۸۴۱۰۱۱۸۷/۱
۸۸/۱/۳۰

دانشگاه شهید بهشتی

پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته فیتوشیمی

عنوان:

بهینه کردن فرآیند جداسازی 10-DAB III و تاکسول از گیاه سرخدار ایران با استفاده از پیش- استخراج آبی و جداسازی 10-DAB III در حضور Taxine B

نگارش:

علیرضا مشعوف

استاد راهنما:

دکتر علیرضا قاسم پور

۱۳۸۸/۱۲/۲۴

بهمن ۱۳۸۷

۱۱۱۱۷۱

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع شماره ۸۷/۱۰/۲۴ د/۲۰۰/۶۳۵۸ مورخ ۸۷/۱۰/۲۴ مدیر محترم تحصیلات تکمیلی، پایان نامه آقای علیرضا مشعوف به شناسنامه شماره ۸۲۹۲ صادره از تهران متولد ۱۳۶۱ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته فیتو شیمی

با عنوان:

بهینه کردن فرآیند جداسازی 10-DAB III و تاکسول از گیاه سرخدار ایران با استفاده از پیش - استخراج آبی؛ و خالص سازی 10-DAB III در حضور Taxine B

به راهنمایی:

آقای دکتر علیرضا قاسم پور

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۸۷/۱۱/۸ 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 ۱۹،۸ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

ردیف	هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱-	استاد راهنما:	آقای دکتر علیرضا قاسم پور	دانشیار	
۲-	داور خارجی:	آقای دکتر عباس حاج آخوندی	استاد	
۳-	داور داخلی:	آقای دکتر پیمان صالحی	استاد	

کار ما نیست شناسایی راز گل سرخ
کار ما شاید این است،
که در افسون گل سرخ شناور باشیم

سهراب سپهری

سپاسگذاری:

آن ناشناختنی را می‌ستایم که هر کس به شیوهٔ خویش در جستجوی اوست.

در پایان این مرحلهٔ تحصیلی، لازم می‌دانم از عزیزانی که از آغاز تا انجام این تحقیق مرا یاری نموده اند و از همراهی شان بهره مند بوده ام قدردانی کنم.

از پدر و مادر خوبم که موفقیت من ثمرهٔ زحمات و محبت‌های بی دریغ آنهاست سپاسگذارم. وجودشان مایهٔ دلگرمی و تلاش هرچه بیشتر من است.

تقدیر و سپاس فراوان از جناب آقای دکتر قاسم پور، استاد راهنمای گرامی که علاوه بر اینکه از جنبهٔ علمی پشتوانهٔ من بوده اند، آشنایی با ایشان و حضور در کنار ایشان تجربه های با ارزشی برایم به همراه داشته است.

از آقای دکتر صالحی عزیز که شخصیت و رفتار ایشان برای من الهام بخش و الگو بوده است سپاسگذارم. از آقای دکتر رفعتی برای زحمات فراوان، از جناب آقای دکتر موثق که برایم نمونهٔ یک انسان فرهیخته هستند، از آقای دکتر مهرداد برای توجه و کمک‌های فکری، همچنین از آقای دکتر نجفی، آقای سنبلی عزیز، آقای مهندس نژادابراهیمی و سرکار خانم دکتر حبیبی صمیمانه تقدیر و تشکر می‌کنم.

از برادر و دوست عزیزم، حسن رضادوست ممنونم که در مراحل مختلف این تحقیق، به من کمک نمود. از سرکار خانم فاطمه میرزاجانی برای کمک‌های علمی و نیز ویژگی‌های پسندیدهٔ اخلاقی شان ممنونم. از آقایان؛ مرتضی غلامی دون، محمود احمدی، حسین هاشم پور، مهدی عیّاری نوش آبادی، وحید کیان پور، بهور اصغری، رضا علیزاده، یوسف دشتی، دارا دستان، علی آرمیده، سعید ملایی، علیرضا پوررضا و خانم‌ها؛ نسیم دلیلیان، هاجر حیدری، پونه خلیق، سارا اسلامبولچی، معصومه نوروزی، مینا قهرمان زمانه، بهناز ثابتی و زهرا نظری که در این مدت افتخار همکاری و دوستی با ایشان را داشته ام و خاطراتی فراموش نشدنی را در ذهنم حک کردند از صمیم قلب سپاسگذاری می‌کنم. برای همه این عزیزان آرزوی شادی، خوشی و آرامش دارم.

علیرضا مشعوف

چکیده:

بحث تاکسول و آنالوگ‌های آن از جاذب ترین موضوعات در زمینه داروهای ضد سرطان می‌باشد. چرا که از یک سو، تأثیر شگرف آن بر روی انواع سرطان به ویژه سرطان سینه، تخمدان و ریه، به اثبات رسیده و از سویی دیگر، این ترکیب بسیار کمیاب و گرانقیمت است. تاکسول بطور طبیعی در مقادیر ناچیز در پوست گونه های مختلف درخت سرخدار (جنس *Taxus*)، که گیاهانی شدیداً دیررشد هستند، موجود است. جدا کردن پوست این درخت، منجر به مرگ آن می شود. اما یکی از روش‌های تولید صنعتی این دارو، نیمه سنتز آن از پیش ماده‌اش موسوم به 10-Deacetylbaccatin III (10-DAB III) است که به مقدار فراوان تر از تاکسول در همین گیاه وجود دارد و محل تجمع آن عمدتاً در برگ است که منبعی تجدید شونده محسوب می شود.

