١٠٧٨٤٦

۸۷/۱/۱۰۰۶۴۷
۸۷/۱۰/۱۴

دانشگاه شهید بهشتی
پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته فیتوشیمی

عنوان:

توسعه فازهای ساکن کایرال بر پایه مشتقات وانکومایسین جهت جداسازی انانتیومرهای ترکیبات طبیعی توسط میکروستون های کروماتوگرافی مایع

دانشجو
مرتضی غلامی دون

استاد راهنما
دکتر علیرضا قاسم پور

۱۰۷۸۳۶

دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد

بازگشت به مجوز دفاع شماره ۲۰۰/۲۳۰۳/ت/د مورخ ۸۶/۷/۲ مدیر محترم تحصیلات تکمیلی، پایان نامه آقای **مرتضی غلامی دون** به شناسنامه شماره ۲۳ صادره از **بابل** متولد ۱۳۶۱ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته فیتو شیمی

با عنوان:

توسعه فازهای ساکن کایرال بر پایه مشتقات وانکومایسین جهت جداسازی انانتیومرهای ترکیبات طبیعی توسط میکروستون های کروماتوگرافی مایع

به راهنمایی:

آقای دکتر علیرضا قاسم پور

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۸۶/۶/۲۸ 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 ۱۸/۴ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

ردیف	هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱-	استاد راهنما:	آقای دکتر علیرضا قاسم پور	دانشیار	
۲-	داور نماینده شورای تحصیلات تکمیلی:	آقای علی سنبلی	مربی	
۳-	داور خارجی:	آقای دکتر سیدحمید احمدی	استادیار	
۴-	داور داخلی:	آقای دکتر حسن رفعتی	استادیار	

از خداوند بزرگ سپاسگزارم که مرا یاری کرده است تا این مرحله از تحصیلات را با موفقیت به پایان برسانم و دلگرمی من اینست که بزرگواری و لطفش در باقی مراحل زندگی با من خواهد بود. در این دو سال، فرصت آشنایی با انسان هـایی را داشـته ام کـه زنـدگیم، اندیـشیدنم و راهـم را دگرگـون کرده اند. انسان هایی که زندگی شان و راهشان برای من امیدی خواهد بـود بـرای همچنـان پـیش رفتن، امیدی برای تعهد به ساختن و امیدی برای ناآشنایی همیشگی با واژه ای به نام هراسیدن در این راه.

از آقای دکتر قاسم پور که حق شناسی خود را نسبت به ایشان چه به ایـن خـاطر کـه اسـتاد مـن بوده اند و چه به این خاطر که نهایت بزرگوارانه زیستن را به من آموخته اند، نمی توانم پنهان کنم، سپاسگزارم. از اساتید، کارکنان و دانشجویان دوره های مختلـف پژوهـشکده گیاهـان و مـواد اولیـه دارویی که در طی این دو سال تحصیل به من کمک کردند، تشکر میکنم.

از دوستان بزرگوار آقایان صمد ابراهیمی، سعید نوجوان، رضا علیزاده، محمود احمدی، بهور اصغری، وحید کیانپور، مهدی عیاری، علیرضا مشعوف، حسین هاشم پور و از همکلاسی هـای عزیـز، حـسن رضا دوست، یوسف دشتی، فاطمه مزرعتی، فاطمه میرزاجانی، مریم خواجویی، زهرا برامـی و سـهی احمدی که روزهایی خوب با یکدیگر داشتیم، تشکر کرده و برایشان آرزوی سربلندی و شادی دارم.

