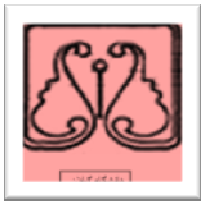


دانشگاه گیلان

دانشکده علوم پایه

گروه شیمی

گرایش تجزیه

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان

بررسی و اندازه گیری داروهای ضد انعقاد و آنتی بیوتیک از طریق روش های عریان سازی جذبی بر روی الکترود های فیلم نازک

از:

زینب پورعلی

استاد راهنما:

دکتر علیرضا علی اکبر

شهریور ۱۳۹۱

ستایش مخصوص خداست که هستی او، از اول است بی آنکه آن را اول و ابتدایی باشد و آخر است بی آنکه آن را آخر و انتهایی باشد. ***"صحیفه سجادیه"***

سپاس و ستایش خداوند متعال را که توفیق به پایان رساندن این پایان نامه را به من عطا فرمود.

با تشکر از استاد گرانقدرم آقای دکتر علی اکبر که راهنمایی ها و نکته سنجی های ارزنده ایشان در سراسر مراحل این پایان نامه شامل حال من شد و شاگردی در محضر ایشان از افتخارات زندگی من محسوب می شد.

از داوران محترم جناب آقایان دکتر زنجانچی و دکتر محمدخواه که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند، تشکر و قدردانی میکنم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی، جناب آقای دکتر رادمقدم سپاسگزارم.

از پدر و مادرم و همه اعضای خانواده ام که همیشه در کنارم بودند، ممنونم.

از همسر خوبم نیز در این مدت که همواره به معنای واقعی یار و همراهم بودند، متشکرم.

از تمامی دوستان و هم آزمایشگاهی هایم مخصوصا خانم دکتر پریسا شریفیان، و خانمها هزاری و سیاوش نیز سپاسگزارم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده فارسی .....ذ
چکیده انگلیسی .....ر
پیشگفتار .....ز

فصل اول: مقدمه و تئوری

۱-مقدمه ۲
۱-۱- آنتی بیوتیک های گروه تتراسیکلین ۲
۱-۱-۱- شیمی تتراسیکلین ها ۳
۱-۱-۲ روش های اندازه گیری تتراسیکلین ها ۷
۱-۱-۲-۱- روش TLC ۸
۱-۱-۲-۲- روش الکتروفورز ۸
۱-۱-۲-۳- روش LC ۹
۱-۱-۲-۴- روش HPLC ۹
۱-۱-۲-۵ روش های شیمی لومینسانس ۹
۱-۱-۲-۶- روش های الکتروشیمیایی ۱۰
۱-۱-۲-۷- روش های ولتامتری ۱۱
۱-۲- بیماری های قلبی و عروقی ۱۲
۱-۲-۱- عوامل ایجاد بیماری های قلبی و عروقی ۱۳
۱-۲-۲- بیماری های عروقی ۱۳
۱-۲-۳- بیماری های قلبی ۱۵
۱-۲-۴- داروهای مؤثر بر بیماری های قلبی و عروقی ۱۶
۱-۲-۵- روش های اندازه گیری کلوپیدوگرل ۲۰
۱-۲-۵-۱- روش های کروماتوگرافی ۲۰
۱-۲-۵-۲- روش الکتروفورز ۲۲
۱-۲-۵-۳- اسپکتروسکوپی ۲۲

فصل دوم: بررسی های آزمایشگاهی

۲- بررسی های آزمایشگاهی ۲۴
۲-۱ دستگاه ها و مواد شیمیایی ۲۴

عنوان صفحه

۲-۲- آزمایش های مقدماتی ۲۵

۲-۲-۱- پلاروگرافی اکسی وت ۲۷

۲-۲-۲- بررسی اکسی وت از طریق CV در ناحیه آندی ۲۸

۲-۲-۳- ولتاموگرام اکسی وت در روی الکترود های HMDE و TMFE ۲۹

۲-۲-۴- طراحی روش AdCSV برای اندازه گیری اکسی وت ۳۱

۲-۲-۴-۱- اثر پتانسیل اعمالی بر روی برجذب اکسی وت ۳۱

۲-۲-۴-۲- اثر زمان برجذب اکسی وت با اعمال پتانسیل ۳۲

۲-۲-۴-۳- اثر غلظت HCl در برجذب اکسی وت ۳۳

۲-۲-۴-۴- بررسی فرآیند برجذب با مدار باز ۳۴

۲-۲-۵- منحنی استاندارد ۳۴

۲-۲-۶- بررسی ولتاموگرام اکسی وت بر روی فیلم های دیگر ۳۶

۲-۲-۷- بررسی ولتاموگرام عریان سازی جذبی در روی فیلم پلیمری ۴۲

۲-۲-۸- حد اندازه گیری اکسی وت با استفاده از روش adDPCSV ۴۳

۲-۲-۹- اندازه گیری اکسی وت در شیر گاو ۴۳

۲-۲-۱۰- اندازه گیری درصد بازیافت اکسی وت از شیر ۴۴

۲-۲-۱۱- اندازه گیری اکسی وت در گوشت گاو ۴۵

۲-۲-۱۲- مقایسه نتایج با نتایج حاصل از HPLC ۴۶

۲-۳- بررسی امکان اندازه گیری داروی پلاویکس (کلوپیدوگرل) از طریق ولتامتری ۴۷

۲-۳-۱- ولتاموگرام داروی CLP ۴۷

۲-۳-۲- اثر غلظت سولفوریک اسید بر روی ولتاموگرام CLP ۴۸

۲-۳-۳- اثر نوع اسید بر ولتامتری CLP ۴۹

۲-۳-۴- اثر نوع الکترود بر ولتاموگرام CLP در محیط H_2SO_4 ..... ۵۰

۲-۳-۵- منحنی استاندارد CLP در روی الکترود گرافیتی ۵۲

۲-۳-۶- بررسی امکان آنالیز CLP از طریق روش‌های عریان سازی ۵۳

۲-۳-۷- حد اندازه‌گیری CLP در روی الکترود کمپوزیتی پلی آمینوفنل با یون نقره ۵۵

۲-۳-۸- اندازه گیری مقدار CLP در قرص‌های تولید شده در یکی از کارخانه‌های ایران ۵۶

فصل سوم: بحث و نتیجه گیری

عنوان صفحه

بحث و نتیجه گیری ۵۷
پیشنهاد برای کارهای آینده ۶۴
مراجع ۶۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- حلالیت نمک های متداول تتراسیکلین در حلال های مختلف ۵

