دانشگاه شهید بهشتی
پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته فیتوشیمی

عنوان:

بررسی پپتید حلقوی سیکلوسپورین به روش کروماتوگرافی مایع مایسلی با استفاده از ستون های هیدروفیلیک HILIC

نگارش:

معصومه دلیلیان

استاد راهنما:

دکتر علیرضا قاسم پور

استاد مشاور:

دکتر نوشین ادیب

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

تیر ۱۳۸۸

۱۲۹۳۵۳

دانشگاه شهید بهشتی

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین

تلفن: ۲۹۹۰۱

تاریخ .....

شماره .....

پیوست.....

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد

بازگشت به مجوز دفاع شماره ۵/۲۰۰/۱۴۰۴ مورخ ۸۸/۴/۲۱ مدیر محترم تحصیلات تکمیلی، پایان نامه خانم معصومه دلیلیان به شناسنامه شماره ۱۲۰۷ صادره از رشت متولد ۱۳۵۸ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته فیتو شیمی

با عنوان:

بررسی پپتید حلقوی سیکلوسپورین به روش کروماتوگرافی مایع مایسلی با استفاده از ستون های هیدروفیلیک (HILIC)

به راهنمایی:

آقای دکتر علیرضا قاسم پور

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۸۸/۴/۲۲ تشکیل گردید و بر اساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ..... و درجه..... مورد تصویب قرار گرفت.

ردیف	هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱-	استاد راهنما:	آقای دکتر علیرضا قاسم پور	دانشیار	
۲-	استاد مشاور	خانم دکتر نوشین ادیب	استادیار	
۳-	داور خارجی:	آقای دکتر سعید بلالایی	استاد	
۴-	داور داخلی:	آقای دکتر حسن رفعتی	استادیار	

تقدیم به:

پیشگاه ولی عصر(ع)،

پدر و مادر گرانقدرم بپاس محبت ها وحمایت هایشان،

اساتید ارجمندم بپاس صبوری واشتیاقشان برای آموزش و

کلیه دوستداران علم ودانش.

تشکر و قدردانی

در طول دوران تکمیل پایان نامه حاضر، لطف و عنایت پروردگار در غالب کمک های افرادی شامل حال اینجانب بود، که مراتب قدردانی و سپاسگزاری خود را نثار ایشان می کنم.

سپاسگزارم از پدر و مادر مهربانم که موفقیت من ثمره زحمات و محبت های بی دریغ آنهاست.

از استاد راهنمای عزیزم آقای دکتر علیرضا قاسم پور که در کمال صبوری، همواره لطف و حمایت ایشان شامل حالم بوده و بذل توجه و عنایتشان کمک شایانی در تکمیل مطالعاتم داشت، سپاسگزارم.

از اساتید ارجمند دکتر پیمان صالحی، دکتر رفعتی، دکتر برهمن موثق، دکتر نجفی و دکتر سنبلی برای زحمات فراوانی که در این مدت متحمل شده اند، صمیمانه تقدیر و تشکر می کنم.

همچنین از آقای مهندس نژاد ابراهیمی به خاطر توجه وکمک های فکری شان کمال تشکر را دارم.

از خواهر و دوست عزیزم، خانم فاطمه میرزاجانی برای کمک های علمی و نیز ویژگی های پسندیده اخلاقی شان که در مراحل مختلف این تحقیق رهگشای مشکلات من بوده، ممنونم.

از خانم ها سارا اسلامبولچی، پونه خلیق، هاجر حیدری، مینا قهرمان زمانه، مهشید حاجب، نرگس عابدینی، بهناز ثابتی، زهرا نظری و آقایان محمد بلوچ ، حسن رضادوست، مرتضی غلامی، حسین هاشم پور، مهدی عیاری، وحید کیان پور، بهور اصغری، دارا دستان، علی آرمیده، سعید مولایی، علیرضا پوررضا که در این مدت افتخار همکاری و دوستی با آنان را داشته ام و خاطراتی شیرین و فراموش نشدنی را در ذهنم حک کرده اند ، از صمیم قلب سپاسگذارم و برای همه آن عزیزان آرزوی سعادت و بهروزی دارم.