من این ودیعه، به دست زمانه می سپرم — زمانه زرگر و نقّاد هوشیاری بود

سیاه کرد مس و روی را به کوره ی وقت — نگاهداشت به هر جا زر عیاری بود

چکیده

توسعه تکنیک های مرتبط برای آنالیز کایرالیتی در ترکیبات دارویی، طبیعی و سموم کشاورزی از مباحث مهم در تحقیقات امروزه است. در این میان ستون های میکرو برای کروماتوگرافی مایع به علت سازگاری مناسب در اتصال به اسپکترومترهای جرمی، مصرف کم حلال و توانایی بالا در جداسازی مواد از اهمیت بالایی برخوردارند. در این کار از فاز ساکن سنتز شده بر اساس آنتی بیوتیک های بزرگ حلقه برای جداسازی دسته وسیعی از ترکیبات شامل اسید های آمینه، داروهای سنتزی و ترکیبات طبیعی استفاده شده است. محصولات ناشی از تخریب کریستالی وانکومایسین برای اولین بار در یک دسته جدید از بسترهای جامد سیلیکا مورد استفاده قرار گرفته اند. یک ستون میکرو تهیه و پس از پر شدن با فاز ساکن سنتزی، به عنوان بستر جداسازی در دستگاه کروماتوگرافی مایع مورد استفاده قرار گرفت. این ستون دارای توانایی به مراتب چشمگیرتری در جداسازی، از انواع مشابه بوده است. این توانایی را میتوان به واکنش شیمیایی بهینه شده برای تهیه فاز ساکن کایرال، توانایی های ویژه محصولات ناشی از تخریب کریستالی وانکومایسین در جداسازی و انتخاب مناسب فاز متحرک در آنالیزها نسبت داد.

مقدمه

۱- اهمیت کایرالیتی	۲
۲-کایرالیتی در صنایع دارویی	۳
۳-اهمیت کایرالیتی در ترکیبات طبیعی	۳
۴- روش‌های جداسازی کایرال	۱۲
۴-۱ روش‌های کلاسیک	۱۲
۴-۲ روش‌های نوین	۱۲
۵- روش های کروماتوگرافی جداسازی کایرال	۱۳
۵-۱ تکنیک های مستقیم	۱۳
۵-۲ تکنیک های غیر مستقیم	۱۳
۶- اساس جداسازی های کایرال	۱۳
۷- انواع فازهای ساکن کایرال	۱۵
۷-۱ فازهای ساکن کایرال پلی ساکاریدی	۱۵
۷-۲ فازهای ساکن بر پایه سیکلودکسترین	۱۹
۷-۳ فازهای ساکن بر پایهٔ پروتئین ها	۲۱
۷-۴ فازهای ساکن بر پایه اترهای تاجی	۲۳
۷-۶ فازهای ساکن بر اساس جابجایی لیگاند	۲۷
۷-۷ فاز های ساکن بر اساس گلیکو پپتید های بزرگ حلقه	۳۰
۷-۷-۱ مشتقات آنتی بیوتیک های بزرگ حلقه	۳۳
۷-۷-۲ ساختارهای کریستالی حاصل از تخریب وانکومایسین	۳۴
۸- اضافه کردن ملکول کایرال به فاز متحرک	۳۶
۹- مقایسه ستون‌های میکروکایرال با ستون‌های آنالیتیکال	۳۷