در این مطالعه تلاش شد تا براساس تفاوت قطبیت مولکول تاکسول و پیش ماده اش 10-DAB III، روشی مبنی بر استخراج در محیط آبی طراحی و بهینه سازی شود که با کمک آن، 10-DAB III با خلوص بالا و بازدهی مناسب از گیاه استخراج و جداسازی شود. ضمن اینکه تاکسول، تا حد امکان بدون تخریب یا کاهش مقدار در گیاه باقیمانده از استخراج باقی بماند، تا بتوان آن را با روش‌های بعدی، استخراج کرد. بدین ترتیب، با در اختیار داشتن مقدار مشخصی از این گیاه دیررشد، حداکثر استفاده از بابت حصول ترکیبات با ارزش از آن میسر شود.

مراحل مختلف کار به کمک HPLC فرانگری شد. در حین بسط این روش، یک ترکیب دیگر از خانواده تاکسوئیدها به نام Taxine B نمایان شد که به مقدار زیاد در گونهٔ ایرانی سرخدار وجود دارد. با کمک تکنیک های nano LC-FTMS و NMR ماهیت این ترکیب مشخص گردید و سعی شد تا جداسازی آن از 10-DAB III بررسی شود.

فهرست مطالب

فصل اول- تئوری

۱-۱- گیاه سرخدار (جنس Taxus) ---------- ۲

۱-۲- تاکسول (Taxol) ---------- ۳

۱-۲-۱ مکانیزم عمل تاکسول ---------- ۳

۱-۲-۲- تلاش برای درک رابطهٔ بین ساختار و فعالیت تاکسول ---------- ۶

۱-۲-۳- تولید تاکسول ---------- ۷

۱-۲-٤- تهیهٔ تاکسول از 10-Deacetylbaccatin III ---------- ۸

۱-۳- تاکسان ها ---------- ۹

۱-۳-۱- جداسازی و آنالیز تاکسان‌ها ---------- ۱۰

۱-٤- تغییر و تبدیلات متداول 10-DAB III در محیط آبی ---------- ۱۱

۱-٤-۱- اپیمریزاسیون روی کربن C7 ---------- ۱۱

۱-٤-۲- هیدرولیز گروه بنزوئیل روی کربن C2 ---------- ۱۵

۱-٤-۳- هیدرولیز گروه استیل روی کربن C4 ---------- ۱۶

۱-٤-٤- باز شدن حلقه اکساتان ---------- ۱۶

۱-۵- بحثی پیرامون Taxine B ---------- ۱۷

۱-۵-۱- معرفی ---------- ۱۷

۱-۵-۲- فعالیت بیولوژیکی ---------- ۱۸

۱-۵-۳- رفتار شیمیایی و طیف سنجی ---------- ۱۹

۱-۵-۵- استفاده در مطالعات SAR ---------- ۲۱

۱-٦- شناسایی ترکیبات طبیعی توسط nano LC-FTMS ---------- ۲۳

۱-۷- هدف و زمینهٔ تحقیق حاضر ---------- ۲٤

فصل دوم- بخش تجربی

۲-۱- مواد و نمونه‌های گیاهی ---------- ۲۹

۲-۱-۱- منبع گیاهی مورد استفاده ---------- ۲۹

۲-۱-۲- مواد و معرف‌های به کار رفته ---------- ۲۹

۲-۲- شرایط دستگاهی ---------- ۲۹

۲-۲-۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- ---------- ۲۹

۲-۲-۲- کروماتوگرافی تهیه‌ای- ---------- ۲۹

۲-۲-۳- سیستم کروماتوگرافی مایع- طیف سنج جرمی ---------- ۳۰

۲-۲-٤- رزونانس مغناطیس هسته ---------- ۳۰

۲-۲-٥- سیستم مایکروویو ---------- ۳۰

۲-۳- روش انجام آزمایش‌ها ---------- ۳۱

۲-۳-۱- استخراج در محیط آبی ---------- ۳۱

۲-۳-۲- استخراج به وسیلهٔ مایکروویو ---------- ۳۱

۲-۳-۳- خالص سازی نمونه‌های استخراج شده توسط مایکروویو ---------- ۳۲

۲-۳-٤- شرایط HPLC تجزیه‌ای ---------- ۳۲

۲-۳-٥- شرایط HPLC تهیه ای ---------- ۳۲

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- اجرای روش پتنت بر روی گونهٔ ایرانی سرخدار ---------- ۳٤

۳-۱-۱- بررسی کیفی فراورده روش توسط HPLC ---------- ۳٤

۳-۱-۲- بررسی محتوای محلول بالایی ---------- ۳٤
۳-۱-۳- اندازه گیری بازده کمّی روش ---------- ۳٦
۳-۲- استفاده از nano LC-FTMS برای شناسایی ترکیب ناشناس ---------- ۳۷
۳-۲-۱- محاسبه خطا در سنجش جرم ---------- ٤۲
۳-۳- استفاده از NMR برای تأیید ساختار ---------- ٤۳
۳-۳-۱- خالص‌سازی ترکیب توسط کروماتوگرافی تهیه‌ای ---------- ٤۳
۳-۳-۲- ^{13}C-NMR ---------- ٤٤
۳-۳-۳- ^{1}H-NMR ---------- ٤۹
۳-۳-٤- استفاده از NMR دوبعدی ---------- ٥۲
۳-٤- بررسی جداسازی با شویش به روش گرادیانت ---------- ٥۳
۳-٥- بهینه سازی مدت زمان استخراج در بازه‌های زمانی مختلف تا ۱ ساعت ---------- ٥٥
۳-٦- بررسی نقش شویش با محلول سدیم کربنات ---------- ٥٦
۳-۷- شبیه سازی فرآیند استخراج بر روی استاندارد ---------- ٥۸
۳-۸- بررسی تأثیر اسیدی کردن محیط ---------- ٥۹
۳-۹- بررسی تأثیر عصاره گیری پایه آبی بر روی محتوای شیمیایی گیاه باقیمانده ---------- ٦۰
۳-۱۰- استخراج آبی در بازه های زمانی مختلف ---------- ٦۱
نتیجه‌گیری نهایی ---------- ٦٤
پیشنهادات ---------- ٦٥
مراجع ---------- ٦۷