معصومه دلیلیان

چکیده

سیکلوسپورین پپتیدی حلقوی، هیدروفوب و خنثی، شامل ۱۱ اسید آمینه مـی باشـد کـه از سال ۱۹۸۷ به عنوان یک مهارکننده سیستم ایمنی در پیوند اعضا و بیماری های خود ایمنی به کار برده شده است. این دارو از یک قارچ خاکی به نام *Tolypocladium inflatum* Gams بدست می آید. اندازه گیری این دارو بسیار مشکل می باشد. در بیشتر روش های استفاده شـده HPLC بـرای تعیین مقدار سیکلوسپورین و متابولیت هایش، از ستون با درجه حرارت بالا (۸۰- ۴۵ سانتی گـراد) استفاده شده است. دراین تحقیق یک تکنیک جدید، برای آنالیز سیکلوسپورین استفاده شده اسـت. در این روش از یک ستون هیدروفیل (Amide Silica) استفاده شده و این ستون نسبت بـه تمـامی ستون های ذکر شده از پلاریته بالاتری برخوردار اسـت و بـرای جداسـازی ترکیبـات قطبـی بسـیار مناسب می باشند و چون سیکلوسپورین یک ترکیب غیر قطبی است، این ترکیب بـه صـورت گونـه مایسلی که یک ترکیب قطبی تر است، در آورده شد. برای تهیه مایسل سیکلوسـپورین از Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) استفاده گردید. روش مایسل کروماتوگرافی با اسـتفاده از سـتون هـای هیدرو فیلیک روشی آسان، سریع برای اندازه گیری سیکلوسپورین می باشـد بـه طـوری کـه دارای حساسیت کافی برای اندازه گیری غلظت کمینه سیکلوسپورین در محیط های طبیعی نظیر قارچ ها و حتی در محیط های پیچیده تر نظیر سرم بیماران دریافت کننـده دارو را دارا مـی باشـد. شـرایط بهینه فاز متحرک انتخاب شده شامل ۱۵٪ اسـتونیتریل، ۸۵٪ آب و اسـتفاده از ۰/۱۶٪ تـری اتیـل آمین به طوریکه pH محیط با اسید استیک در حالت خنثی نگـه داشـته شـد. سـرعت جریـان فـاز متحرک ۰/۰۶ میلی لیتر بر دقیقه انتخاب گردید که با استفاده از این فاز متحرک تا غلظـت هـای ppm ۱ استاندارد سیکلوسپورین اندازه گیری گردید.

بررسی پپتید حلقوی سیکلوسپورین به روش کروماتوگرافی مایع مایسلی با استفاده از ستون های هیدروفیلیک (HILIC)

فصل اول (تئوری)

۱- سیکلوسپورین A	۱
۱-۱- شیمی سیکلوسپورین	۱
۱-۱-۲- کاربردهای درمانی	۲
۱-۱-۳- اشکال داروئی	۳
۱-۱-۳-۱- اسامی تجارتی	۳
۱-۱-۳-۲- شرایط نگهداری	۳
۱-۲- تاریخچه استفاده و فیتوشیمی قارچ *Tolypocladium inflatum* Gams	۴
۱-۳- آنالیز به کمک ستون های هیدروفیلیک Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)	۶
۱-۳-۱- مشکلات کلی ستون های نرمال (NP) و معکوس (RP)	۶
۱-۳-۲- کروماتوگرافی مایع بر اساس بر همکنش های هیدروفیلیک	۹
۱-۳-۳- مکانیسم جداسازی در ستون های HILIC	۹
۱-۳-۴- انواع فاز ساکن ستون های HILIC	۱۱
۱-۳-۴-۱- ستون های Amide Silica	۱۳
۱-۳-۵- فاز های متحرک معمول در HILIC	۱۵
۱-۳-۶- تاثیر دما روی ستون های هیدروفیلیک	۲۱
۱-۳-۷- کروماتوگرافی مایع مایسلی	۲۲
۱-۳-۷-۱- مایسل	۲۲

فصل دوم تجربی

۲- مواد و دستگاه ها	۲۷
۲-۱- مواد مورد استفاده	۲۷
۲-۱-۱- منبع قارچ مورد استفاده	۲۷
۲-۱-۲- مواد و معرف های بکار رفته	۲۸
۲-۲- دستگاهوری	۲۸

۲-۲-۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۲۸
۲-۳- روش انجام آزمایش ۲۹
۲-۳-۱- تهیه مایسل سیکلوسپورین ۲۹
۲-۳-۲- روش استخراج سیکلوسپورین از سرم ۲۹
۲-۴- روش آنالیز ۳۰
۲-۴-۱- جداسازی و شناسایی سیکلوسپورین با روش HPLC ۳۰
۲-۴-۲- استخراج عصاره قارچی ۳۰