۱۰- مزایای استفاده از میکرو HPLC ۳۷

۱۱- نحوه ساخت ستون میکرو کایرال ۳۸

۱۲- ساخت فاز ثابت کایرال ستون کروماتوگرافی مایع ۳۸

۱۲-۱ ستون های با استفاده از Spacer ۳۸

۱۲-۲ ستون های دیول ۳۹

بخش تجربی

۱- دستگاهوری ۴۲

۱-۱ HPLC ۴۲

۱-۲ دستگاه پر کردن ستون HPLC ۴۲

۲- دستگاه FT-IR ۴۲

۳- مواد و معرف‌های بکار رفته ۴۲

۴- پر کردن فاز ثابت آماده شده در ستون‌های میکرو کروماتوگرافی مایع ۴۳

۵- روش تهیه فاز ساکن کایرال ۴۳

۶- تخریب شدن وانکومایسین به محصولات کریستالی ۴۵

۷- آنالیز وانکومایسین با اسپکترومتری جرمی ۴۵

۸- آنالیز مواد اولیه و محصولات با طیف سنجی مادون قرمز ۴۶

۹- استخراج آتوروستاتین از قرص ۴۶

بخش نتایج و بحث

۱- آنالیز وانکومایسین با اسپکترومتری جرمی ۴۸

۲- آنالیز مواد اولیه و محصولات با طیف سنجی مادون قرمز ۴۹

۳- جداسازی ترکیبات کایرال ۵۰

۳-۱ ماندلیک اسید ۵۰

۳-۲ آتروپین ۵۴

۴- ۲ فلوکستین ۵۶

۲-۵ اسیدهای آمینه ۵۷

۲-۶ آملودیپین ۶۲

۲-۷ بررسی میزان خلوص انانتیومری قرص های تجاری آتوروستاتین ۶۵

۷-۲-۱ جداسازی انانتیومرهای آتوروستاتین ۶۷

بخش مراجع و منابع

بخش تئوری

۱- اهمیت کایرالیتی

دلایل بسیاری وجود دارند که موجب اهمیت کایرالیتی در دانش امروزی می شوند. تفاوت فعالیت بیولوژیکی انانتیومرها به صورت های مختلفی در محیط بدن نمایان می‌شود. در یک محیط غیر کایرال، انانتیومرهای یک ترکیب خواص فیزیکی و شیمیایی یکسانی دارند ولی در محیط کایرال، آنها مولکول های متفاوتی ازنظر سرعت نفوذ، متابولیسم، دفع، سمیت و فعالیت‌های فارماکودینامیکی خواهند بود. گاهی اوقات یک انانتیومر دارای فعالیت بیشتری از انانتیومر مقابل است و گاهی یک انانتیومر بی اثر و گاهی دارای اثر سمی برخلاف انانتیومر خود است (۱). در بعضی موارد نیز هریک از انانتیومرها بعنوان یک داروی خاص بکار می روند. اهمیت کایرالیتی درصنایع دارویی از داروی تالیدومید شروع شد، که یکی از انانتیومرها دارای خاصیت آرام بخشی و دیگری موجب جهش ژنی شد که به علت مصرف شدن دارو راسمیک این دارو توسط زنان باردار، فرزندان نسل اول ناقص الخلقه بوجود آمدند و هم اکنون گزارش های زیادی از ناقص الخلقه بودن فرزندان نسل دوم مصرف کنندگان این دارو منتشر می شود. این توجه در نهایت به همه داروهای دارای مرکز کایرال گسترش پیدا کرد، بصورتیکه اداره غذا و داروی آمریکا (FDA)[1] از سال ۱۹۹۴ هیچ داروی راسمیکی را ثبت نمی کند (۱). علاوه بر فعالیت دارویی انانتیومرها که بعلت کایرال بودن پروتئین ها و پذیرنده های زیستی[2] از همدیگر متفاوت است، سایر خواص بیولوژیکی آنها همانند، بو و مزه نیز بعلت برهمکنش آنها با پذیرنده های دهان وزبان و بویایی متفاوت است. بعنوان مثالی برای این امر می توان از آلکالوئید طبیعی آسپارژین نام برد که انانتیومرS آن دارای مزه تلخ و انانتیومر R دارای طعمی شیرین است. همینطور کارون که انانتیومرS آن دارای عطر و طعم زیره و انانتیومر R آن دارای عطر و طعم نعناع می باشد و همه این ها علاوه بر فعالیت بیولوژیکی و دارویی متفاوت این انانتیومرها ا ست.