فهرست شکل‌ها و جداول

شکل ۱-۱: تصاویری از درختان سرخدار ---------- ۲

شکل۱-۲: ساختار شیمیایی تاکسول ---------- ۳

شکل۱-۳: مداخله تاکسول در مرحلهٔ G_2 چرخهٔ سلولی ---------- ٤

شکل۱-٤: پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول ---------- ٥

شکل۱-٥: نقش و میزان تاثیر هر یک از بخش‌های ساختاری تاکسول در فعالیت ضد توموری آن ------ ٦

شکل ۱-٦: ترتیب شماره گذاری اتم‌های کربن در مولکول تاکسول ---------- ۷

شکل ۱-۷: Docetaxel (Taxotere) ---------- ۷

شکل ۱-۸: 10-Deacetylbaccatin III ---------- ۸

شکل۱-۹: مراحل نیمه سنتز تاکسول از 10-DAB III ---------- ۹

شکل ۱-۱۰ : اپیمریزاسیون در یک مولکول قند ---------- ۱۲

شکل ۱-۱۱ : مکانیزم Retroaldol / aldol ---------- ۱۲

شکل ۱-۱۲: اپیمریزاسیون یک ترکیب با ساختار β-هیدروکسی کربنیل ---------- ۱۳

شکل ۱-۱۳ : نقش گروه OH روی کربن C10 در تسریع اپیمریزاسیون تاکسان‌ها ---------- ۱۳

شکل ۱-۱٤: کروماتوگرام LC_MS/MS مربوط به 10-DAB III و اپیمر آن ---------- ۱٤

شکل ۱-۱٥: کاهش مجموع مقدار 10-DAB III و اپیمرش در آب ---------- ۱٥

شکل ۱-۱٦: هیدرولیز گروه بنزونیل ---------- ۱٥

شکل ۱-۱۷: هیدرولیز گروه استیل ---------- ۱٦

شکل ۱-۱۸: باز شدن حلقه اکساتان ---------- ۱٦

شکل۱-۱۹: ساختار مولکولی Taxine B ---------- ۱۷

شکل۱-۲۰: ساختار مولکولی Taxine A و Taxine C ---------- ۱۸

شکل۱-۲۱: Taxine B (I) و Isotaxine B (II) ---------- ۱۹

شکل۱-۲۲: کروماتوگرم LC/MS یک نمونه خون انسانی ---------- ۲۰

شکل۱-۲۳: طیف جرمی Taxine B / Isotaxine B ---------- ۲۱

شکل ۱-۲٤: الف- ساختار مشتق سینامات متناظر با Taxine B ب- مولکول سینامیک اسید ----- ۲۱
شکل۱-۲۵: دو نمونه از آنالوگ های بررسی شده در مطالعات SAR ---------- ۲۲
شکل ۱-۲٦: شمای کلی سیستم LTQ FT Ultra hybrid ساخت شرکت Thermo ---------- ۲٤
شکل ۱-۲۷: مراحل استخراج برای دستیابی به 10-DAB طبق روش پیشنهادی در پتنت --------- ۲٦
شکل ۳-۱: کروماتوگرام مربوط به فراوردهٔ تخلیص شده با کریستالیزاسیون ---------- ۳۵
شکل ۳-۲: کروماتوگرام مربوط به محصول بدون کریستالیزاسیون نهایی ---------- ۳۵
شکل ۳-۳: کروماتوگرام مبنا برای نمونهٔ prep و طیف MS آن در زمان بازداری ۳۰/۲٤ -------- ۳۸
شکل ۳-٤: الف- پراکندگی زمانی جرم ۵۸٤/۳۲ در نمونهٔ پتنت. ب- اطلاعات MS آن با ۵ رقم اعشار در زمان بازداری ۲۹/۷۰ ج- شکستگی یون مولکولی توسط CID در MS-2 ---------- ۳۹
شکل ۳-۵ : شکستگی ایجاد شده برای Taxine B توسط CID ---------- ٤۰
شکل۳-٦ : جرم 10-DAB III در نمونهٔ پتنت و اطلاعات MS آن در زمان بازداری ۳۷/۵٦ ------- ٤۱
شکل۳-۷: کروماتوگرام HPLC تهیه ای ---------- ٤٤
شکل۳-۸: کروماتوگرام HPLC تهیه ای ---------- ٤٤
شکل ۳-۹: طیف کلی 13C-NMR مربوط به نمونه ---------- ٤۵
شکل ۳-۱۰: حالت بسط یافته ناحیه 10-30 ppm طیف 13C-NMR مربوط به نمونه ---------- ٤٦
شکل ۳-۱۱: حالت بسط یافته ناحیه 30-50 ppm طیف 13C-NMR مربوط به نمونه ---------- ٤٦
شکل ۳-۱۲: حالت بسط یافته ناحیه 65-85 ppm طیف 13C-NMR مربوط به نمونه ---------- ٤۷
شکل ۳-۱۳: حالت بسط یافته ناحیه 115-165 ppm طیف 13C-NMR مربوط به نمونه -------- ٤۷
شکل ۳-۱٤: طیف کلی H-NMR مربوط به نمونه ---------- ٤۹
شکل۳-۱۵: حالت بسط یافته ناحیه 1-3.2 ppm طیف 1H-NMR مربوط به نمونه ---------- ٤۹
شکل ۳-۱٦: حالت بسط یافته ناحیه 4-6 ppm طیف 1H-NMR مربوط به نمونه ---------- ۵۰
شکل ۳-۱۷: حالت بسط یافته ناحیه 6.3-8.3 ppm طیف 1H-NMR مربوط به نمونه ---------- ۵۰
شکل۳-۱۸: طیف NMR دوبعدی COSY ---------- ۵۲
شکل ۳-۱۹: حالت بسط یافته ناحیه 6.3-8.3 ppm طیف دوبعدی ---------- ۵۳
شکل ۳-۲۰: کروماتوگرام مربوط به جداسازی به روش گرادیانت ---------- ۵٤
شکل ۳-۲۱: تغییرات غلظت 10-DAB III و Taxine B با افزایش زمان استخراج ---------- ۵٦