جدول ۱-۲- pK_a تعریف شده برای تتراسیکلین های مختلف ۷

جدول ۲-۱: اثر پتانسیل برجذب در روی ولتاموگرام AdCSV اکسی وت. غلظت گونه و اسید مانند شکل ۲-۵- الف، زمان برجذب ۶۰ ثانیه ۳۲

جدول ۲-۲: اثر زمان برجذب بر روی ولتاموگرام AdCSV اکسی وت. غلظت گونه و اسید مانند شکل۲-۵- الف، پتانسیل برجذب ۰/۶- ولت ۳۲

جدول ۲-۳: مقادیر اکسی وت در نمونه های واقعی ۴۶

جدول ۲-۴- مقادیر بدست آمده از یک قرص تولیدی در کارخانه ها در روی دو الکترود گرافیتی و کمپوزیت پلی آمینوفنل و نقره در روی الکترود گرافیتی ۵۶

فهرست اشکال

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و تئوری

شکل ۱-۱- الف- حلقه نفتاسن. ب: ددکاهیدرونفتا سن ۴

شکل ۱-۲- فرمول ساختاری تتراسیکلین ها ۵

شکل ۱-۳- توانایی تتراسیکلین برای تشکیل کمپلکس ۶

شکل ۱-۴- تتراسیکلین با سه ثابت تفکیک اسیدی ۶

شکل ۱-۵- فرمول ساختاری هپارین ۱۷

شکل ۱-۶- فرمول ساختاری آسپرین ۱۷

شکل ۱-۷- فرمول ساختاری دی پیریدامول ۱۸

شکل ۱-۸- فرمول ساختاری وارفارین ۱۸

شکل ۱-۹- فرمول ساختاری تیکلوپیدین ۱۹

شکل ۱-۱۰- فرمول ساختاری کلوپیدوگرل ۱۹

شکل ۱-۱۱- مسیر های متابولیکی کلوپیدوگرل ۱۹

شکل ۱-۱۲- الف- ناخالصی A ، ب: ناخالصی C و پ: ناخاصی B کلوپیدوگرل ۲۰

شکل ۱-۱۳- فرم اکسیداسیونی کلوپیدوگرل ۲۱

شکل ۱-۱۴- مشتق سازی کلوپیدوگرل اکتیو با ۲- برومو ۳- متوکسی استوفنون و ساختار های شیمیایی کلوپیدوگرل مشتق شده همراه با استاندارد داخلی ۲۲

فصل دوم: بررسی های آزمایشگاهی

شکل ۲-۱- الف- ولتامو گرامSWASV آب تهیه شده ازطریق رزین های کاتکس وآنکس ۲۶

شکل ۲-۱- ب- ولتامو گرام SWASV آب تهیه شده از طریق الکترولیز در روی استخر جیوه ای ۲۶

شکل ۲-۱- پ- ولتامو گرام DPASV آب دیونیزه شده ۲۶

شکل ۲-۲ - پلاروگرام اکسی وت از طریق DPP . غلظت محلول ۰/۲mg/ml در HCl ۰/۱ مولار..... ۲۷

شکل ۲- ۳- ولتاموگرام CV اکسی وت در روی الکترود کربن شیشه ای. غلظت گونه و اسید مانند شکل ۲-۲..... ۲۸

شکل ۲-۴ - فرمول ساختاری اکسی تتراسایکلین ۲۹

شکل ۲-۵- الف- ولتاموگرام اکسی وت در روی HMDE. غلظت گونه ۰/۲mg/ml و غلظت HCl۰/۱ مولار ۳۰