فصل سوم بحث و نتیجه گیری

۳-۱- بهینه سازی شرایط جداسازی HPLC ۳۳
۳-۱-۱- انتخاب معرف مایسل کننده و نسبت مولی مناسب از آن ۳۵
۳-۱-۲- مطالعه اثر فاز متحرک ۳۶
۳-۱-۳- مطالعه اثر حلال های آلی در فاز متحرک ۳۸
۳-۱-۴- مطالعه اثر pH ۳۹
۳-۱-۵- مطالعه اثر نمک در فاز متحرک ۴۳
۳-۱-۶- مطالعه اثر دما ۴۵
۳-۱-۷- مطالعه اثر Ionic Liquid در فاز متحرک ۴۶
۳-۱-۸- تعیین فاز متحرک بهینه ۴۹
۳-۲- اندازه گیری سیکلوسپورین در نمونه های طبیعی ۵۰
۳-۲-۱- اندازه گیری سیکلوسپورین در نمونه قارچی ۵۰
۳-۲-۲- اندازه گیری سیکلوسپورین در نمونه سرم ۵۳

منابع ۵۵

جداول

جدول ۱-۱: انواعی از ستون های هیدروفیلیک و فاز متحرک مناسب جهت جداسازی پپتیدهای مختلف ۱۲

جدول ۲-۱: وزن بیوماس قارچ در شرایط و زمان های مختلف ۲۸

اشکال

شکل ۱-۱: ساختمان شیمیایی سیکلوسپورین ۲

شکل ۱-۲: قارچ *Tolypocladium inflatum* Gams و موقعیت جغرافیایی جمع آوری توسط دکتر فری [۶] ۵

شکل۱-۳: چگونگی اتصال گروه های آمیدی به سطح سیلیکاژل، توسط اتصال دهنده های کربومایلی در ستون های Amide Silica ۱۳

شکل ۱-۴: اثر سه نوع اسید افزوده شده به فاز متحرک جهت جداسازی پپتید های 1=FY, 2=FGGF, 3=FLEEI , 4=DYMGWMDP-NH2, 5=NFTYGGF, 6=AGSQ, 7=WAGGDASGE, 8=YGGFMTSQKSQTPLVT توسط ستون TSK gel Amide-80 به روش گرادیان ۳ تا ۴۵ درصد آب در استونیتریل به مدت زمان ۷۰ دقیقه و طول موج ۲۶۵ نانومتر ۰/۱٪ تری فلورو استیک اسید=A، ۰/۱٪ اسید استیک=B، ۰/۱٪ اسید فرمیک=C ،بدون اسید=D ۱۴

شکل ۱-۵: میزان اثر در صد استونیتریل فاز متحرک در جداسازی چهار ترکیب doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, epidaunorubicin توسط ستون Kromasil KR100-5 SIL و فاز متحرک استونیتریل و بافر ۳۰ میلی مولار سدیم فرمات در pH= ۲/۹ ۱۶

شکل ۱-۶: جداسازی ترکیبات nicotinamide (NiNH2), 6-nicotinic acid (NiAc), methylnicotinic (ISTD), nicotinuric acid (NiUAc) با استفاده از ستون Thermo Hypersil silica و ۲٪ آب در فاز متحرک کروماتوگرام تو پر و ۵٪ در کروماتوگرام تو خالی ۱۷

شکل ۱-۷: جداسازی ترکیبات 1=epidaunorubicin, 2=daunorubicin, 3=epirubicin, 4=doxorubicin با استفاده از چهار حلال آلی متانول، ایزوپروپانول، تتراهیدروفوران و استونیتریل و حلال آبی به نسبت ۹۰ به۱۰ توسط ستون ۱۹

Kromasil KR100-5SIL . در حلال آبی از بافر سدیم فرمات ۲۰ میلی مولار استفاده شده و pH=۹/۲ می باشد.

شکل ۱-۸: ساختمان دو ترکیب ۱=epirubicin , ۲=daunorubicin, ۲۰

شکل ۱-۹: چگونگی تشکیل مایسل و محلولیت گونه های هیدروفوب در حلال هیدروفیل، در(الف)، (ب) و (ج) غلظت گونه مایسل کننده کمتر از غلظت بحرانی تشکیل مایسل و در گونه(د) غلظت گونه مایسل کننده باللاتر از غلظت بحرانی تشکیل مایسل است. ۲۳

شکل ۳-۱: کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۲، فاز متحرک ۸۵٪ استونیتریل و ۱۵٪ آب، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۳۴

شکل ۳-۲: الف) کروماتوگرام مربوط به تزریق ppm ۲ سیکلوسپورین، فاز متحرک ۶۰٪ استونیتریل و۴۰٪ آب، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت متحرک mL/min ۰/۰۳، ب) کروماتوگرام مربوط به تزریق ppm ۲ سیکلوسپورین، فاز متحرک ۴۵٪ استونیتریل و۵۵٪ آب، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت متحرک mL/min ۰/۰۳ ۳۴

شکل ۳-۳: کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۲۰٪ استونیتریل و ۸۰٪ آب، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۳ ۳۷

