندامک های سلولی جدا می شوند و تا حدودی آنزیم خالص می گردد ولی علاوه بر این، تخلیص آنزیم نیز لازم است که برای این منظور از برخی جنبه های ظریف پایداری آنزیم ها در شرایط نامساعد استفاده می شود[٦].

۱-۱-٤ – طبقه بندی آنزیمها

در جدول ۱-۱ طبقه بندی آنزیم ها برحسب نوع واکنش آنها نشان دهده شده است.

جدول ۱-۱ طبقه بندی آنزیم ها بر اساس نوع واکنش

طبقه بندی	نوع واکنش
۱- *اکسیدوردوکتازها*	*واکنش اکسیداسیون – احیاء*
۲- *ترانسفرازها*	*واکنش های انتقال گروه عاملی*
۳- *هیدرولازها*	*واکنشهای هیدرولیزکننده*
٤- *لیازها*	*واکنش حذف گروه ها با ایجاد پیوند دوگانه*
٥- *ایزومرازها*	*واکنش های ایزومراسیون*
٦- *لیگازها*	*واکنش های سنتزی*

۱-۱-٥- مولیبدنیم هیدروکسیلازها

مولیبدنیم هیدروکسیلازها عموما شامل دو آنزیم آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز می باشند. مولیبدنیم به عنوان عنصر اساسی آنزیم های مولیبدنیم هیدروکسیلاز می باشد. مولیبدنیم برای واکنش های انتقال پروتن و الکترون یک کاتالیست بیولوژیک است و درحبوبات و فراورده های لبنی و گوشت یافت می شود.

آنزیم های مولیبدو– فلاوو برای فعالیت کاتالیتیک خود نیاز به کوفاکتور مولیبدوپترین و *FAD* دارند. آنزیم های حاوی مولیبدنیم واکنش های پایه متابولیک ترکیبات حاوی نیتروژن– سولفور وترکیبات حلقوی کربن را کاتالیز می کنند.

۱-۱-٦- آلدئید اکسیداز [1] (*AO*)

AO یک مولیبدوفلاووآنزیم می باشد که غالبا در کبد تولید می شود و در متابولیسم بسیاری از گرنوبیوتیک های فارماکولوژیک و توکسیکولوژیک دخالت دارد.

این آنزیم انتقال یک اتم اکسیژن را بر روی تعداد زیادی از*N*– هتروسیکل ها و آلدئیدها کاتالیز می کند. برخی داروهای مهم و ترکیبات بیولوژیک از جمله فم سیکلووير، متوترکسات، آزاتیوپرین، کوینیدین، رتینالدئید، پریدوکسال و *HT*-5 جزو این داروها و ترکیبات بیولوژیک می باشند[۸–۱۲]. این در حالی است که تعداد کمی از این ترکیبات به عنوان سوبسترا برای اندازه گیری فعالیت آنزیم و بررسی های سینتیکی مورد استفاده قرار گرفته اند.

علاوه بر این*AO* در واکنش های احیاء مواد ازت دار نظیر *N*- اکسیدها، اکسیم ها، رنگ های ازت دار، *N* -نیروز و *N*– هیدروکسی کاربامینول و همچنین بعنوان کاتالیزور در واکنشهای احیاء مواد آروماتیک به آمیدها شرکت می کند. همچنین این آنزیم باعث احیای مواد رنگی جهت سم زدایی می شود [۷]. تعداد محدودی از داروها دارای ساختار آلدئیدی هستند ولی بیشتر داروهایی که دارای ساختار آمینی و الکلی می باشند در مسیر تبدیل به اسیدهای مربوطه از یک واسطه ی آلدئیدی عبور می کنند و از این رو آنزیم آلدئید اکسیداز می تواند مهم باشد.