شکل۳-۲۲: کروماتوگرام مربوط به بررسی تأثیر مرحلهٔ شویش ---------- ۵۷
شکل ۳-۲۳: ترکیب استاندارد در شرایط استخراج ---------- ۵۸
شکل ۳-۲٤: کروماتوگرام مربوط به اسیدی کردن محیط در فرآیند استخراج ---------- ۵۹
شکل۳-۲۵: مقاسیه وضعیت استخراج تاکسول قبل و بعد از حرارت دهی در آب ---------- ٦۱
شکل ۳-۲٦: مقدار تاکسول باقیمانده در گیاه پس از حرارت دهی گیاه در آب برای مدت زمان‌های مختلف - ٦۲
شکل ۳-۲۷: مقایسهٔ گیاهی که یک ساعت در آب حرارت دیده با گیاه اولیه بدون قرارگیری در آب ----- ٦۳
شکل ۳-۲۸: مقایسهٔ محتوای شیمیایی گیاه پس از قرارگیری به مدت یک و دو ساعت در آب ------- ٦۳
شکل ۳-۲۹: مقایسهٔ محتوای شیمیایی گیاه پس از قرارگیری به مدت دو و چهار ساعت در آب ------- ٦٤

جدول ۳-۱: مقایسه نتایج تجربی 13C-NMR با مرجع ---------- ٤۸
جدول ۳-۲: مقایسه نتایج تجربی H-NMR با مرجع ---------- ۵۱
جدول ۳-۳- برنامه گرادیانت ---------- ۵٤

فصل اول

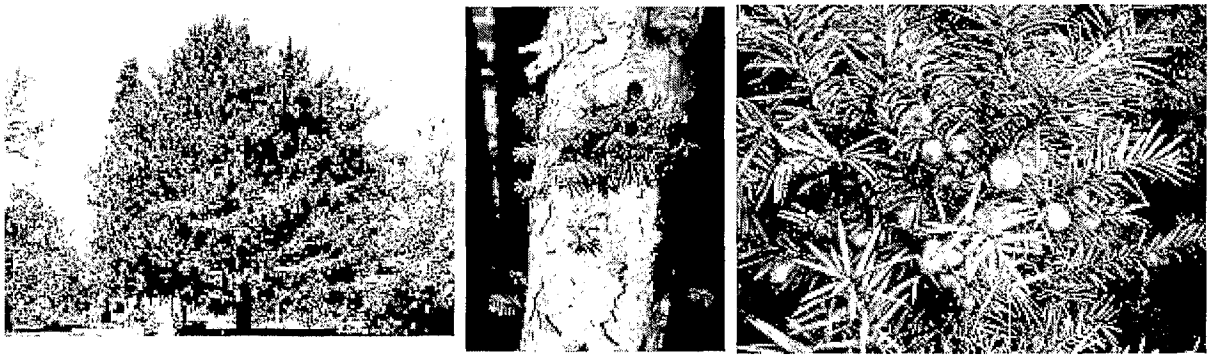
تئوری

۱-۱- گیاه سرخدار (جنس Taxus)

از آنجائیکه در پایان نامه‌های قبلی این گروه، بحث گیاه‌شناسی درخت سرخدار [۲] و بحث مربوط به فیتوشیمی این گیاه [۳] به صورت مبسوط آورده شده است، در این گفتار به معرفی اجمالی آن بسنده می‌شود.

درخت سرخدار(جنس *Taxus*) که نام علمی گونهٔ موجود آن در ایران، *Taxus baccata* می باشد، از درختان سوزنی برگ متعلق به خانوادهٔ Taxaceae است. سرخدار درختی است همیشه سبز و سایه پسند با طول ۵ الی ۱۵ متر که به صورت مخلوط با سایر گونه‌های جنگلی، در طبقهٔ زیرین جنگل‌های مرطوب نواحی مدیترانه‌ای و برخی نقاط آسیا، مثل شمال ایران یافت می‌شود. این گیاه بسیار کند رشد ولی دیرزی بوده و جوانه زنی دانهٔ آن مشکل و طولانی مدت است. سرخدار درختی دو پایه است بدین معنی که گیاه نر و گیاه ماده آن به صورت مجزا وجود دارند. برگ‌های درخت سرخدار سمّی بوده و مصرف آن برای دام‌ها بسیار خطرناک می‌باشد. اما میوهٔ سرخ رنگ آن خوراکی و شیرین است. تکثیر این درخت توسط بذر و قلمه امکان پذیر است .

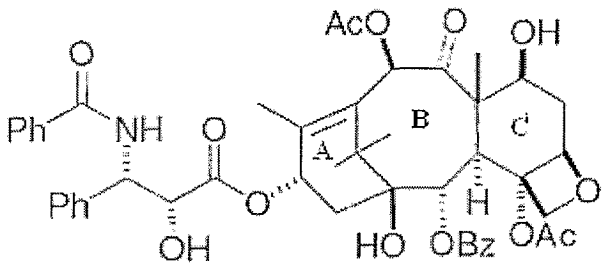
گونه‌های مختلف این گیاه حاوی ترکیب دی‌ترپن آلکالوئیدی به نام پاکلیتاکسل (Paclitaxel) با نام تجاری تاکسول (Taxol) می‌باشند. گونه‌های مختلفی از جنس *Taxus* بطور گسترده در نیمکره شمالی پراکنده است. گونهٔ *Taxus baccata*، متداول ترین گونه آن در اروپای مرکزی است که تحت عنوان European yew خوانده می‌شود. این گیاه برای مصارف تزئینی بسیار محبوب است [٤].