شکل ۳-۴: کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۳ ۳۸

شکل ۳-۵: الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، **ب)** کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل،۸۰٪ آب و ۵٪ متانول، طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۳۹

شکل ۳-۶: الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب و ۰/۱٪ تری فلورو استیک اسید،pH=۲، طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، ب) کروماتوگرام مربوط به ۴۰

استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶

شکل ۳-۷: الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱٪ آمونیاک، ۰/۰۷۵٪ اسید استیک،pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، ب) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۰۵٪ آمونیاک، ۰/۰۳۷٪ اسید استیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۴۱

شکل ۳-۸: (—) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۰۵ ٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۲٪ اسید استیک،pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، (- - -) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، (-·-) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۲٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۸٪ اسید استیک، pH=۷ ،طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۴۲

شکل ۳-۹: (—) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، (- - -) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، ppm ۲۰۰ نمک استات آمونیوم، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، (— —) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، ppm ۱۰۰۰ نمک استات آمونیوم، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۴۴

شکل ۳-۱۰: الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۵۴، فاز متحرک ۴۵

۱۵٪ اســـتونیتریل، ۸۵٪ آب ، ۰/۱۶ ٪ تـــری اتیـــل آمـــین، ۰/۰۶٪ اســـید استیک،pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶، ب) کروماتوگرام مربوط بـه اسـتاندارد سیکلوسـپورین ppm ۵۴، فـاز متحـرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید اسـتیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نـانومتر، سـرعت فـاز متحـرک mL/min ۰/۰۶، دمـا ۴۰ درجـه سانتی گراد

شکل ۳-۱۱: طرز پوشیده شدن گروه های سیلانولی توسط مایع یونی ایمیدازولی ۴۶

شکل ۳-۱۲: الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ppm ۹، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، طول موج ۲۰۸ نـانومتر، سـرعت فـاز متحـرک mL/min ۰/۰۶، ۰/۰۲۵٪ ۳- متیل- ۱- اکتیل ایمیدازولیوم تترا فلورو بورات ۴۸

شکل ۳-۱۳: کروماتوگرام مربوط به اسـتاندارد سیکلوسـپورین ppm ۹، فـاز متحـرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیـل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید اسـتیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۴۸

شکل ۳-۱۴: کروماتوگرام مربوط به اسـتاندارد سیکلوسـپورین ppm ۹، فـاز متحـرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تـری اتیـل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید اسـتیک،pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۴۹

شکل ۳-۱۵: کروماتوگرام مربوط به اسـتاندارد سیکلوسـپورین ppm ۱، فـاز متحـرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیـل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید اسـتیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۵۰

شکل ۳-۱۶: کروماتوگرام مربوط به نمونه عصاره قارچ، فاز متحرک ۱۵٪ اسـتونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیـل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید اسـتیک، pH=۷، طـول مـوج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۵۱

شکل ۳-۱۷: کروماتوگرام مربوط به نمونه عصاره قارچ و مقدار افزوده شـده اسـتاندارد، فـاز متحـرک ۱۵٪ اسـتونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تـری اتیـل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید استیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۵۱

شکل ۳-۱۸: کروماتوگرام مربوط به نمونه عصاره قارچ، فاز متحرک ۱۰٪ اسـتونیتریل، ۹۰٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیـل آمـین، ۰/۰۶٪ اسـید اسـتیک، pH=۷، طـول مـوج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک mL/min ۰/۰۶ ۵۲

شکل ۳-۱۹: کروماتوگرام مربوط به نمونه عصاره قارچ و مقدار افزوده شده استاندارد، فاز متحرک ۱۰٪ استونیتریل، ۹۰٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، طول موج ۲۰۸ نانومتر، سرعت فاز متحرک ۰/۰۶ mL/min ۵۲

شکل ۳-۲۰: الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد سیکلوسپورین ۲۶۷ ppm، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل، ۸۵٪ آب، ۰/۱۶ ٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک ۰/۰۶ mL/min، ب) کروماتوگرام مربوط به سیکلوسپورین استخراج شده از سرم، فاز متحرک ۱۵٪ استونیتریل و ۸۵٪ آب، ۰/۱۶٪ تری اتیل آمین، ۰/۰۶٪ اسید استیک، pH=۷، طول موج ۲۱۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک ۰/۰۶ mL/min ۵۳