[1] - Aldehyde Oxidase

۱-۱-۷- گزانتین اکسیداز [1] (*XO*)

XO یک اکسیدوردوکتاز حاوی مولیبدن است. این آنزیم در میان جانداران بطور وسیع توزیع یافته و در شیر گاو و کبد گوساله به میزان بالایی وجود دارد. *XO* آنزیمی نسبتا غیر اختصاصی بوده و انواع مختلف ترکیبات را به عنوان سوبسترا مورد واکنش قرار می دهد. این آنزیم در متابولیسم ترکیبات متعددی ازجمله پورین ها مشارکت دارد و بعنوان یک آنزیم اکسیدوردوکتاز واکنش های انجام یافته با این آنزیم می تواند در شرایط هوازی و بی هوازی صورت پذیرد. درنتیجه ی کاتابولیسم (شکسته شدن و به مولکولهای کوچکتر تبدیل شدن) پورین ها در بدن انسان اسید اوریک تولید می شود لذا پرهیز از مصرف غذاهای پورین دار بعنوان شیوه ای برای کاهش میزان اسید اوریک در عارضه هیپراوریسمی (بالا بودن اسید اوریک خون) مورد تجویز قرار می گیرد. تولید اسید اوریک درنتیجه ی متابولیسم گزانتین و هیپوگزاتین بوسیله ی گزانتین دهیدروژناز و *XO* نقش مهمی در ایجاد بیماری هیپراوریسمی بازی می کند . بنابراین با تجویز داروی آلوپورینول (مهارکننده ی *XO*) می توان این فرایند را مهار نمود و از تولید اسید اوریک جلوگیری کرد. اهمیت دیگر این آنزیم توانایی آن برای تولید رادیکالهای آزاد و نقش آن در تغییرات پاتولوژیک ناشی از پدیده ی ایسکمی– جریان مجدد است [۹]. امروزه کاربرد بیوسنسورهای حاوی *XO* بصورت تجاری در بازار بسیار وسیع است [۱۵-۱۰]. *XO* در متابولیسم داروهای مختلف از جمله آلوپورینول، ٦-دی اکسی پن سایکلوویر، ٦-مرکاپتوپورین و... نقش مهمی را ایفا می کند [١٦] .

[1] -Xanthine Oxidase

۱-۱-۸- اندازه گیری فعالیت آنزیم و سینتیک واکنش های آنزیمی

بررسی فعالیت یک آنزیم از طریق تعقیب مصرف سوبسترای آن آنزیم و یا تولید متابولیت مربوطه نسبت به زمان میسر می باشد. بدیهی است در چنین مواردی آنزیم باید کاملا خالص باشد زیرا در صورتی که آنزیم های دیگر به همراه آنزیم مورد نظر موجود باشند در اندازه گیری فعالیت آن آنزیم مداخله و ایجاد مزاحمت خواهند کرد. در صورتی که ناخالصی هایی شامل آنزیم های دیگر در کنار آنزیم مورد مطالعه وجود داشته باشد باید از سوبسترای اختصاصی که فقط با آنزیم مد نظروارد واکنش می شود استفاده گردد.

فنانتریدین یک ترکیب آزوهتروسیکلیک جوش خورده می باشد که توسط آلدئیداکسیداز به فنانتریدینون اکسید می شود. این واکنش اکسیداسیون در بسیاری از مطالعات برای به عنوان یک واکنش اختصاصی مناسب برای بررسی فعالیت آلدئیداکسیداز مورد استفاده قرار گرفته است. واکنش متابولیسم فنانتریدین، اندازه گیری جذب فنانتریدینون تولید شده به روش اسپکتروفتومتری در nm ۲۲۳ مورد بررسی قرار می گیرد.

سینتیک واکنش های آنزیمی با بررسی هیدرولیز ساکاروز به وسیله ی ساکاراز توسط *Wilhelmy* در سال ۱۸۵۰ مورد بررسی قرار گرفت که *Brawn* با توجه به این تحقیقات الگویی را بصورت معادله ی ۱-۱ ارائه کرد [۶۱].

$$E + S \Leftrightarrow ES \Leftrightarrow E + P \qquad (۱-۱)$$

این الگو برای واکنش های آنزیمی تک سوبسترائی صادق است. این دانشمندان نشان دادند که در واکنش های آنزیمی، در غلظت بالای سوبسترا که تمام آنزیم وارد واکنش می شود سرعت واکنش

مستقل ازغلظت آنزیم بوده و واکنش از درجه ی صفر است. در غلظت پایین سرعت با غلظت سوبسترا متناسب بوده و واکنش از نوع درجه اول است[٦١].