[1] Food and drug administration
[2] Bioreceptors

۲-کایرالیتی در صنایع دارویی

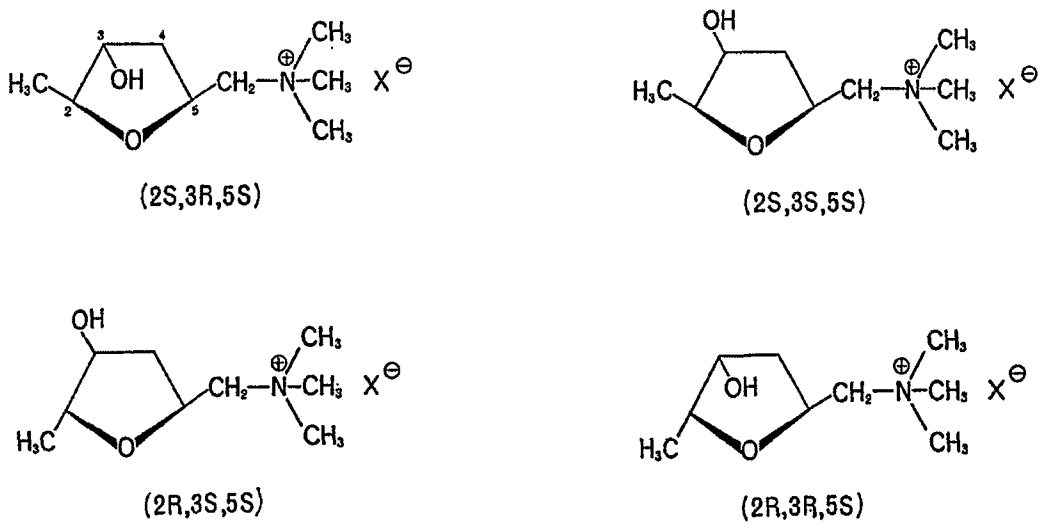
از نظر اقتصادی تهیه داروها از راه جداسازی انانتیومرها بر سنتز نا متقارن انانتیومرها ارجح است(۱) و بیشتر شرکت‌ها تمایل به تهیه داروهای خالص انانتیومری از راه جداسازی مواد اولیه راسمیک دارند. به همین دلیل توسعه روش‌های جداسازی ارزان، تکرارپذیر و سریع امری ضروری و مورد بحث است. این امر واضح است که گسترش روش‌های نوین و مؤثرتر جداسازی، نیازمند دانشی درست از روش‌های موجود و اصول علمی حاکم بر آنها بخصوص مکانیسم های جداسازی های کایرال است. بنابراین دانستن مکانیسم های حاکم بر این جداسازی ها، برای توسعه کارایی و بهبود توانایی های این روش ها ضروری است.

۳- اهمیت کایرالیتی در ترکیبات طبیعی:

تمام بحث های موجود در مورد اهمیت کایرالیتی در داروهای سنتزی، در مورد ترکیبات طبیعی دارای مرکز کایرال نیز صادق است. در بسیاری موارد محیط بیولوژیکی قادر به سنتز یک انانتیومر به میزان بیشتری است. ولی قاعده کلی اینست که همیشه مقداری از انانتیومر مقابل نیز در گیاه یا محیط تخمیر وجود دارد، و این انانتیومر ها، دارای خواص متفاوت بیولوژیکی و دارویی خواهند بود. همینطور بعلت ذخیره شدن انانتیومر ها در گیاه، به مرور زمان امکان تبدیل شدن انانتیومرها به هم و در نتیجه از بین رفتن خلوص انانتیومری وجود دارد (۲).

در ادامه بحث به ذکر مثال هایی از تفاوت بیولوژیکی چند انانتیومر طبیعی و سپس به مثال هایی از آنالیزهای انجام شده برای بررسی کایرالیتی در ترکیبات طبیعی پرداخته خواهد شد.

موسکارین ها[1] دسته ای از ترکیبات طبیعی آلکالوئیدی هستند که جزء آلکالوئیدهای آلیفاتیک طبقه بندی می شوند، نکته جالب در مورد این ترکیبات این است که مشتقات مختلف این دسته، از تفاوت در کایرالیتی کربن های حلقه ی فورانی بوجود می آیند. در شکل صفحه بعد مثال هایی از این ترکیبات آورده شده است.

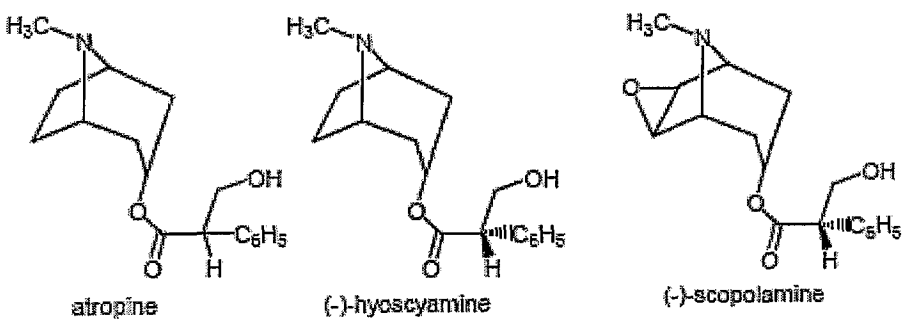


شکل ۱-۱ ساختار چند ترکیب موسکارینی

تروپان[2] آلکالوئیدها از ترکیباتی هستند که از گونه های Hyoscyamos niger و Atropa belladonna بدست می آیند و بعنوان مسکن، ضددرد و شکل کننده عضلات بکار می روند. این خانواده دارای ترکیباتی همانند آتروپین[3]، اسکوپولامین[4] و کوکائین[5] است. با توجه به وجود مرکز