فصل اول

تئوری

۱- سیکلوسپورین A

سیکلوسپورین[1] پپتیدی حلقوی، هیدروفوب[2] و خنثی، شامل ۱۱ اسید آمینه می باشد که از سال ۱۹۸۷ به عنوان یک مهارکننده سیستم ایمنی[3] در پیوند اعضا و بیماری های خود ایمنی به کار برده شده است [۱]. این دارو با منشأ قارچی، از یک قارچ خاکی به نام *Tolypocladium inflatum* Gams بدست می آید و سپس با اتانول و کروموفر EL فرموله شده، به صورت دارو عرضه می شود. این دارو به صورت خوراکی یا تجویز وریدی، برای پیش گیری از رد پیوند اعضاء استفاده می شود. جذب دارو بسیار کند و متغیر بوده و به میزان زیاد در بدن توزیع می شود و به سلول های خونی و پروتئین های پلاسما اتصال می یابد. دارو از متابولیسم کبدی بالایی برخوردار است. متابولیسم در دو جنس زن و مرد متفاوت می باشد به طوری که میزان متابولیسم در زنان، بیش از مردان است که این تفاوت احتمالا به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم Cyp3A4 در زنان نسبت به مردان که مسئول متابولیز کردن دارو است، می باشد. از اینرو اندازه گیری غلظت این ماده در بدن، هنگام پیوند اعضا بسیار پر اهمیت است [۹۱].

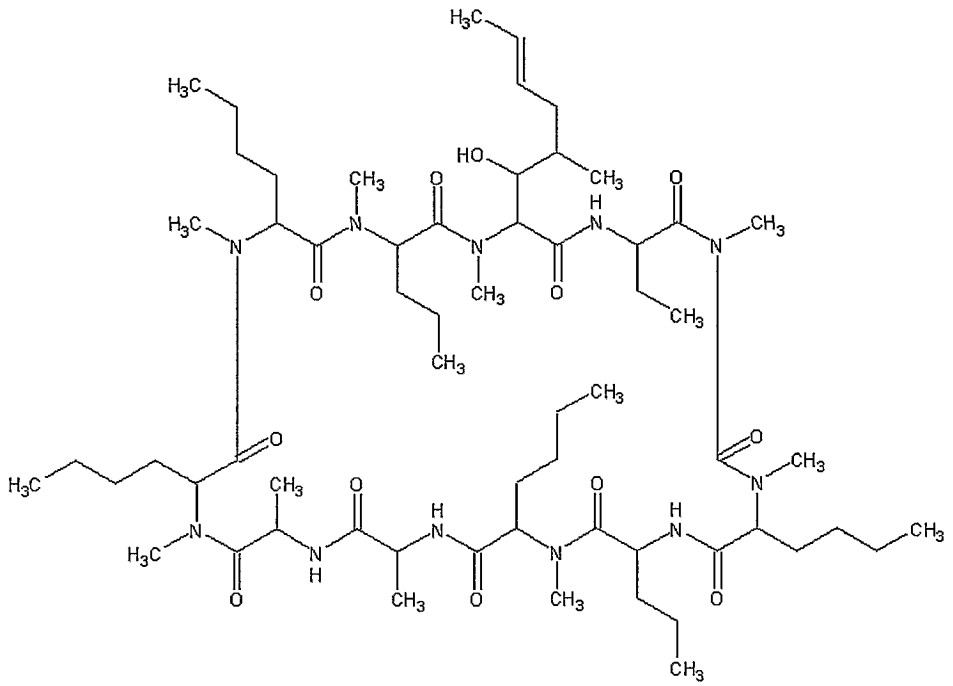
۱-۱-۱- شیمی سیکلوسپورین A

سیکلوسپورین A، سیکلو {[۴- (E)- بوتیل ۲-- آنیل - N , ۴- دی تیل - L - تراونیل]- L- هومو آلانیل – (N- متیل گلیکول) – (N- متیل – L- لوسیل) – L- متیل (- N- متیل – L- لوسیل) – L- آلانیل – D- آلانیل – (N- متیل – L- لوسیل) – (N- متیل –L- ولیل)-}است. سیکلوسپورین A به صورت پودر سفید یا تقریبا سفید و بدون بو است. وزن ملکولی آن ۱۲۰۲/۶ دالتون و فرمول بسته آن $C_{62}H_{111}O_{12}$ می باشد، شکل (۱-۱). بیشینه جذب آن در طول موج بین ۲۰۸ تا ۲۱۵ نانومتر است.

---

1. Cyclosporine
2. Hydrophob
3. Immunosuppressant

سیکلوسپورین در اتانول، متانول، استون، اتر و کلروفوم محلول و در آب و هیدروکربن های اشباع شده بسیار کم محلول است [۳-۱].