عنوان صفحه

شکل ۲-۵- ب- ولتاموگرام اکسی وت بر روی DME. غلظت گونه و اسید مانند شکل ۲-۵- الف..... ۳۰
شکل ۲-۵- پ- ولتاموگرام اکسی وت بر روی TMFE. غلظت گونه و اسید مانند شکل ۲-۵- الف..... ۳۰
شکل۲-۶- اثر غلظت اسید در ولتاموگرام AdCSV اکسی وت. غلظت گونه مانند شکل ۲-۵- الف، پتانسیل برجذب ۰/۶- و زمان پیش تغلیظ ۶۰ ثانیه ۳۳
شکل ۲-۷- ولتاموگرام adDPCSV اکسی وت در غلظت های A: ۱۰۰، B: ۲۰۰، C: ۴۰۰، D: ۶۰۰، و E: ۸۰۰ ppm در روی TMFE. پتانسیل پیش تغلیظ۰/۶- ولت و زمان آن ۶۰ ثانیه است..... ۳۵
شکل۲-۸- منحنی استاندارد اکسی وت در روی TMFE، داده ها مانند شکل ۲-۷ ..... ۳۵
شکل ۲-۹- ولتاموگرام چرخه ای A: بلانک (سدیم استات به غلظت ۱۰mg/ml). B: ۴- نیتروفنل به غلظت ۲mg/ml، بر روی کربن شیشه ای..... ۳۷
شکل ۲-۱۰- ولتاموگرام چرخه ای سنتز پلی ۴- آمینوفنل همراه با تشکیل فیلم جیوه ای. غلظت گونه مانند شکل ۲-۹ است..... ۳۸
شکل ۲-۱۱- ولتاموگرام چرخه ای فیلم پلیمری تشکیل شده در محیط سدیم استات. غلظت گونه مانند شکل ۲-۹ است..... ۳۹
شکل ۲-۱۲- الف- A: ولتاموگرام SW محلول بلانک بر روی فیلم پلیمری تشکیل شده بر روی TMFE. B: ولتاموگرام SW اکسی وت بر روی فیلم پلیمری تشکیل شده بر روی TMFE. غلظت گونه۰/۲mg/ml..... ۴۰
شکل ۲-۱۲- ب- A: ولتاموگرام DP محلول بلانک بر روی فیلم پلیمری تشکیل شده بر روی TMFE. B: ولتاموگرام DP اکسی وت بر روی فیلم پلیمری تشکیل شده بر روی TMFE. غلظت گونه ۰/۲mg/ml..... ۴۰
شکل ۲-۱۳- ولتاموگرام اکسی وت در غلظت های A : ۵، B: ۱۰، C: ۲۰، D: ۶۰، E: ۱۰۰، F: ۲۰۰ ppm بر روی لایه فیلم پلی مری همراه با لایه جیوه ای..... ۴۱
شکل ۲-۱۴- منحنی استاندارد اکسی وت بر روی لایه فیلم پلی مری همراه با لایه جیوه ای. سایر شرایط مانند شکل ۲-۱۳..... ۴۱
شکل ۲-۱۵- ولتاموگرام adDPCSV اکسی وت در غلظت های A: ۵ ، B: ۱۰، C: ۲۴، D: ۴۰، E: ۵۰ ppm بر روی فیلم پلی مری همراه فیلم جیوه ای باپتانسیل پیش تغلیظ ۰/۸- ولت با زمان ۶۰ ثانیه ۴۲
شکل ۲-۱۶- منحنی استانداردadDPCSV اکسی وت بر روی لایه فیلم پلی مری همراه فیلم جیوه ای باپتانسیل پیش تغلیظ ۰/۸- ولت با زمان ۶۰ ثانیه ۴۳
شکل ۲-۱۷- الف- ولتاموگرام adDPCSV اکسی وت در شیر پلاستیکی ۴۴
شکل ۲-۱۷- ب- ولتاموگرام adDPCSV اکسی وت در شیر پاکتی (مدت دار)..... ۴۴
شکل ۲-۱۸- ولتاموگرام CLPدر روی GC و در محیط سولفوریک اسید ۰/۰۱ مولار. A: بلانک، B: ۰/۲mg/ml، C: افزایش مقداری جامد D: افزایش دوباره مقداری جامد ۴۸

عنوان صفحه

شکل ۲-۱۹- ولتاموگرام CLP در روی GC در غلظت های A: ۰/۰۱، B: ۰/۰۵، C: ۰/۱ مولار اسید سولفوریک.....۴۹

شکل ۲-۲۰- اثر نوع اسید در ولتاموگرام CLP. A: H_3PO_4، B: H_2SO_4 (با ۰/۲mg/ml از CLP)، C: $HClO_4$، D: HCl (با ۰/۳mg/ml از CLP). غلظت اسید ۰/۰۱ مولار ۵۰

شکل ۲-۲۱- الف- ولتاموگرام CLP در روی الکترود های A: GC، B: Pt. غلظت گونه ۰/۲mg/ml و غلظت H_2SO_4 ۰/۰۱ مولار ۵۱

شکل ۲-۲۱- ب- ولتاموگرام CLP در روی الکترود های A: فیلم طلا، B: طلا. غلظت گونه و اسید مانند شکل ۲-۲۱- الف.....۵۱

شکل ۲-۲۱- پ- A- ولتاموگرام بلانک (فقط H_2SO_4) در روی الکترود گرافیت، B: با افزایش مقداری CLP جامد

در الکترود گرافیت، C: با افزایش دوباره CLP ۵۱

شکل ۲-۲۲-A- ولتاموگرام بلانک (فقط H_2SO_4) در الکترود طلا، B: با افزایش مقداری از CLP جامد در الکترود طلا..... ۵۱

شکل ۲-۲۳- ولتاموگرام A: بلانک (فقط H_2SO_4 ۰/۰۱ مولار)، CLP در غلظت های B: ۵۰، C: ۱۰۰، D: ۱۵۰، E: ۲۰۰، F: ۲۵۰ ppmدر روی الکترودگرافیتی.....۵۲

شکل ۲-۲۴- منحنی استاندارد CLP در (H_2SO_4 ۰/۰۱ مولار) بر روی الکترود گرافیتی.....۵۳

شکل ۲-۲۵- ولتاموگرام چرخه ای CLP در H_2SO_4 ۰/۰۱ مولار در الکترود گرافیتی.....۵۴

شکل ۲-۲۶- الف- ولتاموگرام چرخه ای ۴- آمینوفنل به غلظت ۲/۵ppm درH_2SO_4 ۰/۵ مولار روی الکترود گرافیتی.....۵۵

شکل ۲-۲۶- ب- ولتاموگرام چرخه ای ۴- آمینوفنل به غلظت ۲/۵ppm یون نقره با غلظت ۱ppm در H_2SO_4 ۰/۵ مولار، در الکترود گرافیتی.....۵۵

۱-مقدمه:

۱-۱- آنتی بیوتیک های گروه تتراسیکلین:

درمان بیماری‌ها سابقه‌ی بسیار طولانی دارد. آنچه که انسان‌های دیرین را در این موضوع کمک می کرد، مواد قابل دسترس او بود که گیاهان فراوان‌ترین آنها بودند. بنابراین درمان بیماری‌ها از طریق گیاهان آهسته آهسته در میان تمدن‌های قدیمی مانند چین، ایران، مصر و یونان یک اصل شد. پزشکان عهد باستان نمی‌دانستند ویروس و باکتری چیست، کدام بیماری قارچی و کدام به دلیل ویروس‌هاست. آنها صرفا تجربه می کردند. به عنوان مثال بوعلی سینا برای درمان سیاه سرفه، شیر اسب را پیشنهاد می‌کرد. امروزه می‌دانند که در شیر اسب داروهای خاصی وجود ندارد، پس تجویز بوعلی سینا بر چه پایه‌ای بوده است. بوعلی سینا می دانست که اسب‌های خوارزم از گیاهانی تغذیه می کنند که حاوی گروه‌های وسیعی از فنل‌ها، ترپن‌ها، اسیدهای آلی مختلف و ... می‌باشند و اسب پس از خوردن آنها، فرم تصفیه شده این مواد را وارد شیر می‌کند. بنابراین شیر آن، خاصیت دارویی داشت. یعنی اسب‌ها مواد مؤثره گیاهان را فرآوری، خالص‌سازی و آنها را در حامل‌های خوش مزه (شیر) وارد نموده و در اختیار انسان قرار می‌دهند.