Henri و *Menten*، *Michaelis* معادلاتی را در مورد رابطه ی سرعت اولیه و غلظت سوبسترا ارائه دادند. از این رابطه حداکثر سرعت اولیه مربوط به واکنش آنزیمی ($V_{\max}$) و ثابت میکائیلیس – منتن(K_m) بدست می آید[۳] .

$$V = \frac{V_{\max}[S_o]}{[S_o] + K_m} \qquad (۲-۱)$$

$V_{\max}$: حداکثر سرعت واکنش آنزیمی

K_m: ثابت مکائیلیس – منتن

S_o: غلظت اولیه سوبسترا

معادله *Michaelis–Menten* درمورد بسیاری از واکنش های آنزیمی صدق می کند. $V_{\max}$ با غلظت آنزیم تغییر می کند. K_m از ویژگی های سیستم مورد مطالعه بوده و معمولا مقادیر صحیح $V_{\max}$ را درغلظت بالای سوبسترا و K_m در غلظت پایین سوبسترا می توان بدست آورد. معادله*Michaelis –Menten* به علت اینکه $V_{\max}$ در غلظت های بالای سوبسترا بدست می آید چندان مناسب نیست، در نتیجه به دنبال آن راه حل جدیدی به نام معادله ی *Lineweaver –Burk* ارائه شد:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{S_o} + \frac{1}{V_{\max}} \qquad (۳-۱)$$

که دارای اهمیت زیادی در بدست آوردن پارامترهای سینتیکی می باشد و نمودار آن از رسم $\frac{1}{v}$ دربرابر $\frac{1}{S_o}$ بدست می آید که عرض ازمبدا آن $\frac{1}{V_{\max}}$ و محل تلاقی آن با محور x ها $-\frac{1}{K_m}$ را

تعیین می کند. K_m نمودی از نیروی تمایل S (سوبسترا) برای اتصال به E (آنزیم)درمجموعه ES است. به طوری که K_m بزرگ دلیل بر تمایل ضعیف و K_m کوچک نشانه ی تمایل قوی درمجموعه ی آنزیم – سوبسترا به شمار می رود. میزان K_m برای هرآنزیم و سوبسترا در شرایط معین مقدار ثابتی است که به غلظت آنزیم بستگی ندارد. باید دانست که چنانچه یک آنزیم بر روی دو سوبسترای مختلف اثر کند مقدار K_m برای هر سوبسترا متفاوت خواهد بود[۳]..

۱-۲ -آزارین ها

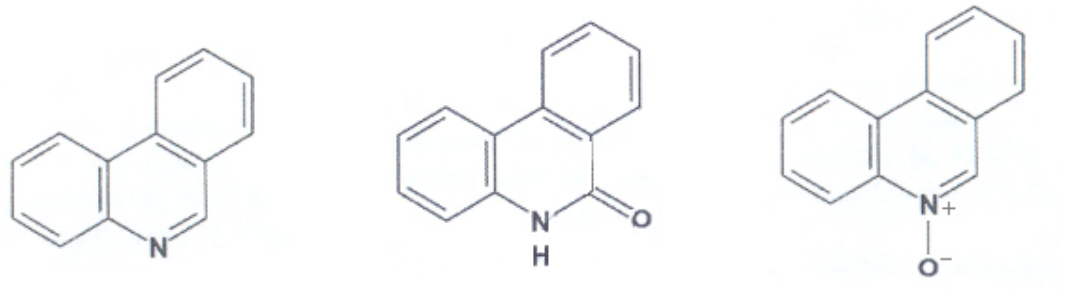
آزارین ها متعلق به N– هتروسیکل ها بوده که بصورت ترکیباتی سمی در محیط زیست پخش شده اند [۱۷]. این ترکیبات از این جهت که در محیط های بیولوژیکی به عنوان پروب استفاده می شوند از نظر پزشکی و شیمیایی دارای اهمیت خاصی هستند [۱۸].