شکل ۱-۱: ساختمان شیمیایی سیکلوسپورین

۱-۱-۲- کاربردهای درمانی

سیکلوسپورین یک مهار کننده قوی سیستم ایمنی است، که همراه با کورتیکو استروئیدها و گاهی با سایر مهارکننده های ایمنی، در پیوند عضو یا بافت برای پیش گیری از پس زدن پیوند یا کنترل و درمان پس زدن پیوند در بیمارانی که قبلا با مهار کننده های ایمنی دیگر درمان می شده اند به کار می رود. سیکلوسپورین علاوه بر پیوند اعضاء، برای ممانعت و درمان(GVHD)[1] که یک مشکل عمده مغز استخوان می باشد نیز مصرف می شود. این دارو همچنین در بیماری هایی که فاکتورهای ایمنی به نوعی در آنها دخالت دارند مانند آسم[2]، آنمی آپلاستیک[3]، سندرم بهجت[4]، دیابت ملی توس[5]، بیماری های کلیه گلومرولار[6]، میاستنی

[1] . Graft versus host deases
[2] . Asthma
[3] . Anemia aplastica
[4] . Behcet syndrom
[5] . Diabetes mellitus
[6] . Golumerular

گـراویس[۱]، نارسـایی صـفراوی، آرتریـت[۲]، روماتوئیـد[۳]، سـارکوئیدوزیس[۴]، التهـاب sclera[۵]، التهـاب urea[۶]، اسکرودرما[۷] و نقص های پوستی مختلف خصوصا سپوریازین[۸] و درماتیت آتوپیک[۹] به کار می رود [۱،۴].

۱-۱-۳- اشکال داروئی

سیکلوسپورین به صورت فراورده خوراکی و تزریقی موجود است. فـراورده هـای خـوراکی شـامل کپسـول سیکلوسپورین ۲۵، ۵۰، ۱۰۰میلی گرمـی و محلـول خـوراکی ۱۰۰ میلـی گـرم در میلـی لیتـر مـی باشـد. سیکلوسپورین تزریقی ۵۰ میلی گرمی در میلی لیتر است. شکل داروئی جدیـد سیکلوسـپورین یـک میکـرو امولسیون خوراکی است که به صورت کپسول های ۲۵، ۱۰۰ میلی گرمی و محلول ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر می باشد [۹۱].

۱-۱-۳-۱- اسامی تجارتی

اسامی تجارتی شامل Sandimmum ، Cousupren است. نام تجارتی میکرو امولسیون جدید ارائه شده به بازار Neoral می باشد .

۱-۱-۳-۲- شرایط نگهداری

فرآورده های حاوی سیکلوسپورین باید در ظروف کاملا در بسته و دور از نور نگهداری شوند [۳].

۱-۲- تاریخچه استفاده و فیتوشیمی قارچ *Tolypocladium inflatum* Gams

[1]. Myasteni Graveis
[2]. Arteritis
[3]. Romatoid artrit
[4]. Sarcoidosis
[5]. Scleritis
[6]. Ureitis
[7]. Scleroderma
[8]. Psoriasis
[9]. Diermatitis atopica

با شروع جنگ جهانی دوم، جنبش جدیدی برای کمک به هزاران انسانی که به نوعی دچار آسیب دیدگی شده بودند، مخصوصا آنهایی که در اثر سوختگی شدید هیچ امیدی بـه کمـک بـه آنهـا وجـود نداشـت بـین دانشمندان جهان آغاز گردید، تلاش بر این استوار بود که پوست جدید و سالمی را به بدن های آسیب دیـده آنها پیوند زنند.

در این میان پروفسور پیتر مداوار[1] جانورشناس انگلیسی از دانشگاه آکسفورد شروع بـه تحقیـق و بررسـی مشکلات ناشی از پیوند پوست کرد. در این تحقیق و بررسی او به اهمیت سیستم ایمنی بدن در پیوند اعضـا پی برد و توانست جایزه نوبل ۱۹۶۰ در زمینه فیزیولوژی و داروسازی را نصیب خود کند. نتایج وی حـاکی از افزایش غلظتی گلبول های سفید در پلاسمای خون بود که سبب پس زدن عضو پیوندی می شد [۵].

از آن زمان به بعد بسیاری از دانشمندان به دنبال ترکیباتی بودند که بتوانند از خود خاصیت مهارکنندگی ایمنی نشان دهند.