کپی چنین فرآیندی نیز امروزه رخ می‌دهد. مثلا به یک شربت سینه در فرآیند ساخت، اسانس خوش‌بو کننده با طعم‌های میوه‌ای و قندها برای شیرینی‌سازی اضافه می‌شود و این شبیه فرآیندی است که در بدن اسب رخ می‌دهد. در ایران قدیم برای درمان کچلی از گیاه منداب که پدر بزرگ روغن کلزا می‌باشد، استفاده می‌شد. این دانه روغنی دارای مقادیر بالای اورسیک اسید است. علیرغم اینکه روغن خطرناکی جهت خوراکی است، اما خاصیت ضد قارچی آن بی‌نظیر است. از دیدگاه تاکسونومی به منداب اورسیکا پرسیکا می‌گویند که مشتق از اورسیک اسید و پرشیا است.

تحقیقات امروزی نشان می‌دهد که گیاهان، حاوی صدها گونه آنتی‌بیوتیک می‌باشند که در زمان‌های گذشته از عصاره آنها برای بهبود زخم‌ها استفاده می‌شد. سیر، برگ سیر، گیاه بابونه، توت فرنگی و شاید بسیاری دیگر که ذکر آنها در این مقدمه جایز نیست. امروزه بسیاری از آنتی‌بیوتیک ها سنتز می‌شوند و به دلیل طیف عملکردشان به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. بعضی از آنها مصرف انسانی و بعضی دیگر حیوانی و گروهی در هر دو مورد استفاده قرار می‌گیرند. بحث جامع‌تری از آنتی بیوتیک‌ها را می‌توان در مرجع ۱ مشاهده نمود. در هر حال از مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌ها که هم مصرف انسانی و هم حیوانی دارد گروه تتراسایکلین هاست. بر اساس تحقیقات انجام شده، این گروه از آنتی بیوتیک‌ها، نه تنها در انسان بلکه در صنایع تولید گوشت، آب آشامیدنی و مواد لبنی [۲] بکار می رود. در دانمارک از اکسی تتراسایکلین در عمل‌های مختلف با مخلوط هیدروکورتیزون[1] و

[1] Hydrocortisone

پلی‌میکسین[1] در آماده‌سازی پوست و چشم قبل از جراحی استفاده می‌شود [۳]. هزینه مصرف تتراسایکلین‌ها در ایالات متحده امریکا سالانه به حدود ۱۲ میلیون دلار می رسد [۴].

این آنتی بیوتیک‌ها جایگاه خاصی در پرورش حیوانات خانگی دارند که دلیل آن جلوگیری از رشد و تولید عوامل باکتری‌زاست [۵]. از عوارض خطرناک استفاده این آنتی بیوتیک‌ها در تولید موادغذایی به ویژه لبنی، باقی‌مانده آنتی بیوتیک‌های مصرف‌نشده و یا دفع نشده در گوشت و یا شیر یا دیگر محصولات جانبی آنهاست که سلامت مصرف‌کنندگان را به خطر می‌اندازد. به طور مثال می‌توان به واکنش‌های آلرژیک در بعضی افراد [۶]، گسترش مقاومت باکتریایی [۷،۶]، ریسک تراتوژن در سه ماهه اول بارداری [۸] و امکان هیپوپلازی در کودکان و نوجوانان زیر ۱۲ سال [۹] اشاره نمود.

برای کاهش این خطر و همچنین کنترل مقادیر دارویی در دام‌ها و انسان، محققین در مراکز تحقیقاتی، پژوهش‌های بسیار زیادی را در اوایل قرن بیستم تاکنون انجام داده‌اند. آنها حداکثر مقادیر مجاز[2] آنتی بیوتیک‌ها را در قسمت های مختلف بدن تعیین کرده و دولت‌های مربوطه را وادار به رعایت قوانین نموده‌اند که باقی مانده‌های آنتی بیوتیک‌ها را در موادغذایی کنترل کنند.

برای مثال اتحادیه‌ی اروپا این مقدار را برای تتراسایکلین‌ها در کبد حیوان ۰/۳mg/Kg ، در بافت‌های ماهیچه‌ای و یا شیرحیوانی ۰/۱ mg/Kg و در عسل ۰/۰۱ mg/Kg تعیین کرده است [۱۰]. مؤسسه غذاودارو[3] این مقادیر را به ترتیب فوق ۶ mg/Kg، ۲ mg/Kg و ۰/۴ mg/Kg [۱۱] مشخص کرده است. سازمان‌های دیگر مانند FAO [4] و WHO [5] مقدار ۰/۱ mg/Kg اکسی تتراسایکلین را در شیر مجاز دانسته اند [۱۲].

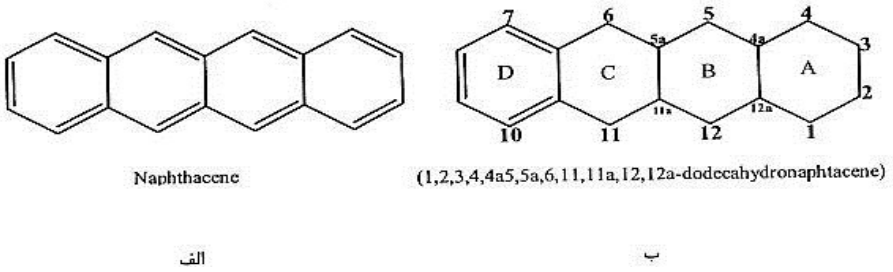
این مقادیر گفته شده در فوق حداکثر مقدار مجاز است. در صورتی که بعضی از سازمان‌ها مقادیری که ایجاد خطر نمی‌کنند[6] را کمتر اعلام کرده‌اند، بطوریکه برای اکسی تتراسایکلین در شیر ۰/۰۳mg/Kg گزارش شده است[۲].