شکل ۱-۱: تصاویری از درختان سرخدار

۱-۲- تاکسول (Taxol)

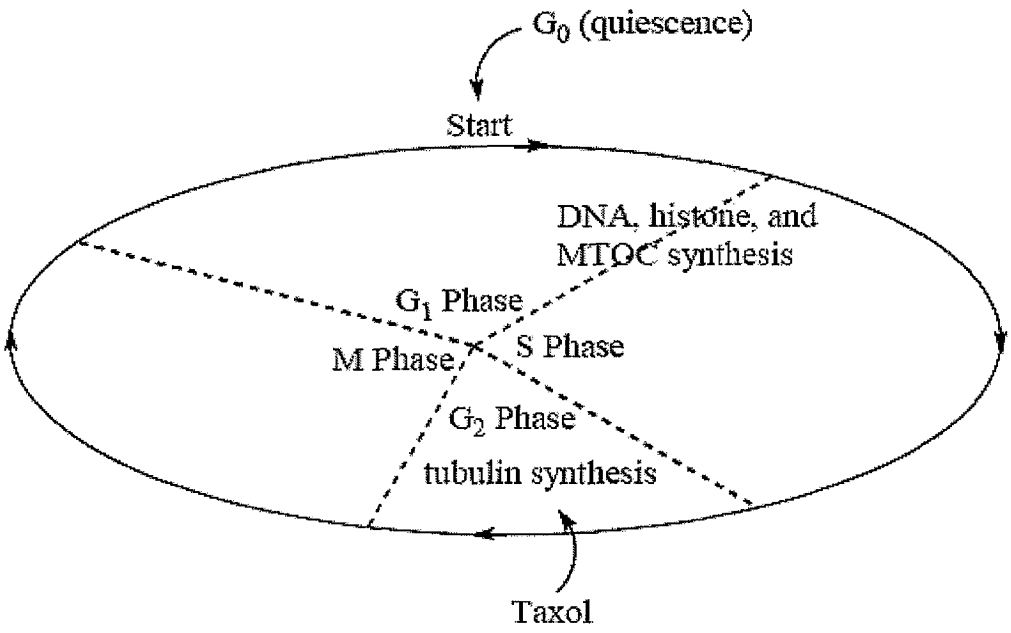
تاکسول که نام علمی آن پاکلیتاکسل (Paclitaxel) است، یک دی‌ترپن آلکالوئید با منشأ طبیعی می‌باشد. اولین بار این ماده از گونهٔ *Taxus brevifolia* گیاه سرخدار جدا شد و در سال ۱۹۷۱ ساختار آن مشخص شد. امروزه این ترکیب از مهمترین داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی به حساب می‌آید. در مورد سرطان سینه و تخمدان، به جرأت می‌توان گفت که تا به امروز هیچ دارویی مؤثرتر از تاکسول عمل نکرده‌است. همچنین تحقیقات دارویی نشان داده که تاکسول، پتانسیل بالایی در درمان سرطان ریه و چند نوع دیگر از سرطان دارد. از آن زمان، تلاش‌ها و مطالعات زیادی انجام گرفته تا سبب عملکرد قوی تاکسول و مکانیزم آن مشخص گردد. همچنین، آنالوگ‌های زیادی از آن برای مطالعات بیوشیمیایی تهیه شده که رابطهٔ بین ساختار مولکولی و فعالیت آن را تا حد زیادی روشن نموده و انگیزه‌ای برای توسعهٔ داروهای نسل دوم آن شده است. با این حال، زمینه‌های کاوش بر روی تاکسول و جنبه های کشف نشدهٔ آن بسیار است. [۵]



شکل۱-۲: ساختار شیمیایی تاکسول

۱-۲-۱ مکانیزم عمل تاکسول

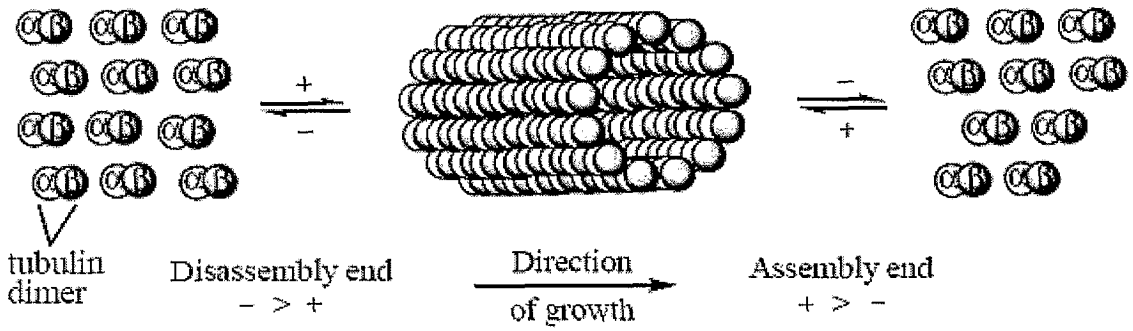
همهٔ سلول‌ها، چه سالم و چه سرطانی، چرخهٔ سلولی مشخصی دارند که طی آن، یک سری فرآیندهای اساسی برای تقسیم سلول صورت می‌گیرد و ملزومات آن فراهم می‌شود. این چرخه را بر اساس نوع اتفاقاتی که در جهت تقسیم سلول رخ می‌دهد، به چند فاز تقسیم می‌کنند (شکل۱-۳).