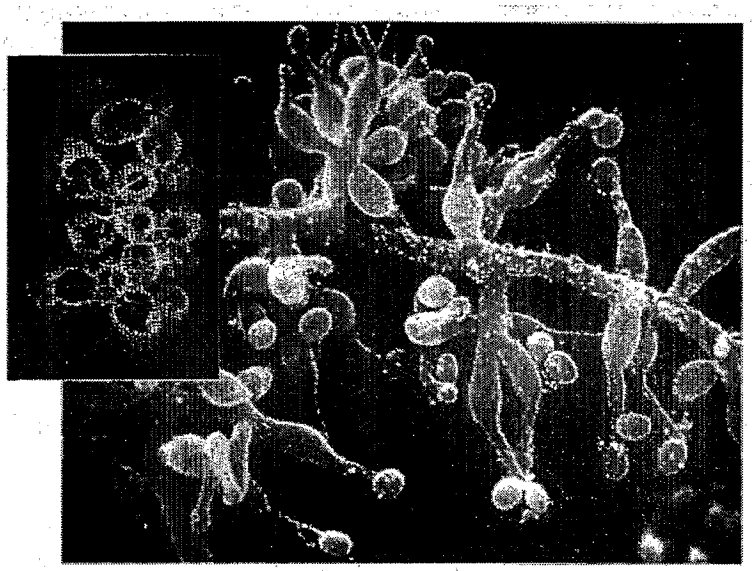
در سال ۱۹۶۹ دکتر هنس پیتر فری[2] که همراه با همکارانش در شرکت Sandoz که روی ضد قارچ هـای آنتی بیو تیکی فعالیت می کردند، توانست قارچی با خواص ویژه را کشـف کننـد. تمـام کسـانی کـه در ایـن شرکت فعالیت می کردند در تمام سفرهای خود چه کاری و چه تفریحی به دنبال نمونه های خـاکی جدیـد برای کشف میکروارگانیسم های موثر می گشتند.

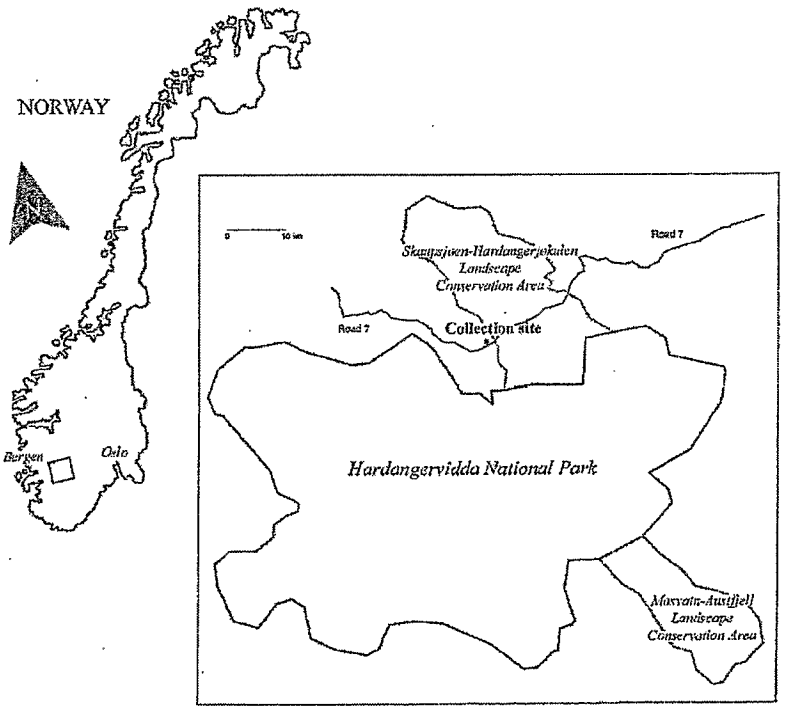
در سال ۱۹۶۹ دکتر فری و همسرش در سفری به نروژ در مسیر اسلو[3] به بـرگن[4] از زمـین هـای مسـطح اطراف کوه های هاردانگرویدا[5] نیز گذشتند و هر جا که منظره ای زیبا می یافتند توقف کرده و دکتـر از ایـن فرصت های پیش آمده استفاده می کرد و به جمع آوری نمونه های خاکی می پرداخت. در این سفر او بیش از پنجاه نمونه خاکی جدید جمـع آوری کـرد بـه طـوری کـه یکـی از آن نمونـه هـا، همـان قـارچ معـروف *Tolypocladium inflatum* Gams بود [۶].

---

1. Dr Sir Peter B.Medawar
2. Hans Peter Frey
3. Oslo
4. Bergen
5. Hardangervidda

این نمونه قارچی برای اولین بار در سوم سپتامبر سال ۱۹۶۹ در حاشیه ریکسوی[1] بین دریاچه ارتـرن[2] و دیرانات[3] در یک ارتفاع در حدود ۱۲۰۰ متری از کشور نروژ جمع آوری شده بود، شکل (۱-۲) [۶].





شکل ۱-۲: قارچ *Tolypocladium inflatum* Gams و موقعیت جغرافیایی جمع آوری توسط دکتر فری [۶]

[1]. Riksvei
[2]. Orteren
[3]. Dyranut

شرکت Sandoz تحقیق و بررسی روی قارچ جمع آوری شده را آغاز کرد و پس از تلاش های فراوان در سال ۱۹۷۱ بورل[1] واستاهلین[2] به همراه تیم زیر نظرشان توانستند سیکلوسپورین را از این قارچ استخراج کنند و خواص مهار کنندگی ایمنی قوی[3] این ترکیب جدید را نیز کشف کنند [۵].