۱-۱-۱- شیمی تتراسیکلین ها:

آنتی بیوتیک‌های این گروه اگرچه از نظر طیف ضدمیکروبی و فرمول شیمیایی مشابه یکدیگر می‌باشند، ولی از دیدگاه فارماکولوژی با یکدیگر متفاوتند. در ابتدا این ترکیبات از استخراج استرپتومایسس[1] های مختلف به دست آمدند و تا کنون ۹ نوع آن شناسایی شده‌اند که معروف‌ترین آنها تتراسیکلین[2]، اکسی تتراسیکلین [3](اکسی وت)[4] و کلرو تتراسیکلین[5] می باشند.

[1] Polymyxine
[2] Maximum residue limits (MRLs)
[3] Food and Drug Administration
[4] Food and Agricultural Organization
[5] World Health Organization
[6] Safe levels

چهار حلقه شش ضلعی بهم‌جوش‌خورده، هسته‌ی اصلی این ترکیبات را تشکیل می‌دهد که بنابر پیشنهاد IUPAC به صورت ABCD نامگذاری می‌شوند [۱۳]. انواع تتراسیکلین از طریق عامل‌های مختلف که روی حلقه‌های نفتاسن (شکل ۱-۱) قرار میگیرند، مشخص شده و تفاوت آنها به دلیل تعداد گروه‌های عاملی است [۱۵،۱۴].



شکل (۱-۱) الف: حلقه نفتاسن. ب: ۱۲دکاهِیدرونفتا سن [۱۳]

تعیین ساختار ملکولی گروه‌های تتراسیکلین از طریق کریستالوگرافی با کارآیی بالا [۱۹-۱۶] مشخص شده است. در شکل ۱-۲ نوع و محل این عامل‌ها نشان داده شده است [۲۰].

به دلیل تعداد عامل‌های مختلف، حلالیت آنها در آب متفاوت است. آنها زرد رنگ بوده و حضور گروه آمینی و آمیدی موجب حلالیت در اسیدها و به دلیل داشتن گروه هیدروکسیل در محیط قلیایی حل می‌شوند. در حالت محلول، در محیط‌های قلیایی ناپایدار هستند [۲۱]. بنابراین از دیدگاه سنتز داروها، بیشتر آنها به صورت نمک هیدروکلراید ساخته می‌شوند. انحلال پذیری تتراسیکلین در حلال‌های مختلف در جدول ۱-۱ آورده شده است [۱۳].

[1] Streptomyces
[2] Tetracycline
[3] Oxytetracycline
[4] Owyvet
[5] Chlortetracycline

A B

Compound	Structure	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
Tetracycline (TC)	A	H	CH_3	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Oxytetracycline (OTC)	A	H	CH_3	OH	OH	$N(CH_3)_2$	H	H
Chlortetracycline (CTC)	A	Cl	CH_3	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Doxycycline (DC)	A	H	CH_3	H	OH	$N(CH_3)_2$	H	H
Minocycline (MINO)	A	$N(CH_3)_2$	H	H	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Methacycline (MTC)	A	H	$=CH_2$		OH	$N(CH_3)_2$	H	H
Demeclocycline (DMCTC)	A	Cl	H	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	H
Rolitetracycline (PRMTC)	A	H	CH_3	OH	H	$N(CH_3)_2$	H	[a]
4-Epioxytetracycline (EOTC)	A	H	CH_3	OH	OH	H	$N(CH_3)_2$	H
Anhydrooxytetracycline (AOTC)	B	H	-	-	OH	$N(CH_3)_2$	H	H
4-Epitetracycline (ETC)	A	H	CH_3	OH	H	H	$N(CH_3)_2$	H
Anhydrotetracycline (ATC)	B	H	-	-	H	$N(CH_3)_2$	H	H
4-Epianhydrotetracycline (EATC)	B	H	-	-	H	H	$N(CH_3)_2$	H
4-Epichlortetracycline (ECTC)	A	Cl	CH_3	OH	H	H	$N(CH_3)_2$	H
4-Epidoxycycline (EDC)	A	H	CH_3	H	OH	H	$N(CH_3)_2$	H

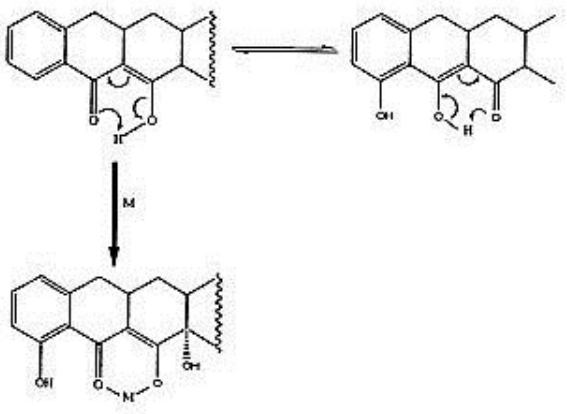
[a] $-CH_2-N$

شکل(۱-۲) فرمول ساختاری تتراسیکلین ها[۲۰]

جدول (۱-۱) حلالیت نمک های متداول تتراسیکلین در حلال های مختلف [۱۳]

	Solubility (mg/ml) (~ 2 8 °)	
Solvent	Trihydrate	Hydrochloride
Water	0.6	6.9
Methanol	18.5	16.35
Ethanol	8.1	11.95
Isopropanol	0.30	7.3
Isoamyl alcohol	0.087	7.45
Cyclohexane	0.055	0.055
Benzene	0.037	0.027
Toluene	0.005	0.0
Petroleum ether	0.0	0.01
Isooctane	0.027	0.025
Carbontetrachloride	0.055	0.072
Ethyl acetate	0.85	2.05
Isoamyl acetate	0.15	1.0
Acetone	1.6	10.8
Methyl ethyl ketone	1.35	4.4
Ether	0.13	0.135