[1] Muscarines
[2] Tropane alkaloids
[3] Atropine
[4] Scopolamine
[5] Cocaine

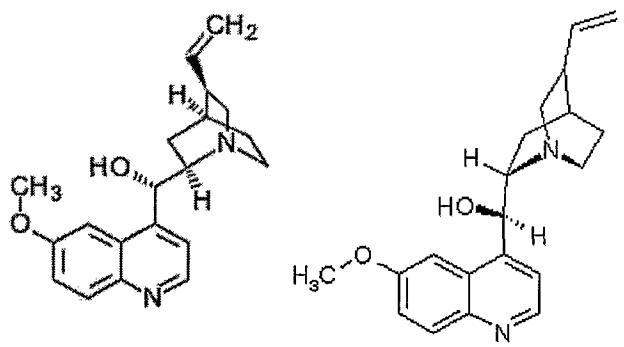
کـایرال در ایـن ترکیبـات دو انـانتیومر وجـود خواهـد داشـت و ایـن امـر مـشخص شـده اسـت کـه انـانتیومرL-Hyoscyamine از انـانتیومر D-Hyoscyamine حـدود ۳۰ مرتبـه فعالیـت بیولـوژیکی بیشتری دارد(۴,۳).



شکل ۱-۲ ساختار چند تروپان آلکالویید

کینین[1] یک آلکالوئید است که بعنوان مؤثرترین داروی ضد مالاریا شناخته شده است، اما ایزومر دیگر آن که دارای آرایش متفاوت در کربن های کایرال خود است داروی کینیدین[2] می باشد که یک داروی تنظیم کننده عملکرد قلب است.(۵)

[1] Quinine
[2] Quinidine



کینیدین کینین

شکل ۱-۳ ساختار چند سینکونا آلکالویید

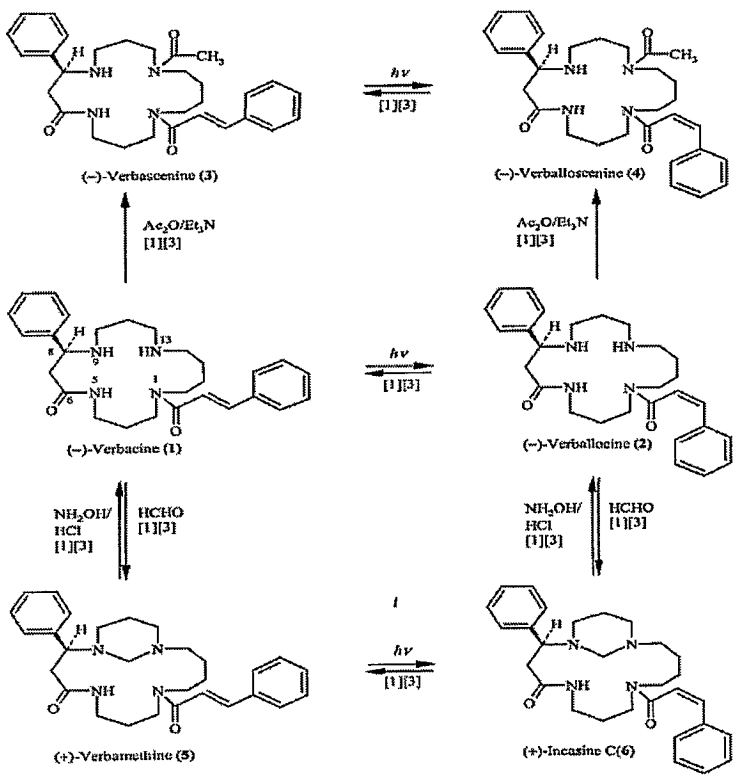
همینطور افدرین که داروی ضد آسم است و انانتیومر فعال آن دارای ساختار (1S,2S) بوده و انانتیومر مقابل فاقد فعالیت دارویی است. این تفاوت ها در مورد انانتیومرهای روغن های اسانسی نیز مطرح است، بطوریکه در بررسی انجام شده توسط پرچینتو در سال ۲۰۰۷ مشخص شده است که انانتیومرهای ترکیب کاروون[1] دارای اثرات متفاوتی روی سیستم اعصاب مرکزی هستند و انانتیومر R موجب اثرات افسردگی شدیدتری نسبت به انانتیومر S می شود (۶).

همچنین بررسی متابولیسم داروی کتوپروفن توسط آنزیم لیپاز B در حلال های شامل متیل ایزوبوتیل کتون (MTBE) بهمراه R و S کارون نشان داد که R کارون موجب استریفیکا سیون سریعتر داروی مورد بررسی می شود.

اسپرمین[2] آلکالوئیدها جزء آلکالوئیدهای آلیفاتیکی هستند که نقش حفاظت دانه های گرده را در مقابل نور UV دارند. با برخورد نور آفتاب به گرده، این مولکول ها با جذب طول موج های UV دچار

[1] Carvon
[2] Spermine

تغییر آرایش فضایی از حالت های سیس و ترانس و یا R و S می شوند و به این ترتیب دانـه گـرده در مقابل نور UV محافظت می شود.

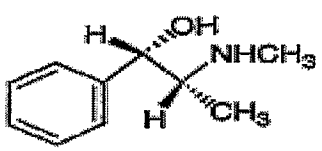


شکل ۱-۴ تبدیلات متقابل اسپرمین الکالوئیدها در اثر نور

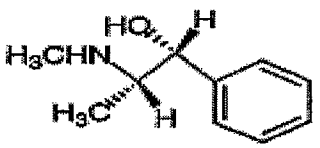
یکی از گزارش هایی که این ترکیبات را بررسی کرده است در سال ۱۹۹۸ توسط دراندارووف[1] و همکارانش انجام شده و نشان داده است که آلکالوئیـد (-) ورباسـنین[2] در اثـر تـابش UV ابتـدا دچـار تبدیلات سیس و ترانس شده و در نهایت به ایزومر(+) تبـدیل مـی شـود، ایـن مطالعـه توسـط CD و ORD انجام شده است(۷).

[1] Drandarov
[2] Verbascenine

جداسازی کاتکین[1] و اپیکاتکین[2] توسط ستون کایرال سیکلودکسترین و در سیستم میسلار الکتروکینتیک کروماتوگرافی از عصاره چای توسط شوجی کومادا گزارش شده است(۸). بوشان[3] و همکارانش جداسازی انانتیومرهای افدرین[4] و آتروپین را با سیستم کروماتوگرافی لایه نازک گزارش کردند(۹).



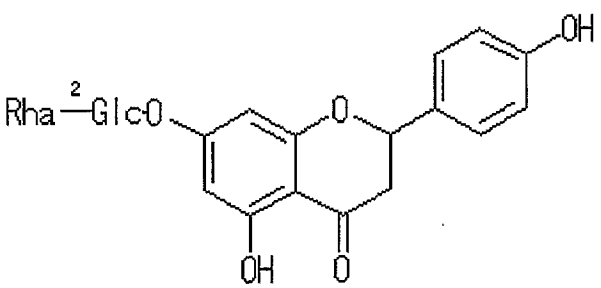
(-)-Ephedrine



(+)-Ephedrine

شکل ۱-۵ انانتیومرهای افدرین

جداسازی انانتیومرهای ترکیب نارینگین[5] که یک فلاونون گلیکوزیدی است درگیاه گریپ فروت توسط HPLC نیز گزارش شده است (۱۰).