شکل۱-۳: مداخله تاکسول در مرحلهٔ G_2 چرخهٔ سلولی

در مرحلهٔ G_1، رونویسی DNA انجام می‌شود و در ضمن، مراکز سازماندهی میکروتوبول (microtubule organizing centers, MTOC) ایجاد می‌شوند. در مرحلهٔ G2، کروموزوم‌ها حالت انباشته به خود می‌گیرند که برای تقسیم میتوز لازم است. ضمناً سنتز رشته‌های توبولین صورت می‌گیرد که همان رشته‌های تشکیل دهندهٔ دوک تقسیم سلول هستند. سپس سلول از چند مرحلهٔ متوالی و سریع عبور می‌کند که در طی آنها، رشته‌های دوک تشکیل می‌شوند، کروموزوم‌ها به دوک متصل می‌گردند و سپس این کروموزوم‌ها از وسط سلول به سمت مراکز دوک در دو قطب مخالف کشیده شده و از هم جدا می‌گردند.

دوک تقسیم، از رشته‌های میکروتوبول ساخته شده است. ساختار میکروتوبول‌ها، به شکل لوله‌های توخالی با قطر ۳۰ nm است که زیرواحد دیوارهٔ آنها، ۱۳ رشتهٔ پروتئینی به نام توبولین است. خود توبولین‌ها، از پلیمریزاسیون دو نوع مونومر به صورت یکی در میان، بنام‌های α- و β- توبولین تشکیل شده اند (شکل۱-۴). جرم تقریبی این مونومرها در حدود ۵۵۰۰۰ است [۵].



شکل۱-۴: پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول

زنجیر توبولین، طی یک تعادل دینامیک همواره از یک سمت در حال پلیمریزه شدن و از سمت دیگر در حال دپلیمریزه شدن است. در مرحلهٔ G2، اجتماع مونومرها شدت می‌گیرد تا میکروتوبول تشکیل شود. ترکیبات ضد سرطانی چون کلشی‌سین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین، در این مرحله به گونه ای به رشته‌های توبولین متصل می‌شوند که مانع از گردهم‌آیی آنها برای تشکیل میکروتوبول می‌گردند. اما مکانیزم عمل تاکسول، برعکس است. تاکسول باعث شتاب گرفتن غیر طبیعی فرآیند جفت شدن مونومرها و تحریک فرآیند پلیمریزاسیون می‌شود. حتی در حضور عواملی مثل Ca^{2+} که باعث دپلیمریزاسیون می‌شود و در دمای زیر 4°C نیز این تسریع رخ می‌دهد [۵].

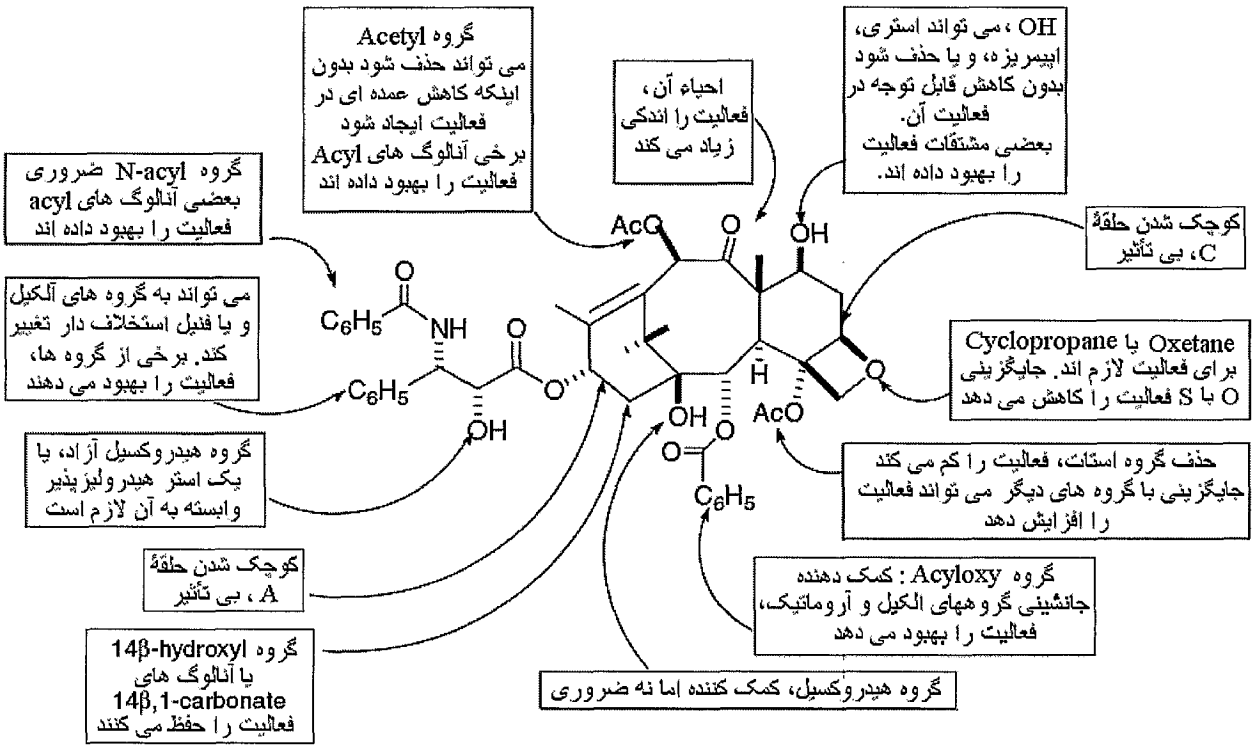
تاکسول با این عمل باعث تشکیل دوک تقسیم غیرطبیعی می‌گردد و این رشته‌های دوک، توانایی جدا کردن کروموزوم‌ها را نخواهند داشت. بدین ترتیب، از تکثیر سلول جلوگیری می‌شود.