در مراحل بعدی این نمونه قارچ علاوه بر نروژ در مناطقی از آمریکا، سوئد و قسمت های وسیعی از کانادا نیز مشاهده گردید [۶].

در سال ۱۹۷۸ کالن[4]، جراح انگلیسی برای اولین بار از سیکلوسپورین برای جراحی پیوند اعضا در خوک ها استفاده کرد و نتایج مثبتی بدست آورد. در مراحل بعدی از این دارو روی انسان ها نیز استفاده شد و نتایج شگفت انگیزی مشاهده گردید. در هفت عمل جراحی پیوند کلیه با استفاده از این دارو، پنج عمل با موفقیت انجام شد [۵].

۱-۳- آنالیز به کمک ستون های هیدروفیلیک Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

۱-۳-۱- مشکلات کلی ستون های نرمال[5] (NP) و معکوس[6] (RP)

استفاده از ستون های نرمال و معکوس در کروماتوگرافی به حدود ۳۰ سال پیش از ستون های هیدروفیلیک بر می گردد [۶]. از آنجا که گستره وسیع تری از ترکیبات با ستون های معکوس قابل جداسازی هستند، کاربرد ستون های معکوس به مراتب از نرمال بیشتر است. ستون های معکوس توانایی شناسایی ترکیبات نیمه قطبی و غیر قطبی که دارای خصلت قطبیت لحظه ای هستند را نیز، دارا می باشند. فاز متحرک این ستون ها، حلال های قطبی هستند و در نتیجه مولکول هایی که حتی در خصلت قطبیت

---

1. Jean-francois Borel
2. Hatmann F.Stahelin
3. Immunosuppressant
4. Sir Roy Calne
5. Normal phase
6. Reversed phase

لحظه ای با یکدیگر تفاوت دارند، قابل تمییز دادن می باشند. در صورتی که در هنگام استفاده از ستون های نرمال، به واسطه فاز متحرک غیر قطبی، تمام ترکیبات نیمه قطبی و غیر قطبی که تفاوت قطبیت آنها بسیار به هم نزدیک است به راحتی در فاز متحرک حل شده و بدون برهمکنش با فاز ساکن، از ستون خارج شده و قابل جداسازی از هم نمی باشند. همچنین ستون های معکوس، توانایی بسیار بالاتری برای جداسازی بسیاری از ترکیبات قطبی و بیولوژیکی را دارند. در ستون های نرمال، برقراری تعادل نمونه ها بین فاز متحرک و ساکن به کندی صورت گرفته و به واسطه وجود گروه های عاملی مختلف روی فاز ساکن این ستون ها پیک ها پهن و دم دار[1] می شوند. همچنین با تغییر غلظت نمونه در ستون های نرمال، تا حدی مکان پیک ها جا به جا می گردند [۷].

در ستون های معکوس چون فاز متحرک قطبی است امکان استفاده از روش های زوج یون[2] و مایسل[3] کروماتوگرافی برای آنالیز ترکیبات قطبی و یونی علاوه بر مولکول های غیرقطبی وجود دارد [۸]. از طرفی حلال های مورد استفاده دراین نوع ستون ها نسبت به کروماتوگرافی مایع نرمال سمیت کمتری دارند.

دلایل ذکر شده همگی نشان گر کارایی بالاتر ستون های معکوس نسبت به نرمال می باشد. اما ستون های معکوس به نوبه خود با محدودیت هایی روبرو هستند.

دسته ای از ترکیبات بیولوژیکی و قطبی مانند پروتئین ها و پپتیدها به علت قطبیت زیادشان برهمکنش های مناسبی با ستون های معکوس ندارند، برای حل این مشکلات، از یکسری ترکیبات[4] آلی در فاز متحرک استفاده می شود. این حلال های غیرقطبی استفاده شده در فاز متحرک، از قطبیت فاز متحرک کاسته، سبب می شوند گونه های قطبی که به راحتی در فاز متحرک اولیه حل می شدند و از ستون خارج می گشتند با کاهش قطبیت فاز متحرک، تمایل آن ها به این فاز کمتر، برهمکنش بیشتری با ستون داشته و در نتیجه جداسازی ها بهتر می گردد. با اینحال هنوز مواردی وجود دارند که حتی با اضافه کردن حلال های آلی نتایج خوبی حاصل نمی شدند [۹].

---

1. Tailing
2. Ion pair
3. Micellar chromatography
4. Admixtures