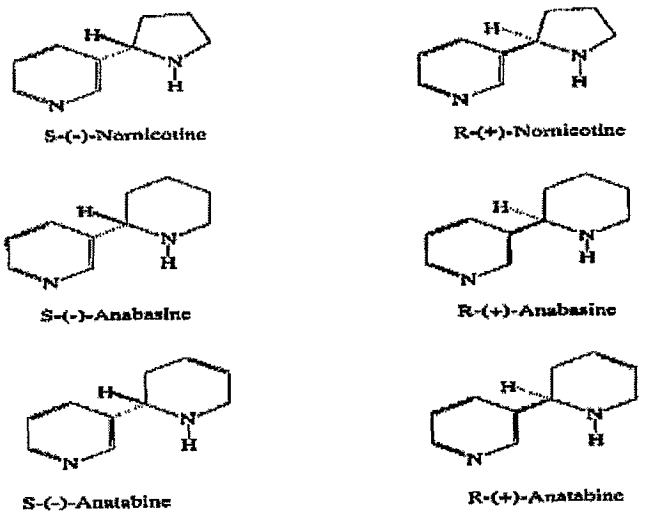


شکل ۱-۶ انانتیومرهای فلاونون نارینگین

[1] Catechin
[2] Epicatechin
[3] Bhushan

[4] Ephedrine
[5] Naringin

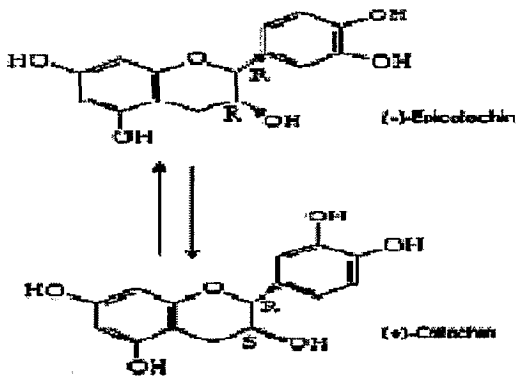
آرمسترانگ[1] در سال ۱۹۹۹ مقاله ای در مجله کایرالیتی به چاپ رساند که در آن جداسازی انانتیومرهای نیکوتین، آناباتین، آنابازین از تنباکو بوسیله GC-MS نشان داد که در اکثر این الکالوئیدها انانتیومر R در صد بیشتری دارد(۱۱).



شکل ۱-۷ انانتیومرهای آلکالوییدهای تنباکو

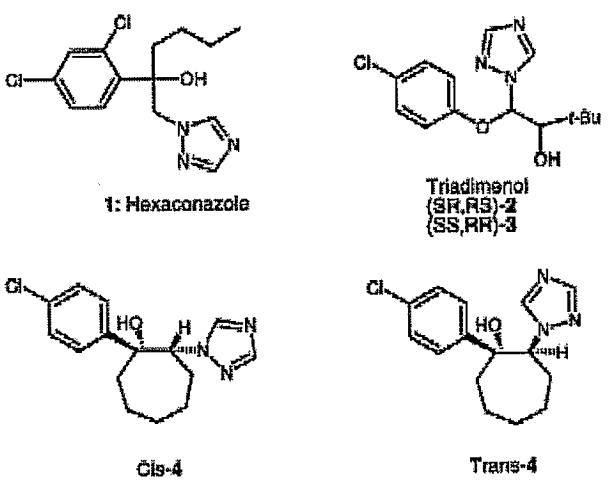
بررسی خلوص انانتیومری هیدروکسی اسیدها، کاتکین و آمینو اسیدها در گیاه کوکا با توجه به توزیع جغرافیایی گیاهان در سال ۲۰۰۷ توسط کالیجانتی انجام شد و درصد ناچیز انانتیومر D برای اسیدهای آمینه موجود در طبیعت وثابت سرعت واکنش تبدیل در دمای محیط کاملاً اندازه گیری شد(۱۲) .

[1] Armstrong



شکل ۱-۸ تبدیل حرارتی انانتیومرهای کاتکین و اپیکاتکین

جداسازی انانتیومرهای الکل های تری آزول که از قارچ ها بدست می آیند، بوسیله HPLC روی فاز ساکن پلی ساکاریدی نیز انجام شده است(۱۳).