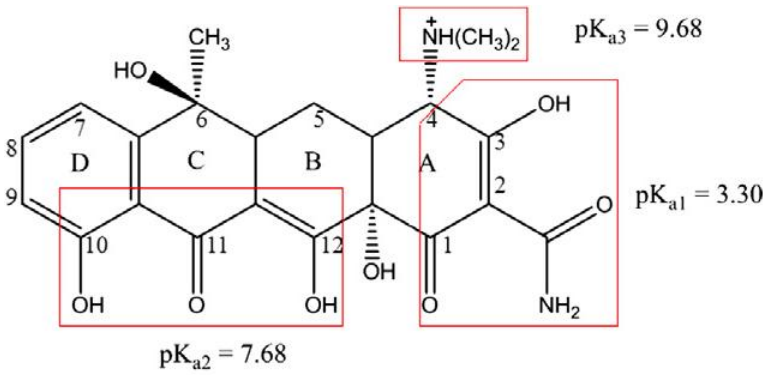
به دلیل موقعیت مناسب گروه‌های اسیدی، این ترکیبات قادر به تشکیل کی‌لیت با بعضی از فلزات مانند Cu(II)، Fe(II) و یون‌های کلسیم و منیزیم هستند (شکل ۱-۳) و بسیاری از محققین، همین مورد را دلیل خواص ضدمیکروبی این گروه از آنتی‌بیوتیک ها می‌دانند [۲۳،۲۲]. کربن‌های شماره ۱۱ و ۱۲ دارای جایگاه‌های فعالی برای کی‌لیت کردن یون‌های فلز است (شکل ۱-۱).



شکل(۱-۳) توانایی تتراسیکلین برای تشکیل کمپلکس[۲۳،۲۲]

تتراسیکلین‌ها تمایل شدیدی برای تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها دارند. کتاب‌های شیمی پزشکی خاصیت اصلی ضدمیکروبی این ترکیبات را، بازدارندگی سنتز پروتئین در باکتری‌ها می‌دانند. پیوندهای قوی تتراسیکلین‌ها با ریبوزوم‌های باکتری‌ها، منجر به جلوگیری سنتز پروتئین‌ها و قطع فعالیت‌های درونی[1] بین tRNA و mRNA می‌شود[۲۴].

تتراسیکلین‌ها به دلیل داشتن گروه‌های اسیدی و قلیایی دارای خاصیت آمفوتری هستند و اینکه نقش آنها اسیدی باشد یا بازی، به pH محیط بستگی دارد[۲۵]. شکل ۱-۴ pK_a های اسیدی این گروه از آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد [۲۶].



شکل(۱-۴) تتراسیکلین با سه ثابت تفکیک اسیدی [۲۶]

[1] Codon - Anticodon

ضمن اینکه در جدول ۱-۲ مقادیر pK_a آنها نیز آورده شده است [۲۷].

(جدول ۱-۲) pK_a تعریف شده برای تتراسیکلین های مختلف [۲۷]

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Oxytetracycline·HCl	3.2	7.5	8.9
Tetracycline·HCl	3.3	7.8	9.6
Chlortetracycline·HCl	3.3	7.6	9.3
Doxycycline·HCl	3.0	8.0	9.2

از دیدگاه خواص فیزیکی، این ترکیبات در محیط اسیدی دارای جذب ماکزیمم در ۲۷۰ و ۳۶۰ نانومتر هستند [۲۸]. در اسیدها، بازها، الکل‌ها و حلال‌های قطبی حل می‌شوند و از نمونه‌های واقعی، با استفاده از n- بوتانول و یا اتیل‌استات قابل استخراج هستند [۲۸].

تتراسیکلین‌ها با یون‌های فلزی خاصیت فلور سانسی قوی از خود نشان می‌دهند [۳۱-۲۹] و این مورد، یکی از راه‌های شناسایی و اندازه‌گیری آنهاست.

همانطور که قبلا نیز اشاره شد، گروه تتراسیکلین تمایل شدید به تشکیل کمپلکس با عناصری همچون کلسیم دارد. لذا موجب کاهش دسترسی سلول‌های حیوانی به این کاتیون مهم می شود. بنابراین در هنگام افزایش این آنتی بیوتیک به موادخوراکی دام ها، مقداری سدیم سولفات به آن می‌افزایند (۱۳ کیلوگرم در تن). در اینصورت به دلیل افزایش سولفات، کلسیم در روده‌ی جانور به کلسیم سولفات تبدیل و از تشکیل کمپلکس با تتراسیکلین‌ها رها می‌شود.

بر اساس فارماکوپه‌های اروپایی، اکسی وت شامل ناخالصی‌هایی می‌باشد که همگی آنها دارای هسته یکسان مانند تتراسیکلین هستند. بعضی از آنها را می‌توان در شکل ۱-۲ ملاحظه نمود [۳۵-۳۲].

۱-۱-۲- روش های اندازه گیری تتراسیکلین ها:

متدهای زیادی برای اندازه‌گیری و تشخیص تتراسیکلین‌ها گزارش شده است که شامل روش‌های بیولوژیکی [۳۶]، کروماتوگرافی، لومینسانس، الکتروفورز، ELISA [۳۷،۳۸] و ولتامتری هستند.

روش‌های بیولوژیکی اگرچه ساده و ارزانند، اما فاقد انتخاب‌گرایی بوده و زمان آزمایش در آنها طولانی می‌باشد. ضمن اینکه این روش‌ها نیمه کمی هستند [۳۹]. به عنوان مثال نمونه ای از این روش که برای غلظت های کمتر از ۵۰mg/mL قابل انجام است، به طور مختصر شرح داده می‌شود. پس از استخراج نمونه با فرمامید و یا مخلوطی از استون، آب و کلریدریک اسید، اندازه گیری از

طریق مقدار نفوذ تتراسیکلین به محیط آگاری آغشته به باسیلوس سیراوس[1] می‌باشد که این آزمایش باید همراه با نمونه شاهد که حاوی مقدار مشخص آنتی‌بیوتیک است، انجام شود [۴۰].

بنابراین برای ارزیابی دقیق، استفاده از سیستم های آنالیز دستگاهی، امروزه متداول‌تر است. در ذیل بعضی از این روش‌ها، به طور خلاصه شرح داده می‌شود.

۱-۱-۲-۱- روش TLC:

امروزه روش‌های TLC در هر آزمایشگاهی قابل انجام است. این روش نیاز به تجهیزات خاصی ندارد. اگرچه امروزه تشخیص های کیفی و کمی در آن از طریق کامپیوتر و دنسیتومترها انجام می‌شود ولی بطور چشمی نیز قابل اجراست. تهیه صفحه TLC برای اندازه‌گیری تتراسیکلین‌ها معمولا نیاز به روش‌های پیش آماده‌سازی دارد. حضور مقادیر ناچیز از فلزات در جاذب های TLC (سیلیکاژل و یا سلولز) [۴۵-۴۱] موجب تشکیل کمپلکس با تتراسیکلین گشته و نهایتا ایجاد زونالیتی[2] قابل توجه می‌کند که جداسازی را مشکل می‌سازد. محققین برای رفع این مشکل معمولا به فاز ساکن و متحرک، مقداری EDTA اضافه می‌کنند تا اثر یون‌های فلزی را کاهش دهند [۵۲-۴۶،۴۲،۴۱] جالب توجه است که با این روش می‌توان هر ۹ نوع تتراسیکلین را از یکدیگر جداسازی و اندازه‌گیری نمود [۵۳]. آشکارسازی تتراسیکلین‌ها در روی جاذب‌های TLC معمولا از طریق $FeCl_3$ [۵۴]، $SbCl_5$ [۵۴]، سولفونیک اسید [۵۴] و گاهی نمک های دی آزونیوم [۴۹-۴۷] انجام می شود. این روش ارزان و بدون خطا بوده اما زمان آنالیز آن طولانی است.

۱-۱-۲-۲ روش الکتروفورز:

اصول روش الکتروفورز این مورد را حکم می‌کند که نمونه بایستی یونی (باردار) باشد. با توجه به حضور گروه آمینی در تتراسیکلین‌ها، می‌توان آنها را به صورت یونی در آورد و در نتیجه امکان آنالیز آنها از طریق الکتروفورز مهیا نمود. امروزه بیشتر از الکتروفورز موئینه‌ای استفاده می‌شود ولی همان نکته منفی که در TLC ذکر شد، اینجا نیز صادق است (زمان آنالیز طولانی).

[1] Bacillus Cereus
[2] Zonality

بعضی از محققین اندازه گیری همزمان تتراسیکلین، اکسی تتراسیکلین و کلروتتراسیکلین را در شیر، سرم و اوره با استفاده از این روش ارائه کرده اند [۵۵].

۱-۱-۲-۳- روش LC:

کروماتوگرافی مایع (کلاسیک) به طور عام برای جداسازی و اندازه گیری تتراسیکلین ها در شیر گاو بکار می‌رود. اساس این کار بر روی تمایل قوی تتراسیکلین برای تشکیل پیوند با گروه‌های سیلانولی با بستر سیلیکایی دارد [۵۶]. به عنوان فاز ساکن گاهی از پلیمر پلی‌استایرن و دی‌ونیل‌بنزن نیز استفاده شده است. آشکارسازی از طریق دتکتور UV و فاز حامل مخلوطی از استونیتریل، استیک اسید و آب است [۵۷].

۱-۱-۲-۴- HPLC:

به طور کلی، روش های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به طور گسترده‌ای در آنالیز داروها بکار می‌رود. بعضی از محققین با استفاده از HPLC با فاز معکوس توانستند به طور همزمان تتراسیکلین، اکسی تتراسیکلین و ۴- اپی تتراسیکلین را در شیر بررسی کنند. استخراج تتراسیکلین از شیر به طریق SPE بود. نوع ستون $C_{۱۸}$ و دتکتور از نوع دتکتور آرایه های فتودیودی، فاز حامل نیز شامل اگزالیک اسید، استونیتریل و متانول بود [۷].

معمولا برای جلوگیری از مزاحمت یون‌های فلزی و حذف امکان تشکیل کمپلکس‌ها، در فاز حامل از اسیدهای آلی مانند سیتریک اسید [۶۰-۵۸] و تارتاریک اسید [۵۹] استفاده می شود. امروزه روش HPLC همراه روش اسپکتروسکوپی جرمی نیز برای اندازه گیری تتراسیکلین ها بکار می‌رود [۶۳-۶۱].

۱-۱-۲-۵- روش های شیمی لومینسانس:

شیمی لومینسانس یک روش جدید و ساده برای تعیین آنتی بیوتیک‌ها بویژه تتراسیکلین‌هاست. در این روش طی یک واکنش شیمیایی (معمولا اکسیداسیون)، محصول واکنش به دلیل برانگیختگی مولکول، نور نشر می‌کند و به حالت پایه باز می‌گردد. تتراسیکلین‌ها در نتیجه واکنش با ایروپیوم (III) [۶۴]، N- بروموسوکسینیک آمید [۶۵]، هگزا سیانوفرات (III) در محلول‌های

قلیایی [۶۶]، تریس (۲،۲- بی پیریدامول) روتنیم (III) [۶۷] شناسایی می‌شوند. تتراسیکلین‌ها توانایی تشکیل کمپلکس با یون های لانتانید در pH های بالای ۶ را دارا هستند. در این کمپلکس ها انتقال انرژی از لیگاند به فلز رخ می‌دهد. تتراسیکلین در نتیجه تشکیل کمپلکس با [تریس (۲،۲- بی پیریدامول) روتنیم (III)]، Eu (III) را به Eu (II) می‌کاهد. کمپلکس در این حالت برانگیخته است و نور نارنجی تولید می‌کند که می‌تواند موجب اندازه گیری کمی شود. از این روش برای اندازه گیری تتراسیکلین در آب، عسل، داروها و ... بکار می‌رود. شدت لومینسانس را می‌توان با استفاده از رابطه زیر بدست آورد:

که I: شدت لومینسانس و t: مدت زمان اندازه گیری است.

لومینسانس یون Eu (III) با استفاده از یک فیلتر عبوری که می‌تواند طول موج‌های بزرگ‌تر از ۵۸۵ نانومتر را عبور دهد و با استفاده از آشکارساز فوتومولتی پلایر ثبت می‌شود. با رسم منحنی استاندارد در مقابل مقادیر مشخصی از تتراسیکلین می‌توان اندازه‌گیری نمود. بنابراین مقدار لومینسانس با اندازه گیری سطح زیر منحنی بدست می‌آید.

۱-۱-۲-۶- روش های الکتروشیمیایی:

این روش ها به دلیل سادگی معمولا کاربرد زیادی در صنایع دارویی دارد. روش پتانسیومتری که در حقیقت کاربرد الکترود های انتخاب‌گرا در اندازه‌گیری می‌باشد، بسیار ساده، ارزان و همانطور که از نامش پیدا است، انتخاب‌گرا می‌باشد. این امر موجب سهولت در آماده‌سازی نمونه واقعی می‌شود. معمولا روش پتانسیومتری می‌تواند به طور مستقیم و یا غیر مستقیم انجام شود. چنانچه برای گونه مورد نظر الکترود مناسبی وجود داشته باشد، معمولا روش مستقیم آسان تر است و مطابق اصول آن با رسم یک منحنی استاندارد و تشکیل یک سل پتانسیومتری شامل الکترود شناساگر و مرجع اندازه گیری انجام می‌شود.

در صورت عدم دسترسی به یک الکترود مناسب، بهترین راه، روش FI[1] است. در این روش معمولا از معرفی استفاده می‌شود که با گونه مورد نظر واکنش می‌دهد. ضمن اینکه الکترود مناسبی جهت تشخیص و اندازه گیری معرف وجود دارد. البته هیچ اجباری در نوع خاصی از آشکارساز نیست. در این مورد چون روش پتانسیومتری است، آشکارسازی از طریق یک الکترود شناساگر انجام می‌شود. مثلا برای تتراسیکلین از محلول Cu(II) و یک الکترود جامد که حاوی CuS/Ag_2S است، استفاده می‌شود. کاهش غلظت Cu(II) به دلیل واکنش با تتراسیکلین آشکارسازی می‌شود[۶۸].

[1] Flow Injecton

در مقیاس بزرگ تر، بطوریکه تیتراسیون‌ها بتوانند پاسخ مناسبی را ارائه دهند، مثلا در کارخانه‌های داروسازی برای اندازه درصد خلوص محصول تتراسیکلین، می‌توان از تیتراسیون نیز استفاده نمود. معمولا تیترانت هایی نظیر آمونیوم مولیبدات، سدیم وانادات و سدیم هیدروکسید استفاده می شود [۶۹].

در اندازه‌گیری ترکیبات گروه تتراسیکلین، کاربرد میکروالکترودها نیز توجه خاصی را بخود جلب کرده است. این الکترودها به دلیل سطح بسیار کوچک از افت اهمی ناچیزی برخوردار هستند. ضمن اینکه حجم محلول مورد آزمایش نیز بسیار کم است [۷۵-۷۰]. الکترود مناسب برای گروه تتراسیکلین معمولا با رسوب دادن طلا از یک محلول کلوئیدی در روی فلز تنگستن ساخته می‌شود. این الکترود حد اندازه گیری برابر ۰/۰۹mg/L را از خود نشان می‌دهد [۷۶].

آنچه از مقایسه روش‌های پتانسیومتری با روش‌های دیگر ذکر شده حاصل می‌شود، اینست که روش‌های کروماتوگرافی و یا الکتروفورز در حقیقت ضمن اندازه‌گیری کمی، گونه شناسی نیز می‌کنند. در صورتی که روش‌های پتانسیومتری اندازه‌گیری کلی را انجام می‌دهند.

۱-۱-۲-۷- روش های ولتامتری:

تئوری روش‌های ولتامتری در بسیاری از کتاب‌های پیشرفته الکتروشیمی موجود است. بیان آنها در پایان نامه بجز کپی کردن آنها و نهایتا افزایش حجم پایان نامه نتیجه‌ی دیگری ندارد. در هر حال بطور خلاصه این روش‌ها بحث و کاربرد آنها در اندازه‌گیری آنتی بیوتیک‌های گروه تتراسیکلین بررسی می‌شود.

روش‌های ولتامتری در حقیقت، روبش قانونمند پتانسیل و اعمال آن بر روی یک الکترود قطبش پذیر و ثبت شدن جریان عبوری و یا دانسیته جریان است. از آنجاییکه روبش می‌تواند کاتدی و یا آندی باشد، پایه گزاران این علم کلمه کاتد و یا آند را برای الکترود ها شایسته نمی‌دانند و با توجه به اینکه روبش پتانسیل در هر دو جهت می‌تواند باشد و در روی یک الکترود، هر دو فرآیند کاهشی و اکسایشی می‌تواند رخ دهد، کلمه الکترود کار را برای الکترودی که در روی آن فرآیند کاهش و یا اکسایش رخ می‌دهد، نهادند. سیستم کار معمولا سه الکترودی است. پس شامل دو الکترود دیگر است که یکی مرجع و دیگری الکترود مقابل می‌باشد. بر حسب نوع الکترود بکار گرفته شده، نام گذاری روش‌ها مختلف است. مثلا اگر الکترود کار از نوع قطره چکنده جیوه باشد به آن پلاروگرافی می‌گویند که با کاربرد تکنیک های اصلاح شده ای که امروزه وجود دارد، به صورت پلاروگرافی با جریان مستقیم، نرمال پالس، پالس‌های تفریقی، امواج مربعی و با جریان متناوب در آنالیز مواد مورد استفاده قرار می‌گیرد.