مطالعات بیشتر با استفاده از یک آنالوگ تاکسول نشان داد که گروه 3´-(*p*-azidobenzamido) در این آنالوگ، به انتهای نیترژن (N-terminal) در ۳۱ آمینواسید β- توبولین متصل می‌شود و نیز گروه بنزوئیل روی کربن C2 مولکول تاکسول، با ۲۳۱-۲۱۷ آمینواسید در توالی پروتئین β- توبولین پیوند برقرار می‌کند [۶ و ۷].

۱-۲-۲- تلاش برای درک رابطهٔ بین ساختار و فعالیت تاکسول

یکی از زمینه‌های تحقیق در بارهٔ تاکسول، که پژوهش‌های بسیاری در آن انجام گرفته است، بررسی فعالیت ضدتوموری ترکیبات مختلف با ساختار شبیه به تاکسول می‌باشد و کاوش‌های زیادی در بارهٔ ارتباط بین ساختار مولکولی آنها و قدرت عملکردشان صورت گرفته است. اغلب ترکیبات مورد مطالعه،دآنالوگ‌های سنتزی هستند که با انجام واکنش‌هایی بر روی تاکسول و یا دیگر تاکسان‌های موجود در گیاه سرخدار تهیه شده اند [۵].

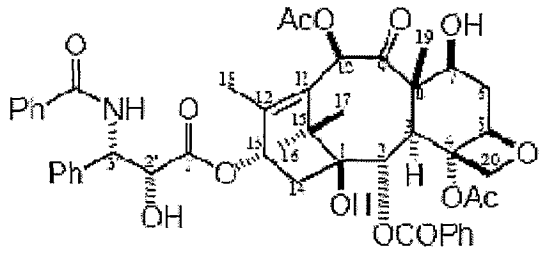
چکیده‌ای از نتایج بدست آمده، در شکل۱-۵ نمایش داده شده است [۸]:



شکل۱-۵: نقش و میزان تاثیر هر یک از بخش‌های ساختاری تاکسول در فعالیت ضد توموری آن

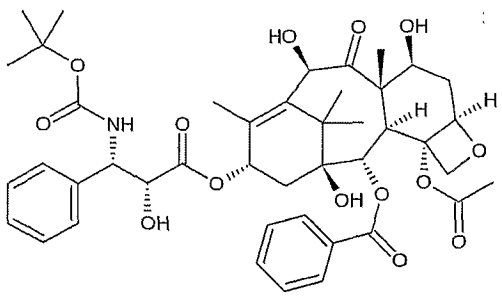
این گونه مطالعات، عموماً به نام "SAR" خوانده می‌شود که مخفف عبارت "Structure Activity Relationship" می‌باشد. هدف از این مطالعات، طراحی داروهایی با ساختار مولکولی اصلاح شده و عملکرد بهتر در برهم کنش با گیرنده‌ها در بدن است [۵].

این تحقیقات، تا حد زیادی منجر به فهم رابطهٔ بین ساختار و فعالیت تاکسول و ترکیبات متناظر با آن شده‌است. برای مثال، ازمطالعات SAR مشخص شد که حلقهٔ اکساتان، گروه هیدروکسیل روی کربن C2′ و زنجیر جانبی تاکسول برای فعالیت سیتوتوکسیک آن مهم‌اند و گروههای عاملی موجود درسمت بالای مولکول تاکسول، موقعیت‌های C7 و C9 و C10 اهمیت کمتری در فعالیت آن دارند [۹].



شکل ۱-۶: ترتیب شماره گذاری اتم‌های کربن در مولکول تاکسول

بدین ترتیب، ظهور و توسعهٔ داروهای نسل دوم تاکسول میسّر گشته است و چند مورد از آنها وارد فاز اول و دوم مطالعات کلینیکی شده‌اند. از این میان، Taxotere یا Docetaxel تنها آنالوگ تاکسول است که تا به امروز توانسته به مرحلهٔ مصرف برسد [۸]. این آنالوگ، از 10-DAB III (بخش۱-۲-۴) سنتز می‌شود. فعالیتی که Taxotere بر روی توبولین از خود نشان می‌دهد، اندکی بهتر از تاکسول است [۱۰].



شکل ۱-۷: Docetaxel (Taxotere)

۱-۲-۳- تولید تاکسول

علی رغم توانایی درمانی شگرف تاکسول در رویارویی با سرطان، هنوز استفادهٔ گسترده از آن دچار مشکل بوده، چرا که این ترکیب بسیار کمیاب و گران‌قیمت است. تاکسول در مقادیر بسیاراندک در گونه‌های مختلف

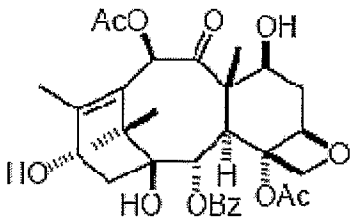
درخت سرخدار وجود دارد و محل تجمع آن، عمدتاً در پوست تنهٔ گیاه است. ضمن اینکه طیف وسیعی از ترکیبات مزاحم همراه با آن وجود دارد که استخراج و خالص سازی آن را پیچیده کرده است. برای تولید یک گرم تاکسول، نیاز به پوست سه درخت بالغ صد ساله می‌باشد [٤].

در سال ۱۹۹۴ گروه تحقیقاتی K. C. Nicolaou روش سنتز کامل تاکسول را منتشرکرد. اما سنتز کامل آن به هیچ وجه قابلیت استفاده برای تولید صنعتی تاکسول را ندارد، زیرا دارای مراحل بسیار زیادی است که خیلی از این مراحل بازیابی چندانی ندارند. با ضرب کردن درصد بازیابی تمام مراحل سنتزی در یکدیگر به عدد ناچیزی به عنوان بازدهی کل رسیده می‌شود. افزون بر آن، مولکول تاکسول دارای یازده مرکز کایرال می‌باشد. هرچند که در برخی از مراحل سنتز آن می‌توان به صورت فضاگزین (stereoselective) عمل کرد، اما محصول نهایی سنتز، مخلوطی از چندین ایزومر فضایی

خواهد بود، که تنها یکی از آنها ترکیب مورد نظر است و جداسازی آن فوق‌العاده مشکل می‌باشد [۱۱].

۱-۲-۴- تهیهٔ تاکسول از 10-Deacetylbaccatin III

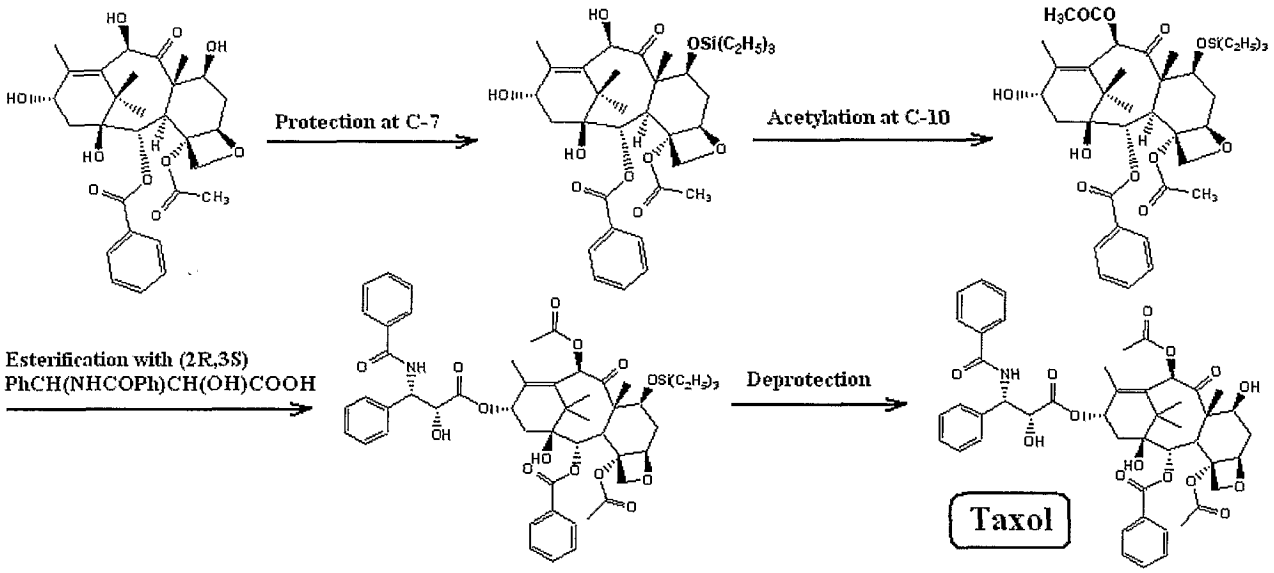
یکی از روش‌های مطرح شده برای تهیهٔ تاکسول، نیمه سنتز آن از پیش‌ماده‌اش موسوم به 10-DAB III است که مقدار آن در گیاه به طور قابل توجهی بیشتر از تاکسول می‌باشد. محل تجمع 10-DAB III عمدتاً در برگ است که بر خلاف پوست درخت، یک منبع تجدیدپذیر محسوب می‌گردد. تاکسول تنها زمانی توانست مجوز استفاده در درمان سرطان سینه را از طرف FDA آمریکا بگیرد که مقادیر مورد نیاز آن برای تست‌های کلینیکی، با استفاده از روش نیمه سنتز از 10-DAB III تأمین گردید [۳].



شکل ۱-۸: 10-Deacetylbaccatin III

با وجود ابداع روش‌های جدید تهیه تاکسول نظیر کشت سلول، هنوز نیمه سنتز آن از 10-DAB III اهمیت و جایگاه خود را در تامین این داروی ارزشمند حفظ کرده است.

برای رسیدن به تاکسول از 10-DAB III به طور کلی چهار مرحلهٔ سنتزی لازم است که در شکل ۱-۹ نشان داده شده‌است. دو مرحلهٔ ابتدا و انتهای آن شامل محافظت و برداشتن محافظت از گروه هیدروکسیل روی کربن C7 است. دو مرحلهٔ دیگر شامل اتصال استیل به کربن C10 از طریق پیوند استری و برقراری پیوند استری با زنجیر جانبی تاکسول است که مشتقی از اسید آمینهٔ فنیل‌ایزوسرین می‌باشد [۱۰].



شکل۱-۹: مراحل نیمه سنتز تاکسول از 10-DAB III

۱-۳- تاکسان ها

گیاهان متعلق به شاخهٔ مخروطیان، معمولاً دارای مقادیر زیادی ترکیبات فرّار هستند. اما در این میان سرخدار دارای ترکیبات فرّار اندکی است. در عوض، ترکیبات اصلی سرخدار را تاکسان‌ها تشکیل می‌دهند. تاکسان‌ها یا تاکسوئیدها، دارای اسکلت اصلی دی‌ترپنویید هستند که تعدادی از کربن‌های آنان دچار اکسیداسیون شده و هیدروژن متصل به این کربن‌ها، تبدیل به گروه‌های هیدروکسیلی، کتونی، اتری و یا