شکل ۱-۹ ساختار انانتیومرهای تری آزول

گزارش های بسیار زیادی نیز از جداسازی انانتیومرهای روغن های اسانسی وجود دارد کـه در اکثـر موارد از دستگاه کروماتوگرافی گازی با ستون کایرال استفاده شده است و بررسـی بـسیار زیـادی روی

۴- روش‌های جداسازی کایرال

روش‌های مختلفی برای جداسازی انانتیومرها چه در مقیاس آزمایشگاهی و چه تهیه‌ای[1] استفاده شده‌اند که به دو دسته قابل دسته بندی اند:

۴-۱: روش‌های کلاسیک شامل تخریب یکی از انانتیومرها توسط آنزیم و جداسازی انانتیومر باقیمانده و همینطور روش کریستالیزاسیون انتخابی که شامل تشکیل نمک های دیاسترئومری و جداسازی دستی انانتیومرها از یکدیگر است. این روش ها، بعلت از بین رفتن یکی از انانتیومرها در تکنیک اول و محدودیت های کریستالیزاسیون، همانند نیاز به معرف کایرال خالص برای دیاسترومر شدن، واکنش کامل برای دیاسترومری شدن و مواردی دیگر در روش دوم، امکان تبدیل شدن به روش‌های متداول را ندارند و بنابراین این روش ها، محدودیت های زیادی برای انجام شدن در مقیاس آزمایشگاهی دارند و تنها در مواردی معدود مفید هستند .

۴-۲: روش‌های نوین که شامل تکنیک های اسپکتروسکوپی، الکتروفورزی، کروماتوگرافی، استفاده از غشاها و حسگرهای کایرال است.

درمیان این روش ها، تکنیک های کروماتوگرافی بعلت سرعت، کارایی بالا، تکرارپذیری مناسب و بویژه امکان استفاده در مقیاس تهیه ای جایگاه ویژه ای دارند. در این میان بیشترین گزارش ها مربوط به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[2] و البته سایر روش‌های وابسته به آن مانند کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی، کاپیلاری الکتروکروماتوگرافی، میسلار الکتروکینتیک کروماتوگرافی و کروماتوگرافی لایه نازک می باشد. اخیرا کاپیلاری الکتروفورز که دارای سرعت عمل زیاد، حد تشخیص پایین وحساسیت بالا می باشد، نیز به عنوان روشی در حال توسعه، برای جداسازی های کایرال مورد توجه قرار گرفته است، ولی باید توجه شود که با توجه به تکرارپذیری پایین، عدم توسعه فازهای کایرال جدید، نیاز به

[1] Preparative
[2] High Performance Liquid Chromatography

مواد مورد آنالیز در حالت یونی و عدم امکان کروماتوگرافی تهیه ای هنوز این تکنیک به عنوان روشی متداول در جداسازی کایرال شناخته نمیشود.

۵- روش های کروماتوگرافی جداسازی کایرال

۵-۱ تکنیک های مستقیم: روش مستقیم به دو صورت می تواند انجام پذیرد، که در یک روش می توان انتخابگر کایرال[1] را به درون فاز متحرک اضافه کرد که روی فاز ساکن کایرال یا غیر کایرال جذب خواهد شد. علت استفاده از این روش برای ستون کایرال، تمایل برای افزایش راندمان جداسازی ها است. در نگرش دیگر می توان از فاز ساکن کایرال استفاده کرد که در آن انتخابگر کایرال روی فاز ساکن با واکنش های شیمیایی ثابت شده است. روش افزایش انتخابگر کایرال به فاز متحرک نمی تواند روشی کاملا اقتصادی باشد، چون در هرآنالیز مقداری از انتخابگر کایرال که موادی گران هستند، هدر می رود. همچنین این نگرش در جداسازی های تهیه ای قابل استفاده نیست زیرا سپس باید این انتخابگر کایرال از نمونه جدا شود. بنابراین امروزه استفاده از فاز ساکن کایرال بعنوان متداول ترین روش در همه آزمایشگاه های آنالیزی، دارویی، بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی شناخته شده است.

۵-۲ تکنیک های غیر مستقیم: در روش غیر مستقیم ابتدا نمک دیاسترومری از راه افزایش انتخابگرکایرال به درون مخلوط راسمیک نمونه تشکیل شده و سپس جداسازی توسط کروماتوگرافی معمولی انجام خواهد شد.

۶- اساس جداسازی های کایرال

ستون های کایرال بوسیله انواع مختلف انتخابگرها همانند پلی ساکاریدها، آنتی بیوتیک های بزرگ حلقه، سیکلودکسترین ها، پروتئین ها، مدل های پیرکل، تعویض یونی و اترهای تاجی تهیه می شوند

[1] Chiral Selector