فنانتریدین، فنانتریدین N–اکسید و فنانتریدینون جزو آزارین ها هستند ، فنانتریدین بعنوان سوبسترای اختصاصی آنزیم آلدئید اکسیداز در تست های بیولوژیکی وجود آنزیم آلدئیداکسیداز بطور وسیع استفاده می شود . علاوه براین دربررسی *in vivo* و *in vitro* سینتیک آنزیمی آلدئید اکسیداز و اندازه گیری میزان مهارکنندگی داروها بر روی این آنزیم مورد توجه است .

۱-۳- روش های اندازه گیری فنانتریدین و فنانتریدینون و فنانتریدین N–اکسید

برای اندازه گیری فنانتریدنیون درحضور فنانتریدین ، از روشهای فتومتری با اندازه گیری جذب در ۳۲۲nm استفاده می شود. در این روش مقدار فنانتریدنیون با یک حد تشخیص نسبتا بالا بدست می آید، درصورتی که در طول موجهای پایین تر طیف های جذبی این دو ترکیب به طور

شدید همپوشانی می کنند لذا امکان دستیابی به حد تشخیص های پایین تر با این روش وجود ندارد. علاوه بر این روش از *GC, HPLC* نیز برای اندازه گیری همزمان این دو ترکیب استفاده شده است [۲۰-۱۹] . همچنین می توان ازاسپکترو فلوئورومتری نیز برای اندازه گیری این ترکیبات استفاده کرد ولی طیف های نشری آن ها با هم همپوشانی دارند که اندازه گیری آنها را با مشکل مواجه می کند.



Phenanthridine Phenanthridinone Phenanthridine N-oxide

شکل ۱-۱ فرمول ساختاری فنانتریدین و فنانتریدینون و فنانتریدین *N*-اکسید

۱-٤- روش های کمومتریک و کاربرد آنها در بررسی واکنشهای آنزیمی

۱-٤-۱- کلیات

کمومتریکس بخشی از علم شیمی می باشد که از ریاضیات، آمار و منطق برای طراحی یا انتخاب روشهای تجربی بهینه، کسب بیشترین اطلاعات شیمیایی مفید با بررسی داده های شیمیایی و بدست آوردن دانش و آگاهی در مورد سیستم های شیمیایی استفاده می کند[٥٤].

در سال های اخیر در بین علوم مرتبط با شیمی تجزیه به یقین کمومتریکس یکی از موارد دارای پیشرفت مستمر و پایدار بوده است و این روند در گزارشات دو سالانه مجله *Analytical Chemistry* مشهود است[۵۹-۵۵].

از همان ابتدای بوجود آمدن روشهای تجزیه ای، بدست آوردن داده ها، تفسیر نتایج و سنجش میزان صحت و دقت آنها نیازی ضروری برای یک آنالیست بوده است.

در آغاز این کار توسط دستگاه های ساده تجزیه و روش های ریاضی و آمار انجام می شد، با پیشرفت دستگاه های تجزیه ای و پیچیدگی داده های بدست آمده، لزوم استفاده از کامپیوتر برای ذخیره سازی داده ها مطرح شد.

با ورود کامپیوتر به این عرصه زمینه ی ایجاد شاخه ی کمومتریکس در کنار روش های ریاضی و آمار فراهم آمد. این علم در شاخه های دیگر شیمی همچون شیمی دارویی و بیوشیمی نیز بطور وسیع رشد کرده است [۲۱]. اصطلاح کمومتریکس برای اولین بار توسط سوانت ولد درسال ۱۹۷۱ مطرح شد. وی کمومتریکس را هنر استخراج اطلاعات شیمیایی از داده های تجزیه ای می دانست. سپس درسال ۱۹۸۲ فرانک و کوالسکی کمومتریکس را کاربرد آمار، ریاضی و کامپیوتر در طراحی آزمایش های بهینه سازی و برقراری ارتباط بین نتایج آزمایش و همچنین استخراج اطلاعات شیمیایی از داده های آزمایشگاهی تعریف کردند [۲۲].

۱-٤-۲-دسته بندی روشهای کمومتریک

موضوعات اصلی در کمومتریکس شامل اصول نمونه برداری، طراحی آزمایش، انتخاب شرایط بهینه، پردازش سیگنالهای یک یا چند متغیره و تحلیل داده ها می باشد. روش های کمومتریک معمولا به دو دسته ی کلی تقسیم بندی می شوند: