

سید محمد علی

۱۳۸۰ / ۹ / ۳۰

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
توسعه دارو



دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشکده داروسازی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه دکتری

موضوع:

جداسازی و بررسی فعالیت آنانتیومرهای مفلوکین بر
پلاسمو دیوم فالسیپارم در *in vitro*

اساتید راهنما:

سرکار خانم دکتر عفت سوری
جناب آقای دکتر مهدی ناطق پور

013730

اساتید مشاور:

جناب آقای دکتر حسن فرسام
جناب آقای دکتر غلامحسین ادریسیان

۳۶۷۱۳

نگارش:

زهرا کاجی

شماره پایان نامه: ۴۲۱۴

سال تحصیلی: ۱۳۷۹-۸۰

و اگر این اثر را قدر و منزلتی باشد، آنرا تقدیم
می‌دارم به حضرت دوست که هرچه دارم از تقدس
بارگاه اوست. بارالهی مرا عزت و بزرگی همان بس
که بنده توام و فخر و سربلندی همان بس که
پروردگار منی، تو آنچنانی که من می‌خواهم پس
مرا نیز آنچنان کن که خود می‌خواهی

تقدیم به :

خاطره به یاد ماندنی مادرم

تقدیم به:

همسرم به پاس شکیبائی و همراهی اش

تقدیم به اساتید ارجمند

سرکار خانم دکتر عفت سوری

جناب آقای دکتر مهدی ناطق پور

با ژرفترین سپاسها از یاریهای بی شائبه شان

با تقدیر و تشکر از اساتید ارجمند :

جناب آقای دکتر حسن فرسام و جناب آقای دکتر

غلامحسین ادریسیان

با تشکر از :

جناب آقای دکتر سید اسماعیل سادات ابراهیمی که

زحمت قضاوت این پایان نامه را بر عهده داشتند.

با تشکر از:

**تمامی عزیزان در آزمایشگاه شیمی عمومی -
شیمی تجزیه و آزمایشگاه مالاریا و لیشمانیا**

و با تشکر از:

تمامی آنانیکه به من آموختند.

عنوان	صفحه
خلاصه فارسی	
مقدمه.....	۱
فصل اول : اهمیت جداسازی ترکیبات کایرال.....	۴
۱-۱- تفاوت فارماکودینامیک انانتیومرهای یک دارو در انسان.....	۵
۱-۱-۱- وراپامیل.....	۵
۱-۱-۲- تیمولول.....	۶
۱-۱-۳- پروپوکسی فن.....	۶
۱-۱-۴- سوتالول.....	۶
۱-۱-۵- کینیدین و کینین.....	۷
۱-۲- تفاوت فارماکوکینتیک انانتیومرهای یک دارو در انسان.....	۷
۱-۲-۱- جذب.....	۷
۱-۲-۲- توزیع (Distribution).....	۸
۱-۲-۲-۱- اتصال پلاسمائی (Plasma Binding).....	۸
۱-۲-۲-۲- اتصال بافتی (Tissue Binding).....	۹
۱-۲-۲-۳- متابولیسم.....	۹
۱-۲-۳-۱- Substrate Stereoselectivity.....	۱۰
۱-۲-۳-۲- Product Stereoselectivity.....	۱۲
۱-۲-۳-۳- Substrate/product stereoselectivity.....	۱۳
۱-۲-۳-۴- فارماکوزنتیک و متابولیسم استریوسلکتیو.....	۱۳

عنوان	صفحه
۴-۲-۱- دفع (Excretion).....	۱۵
۵-۲-۱- استریوسلکتیویته در حیوانات مختلف.....	۱۵
۶-۲-۱- عوامل موثر بر فامارکوکینتیک داروها.....	۱۷
۱-۲-۶-۱- تداخل داروئی انانتیوسلکتیو.....	۱۷
۲-۲-۶-۲- اثر بیماری بر فارماکوکینتیک انانتیومرهای دارو.....	۲۰
۳-۲-۶-۳- اثر سن بر فارماکوکینتیک انانتیومرهای دارو.....	۲۰
فصل دوم: روشهای مختلف جداسازی کایرال.....	۲۱
۱-۲- روشهای غیر کروماتوگرافیک.....	۲۲
۱-۱-۲- دسته بندی فیزیکی کریستالها.....	۲۲
۲-۱-۲- هسته گذاری انتخابی.....	۲۲
۳-۱-۲- کریستالیزه کردن در حلالهای کایرال.....	۲۲
۴-۱-۲- کریستالیزه کردن جزء به جزء نمک های دیاستریومر.....	۲۳
۵-۱-۲- استفاده از ترکیبات تشکیل دهنده کمپلکس مجوف (Inclusion Complex).....	۲۳
۶-۱-۲- روشهای کینتیک یا بیوشیمیائی.....	۲۴
۲-۲- روشهای کروماتوگرافیک جداسازی ترکیبات کایرال.....	۲۴
۱-۲-۲- کروماتوگرافی لایه نازک.....	۲۴
۲-۲-۲- کروماتوگرافی گاز مایع.....	۲۵
۳-۲-۲- کروماتوگرافی فوق بحرانی مایع (SFC).....	۲۵
۴-۲-۲- روشهای Capillary Electrophoresis.....	۲۵

عنوان	صفحه
۲-۲-۵- کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (HPLC).....	۲۶
۲-۲-۵-۱- روش غیرمستقیم.....	۲۶
۲-۲-۵-۲- روش مستقیم.....	۳۰
فصل سوم: مفلوکین	۳۵
۳-۱- تاریخچه.....	۳۶
۳-۲- ساختمان شیمیائی.....	۳۷
۳-۳- مکانیزم عمل مفلوکین.....	۳۷
۳-۴- مقاومت به مفلوکین.....	۴۱
۳-۵- اثر ضدپارازیت انانتیومرهای مفلوکین.....	۴۲
۳-۶- اشکال داروئی مفلوکین.....	۴۳
۳-۷- سمیت.....	۴۴
۳-۷-۱- سمیت در حیوان.....	۴۴
۳-۷-۲- عوارض جانبی در انسان.....	۴۴
۳-۸- روشهای تعیین مقدار مفلوکین.....	۴۶
۳-۸-۱- روشهای تعیین مقدار مفلوکین راسمیک.....	۴۶
۳-۸-۲- روشهای تعیین مقدار انانتیومرهای مفلوکین.....	۴۶
۳-۹- فارماکوکینتیک.....	۴۶
۳-۹-۱- فارماکوکینتیک مفلوکین راسمیک تک دوز.....	۴۶
۳-۹-۱-۱- جذب.....	۴۷

عنوان	صفحه
۲-۱-۹-۳- توزیع.....	۴۷
۳-۱-۹-۳- متابولیسم.....	۴۸
۴-۱-۹-۳- دفع.....	۴۹
۲-۲-۹-۳- فارماکوکینتیک چند دوز در افراد سالم.....	۵۰
۱-۲-۹-۳- بزرگسالان.....	۵۰
۲-۲-۹-۳- زنان باردار.....	۵۰
۳-۲-۹-۳- مادران شیرده.....	۵۱
۳-۳-۹-۳- فارماکوکینتیک در بیماران مبتلا به مالاریای فالسیپارم.....	۵۱
۴-۳-۹-۳- فارماکوکینتیک استریوسلکتیو.....	۵۱
فصل چهارم: بخش تجربی	
۱-۴- مقدمه.....	۵۳
۲-۴- مواد شیمیائی و معرفها.....	۵۴
۳-۴- دستگاههای مورد استفاده.....	۵۵
۴-۴- محلولهای استاندارد.....	۵۵
۱-۴-۴- تهیه محلول مادر مفلوکین.....	۵۶
۲-۴-۴- تهیه بافر بورات.....	۵۶
۳-۴-۴- تهیه محلول FLEC.....	۵۷
۴-۴-۴- تهیه محیط کشت اولیه PCM (Preliminary Culture Medium).....	۵۷
۵-۴-۴- تهیه محیط کشت CCM (Complete Culture Medium) از PCM.....	۵۸

صفحه	عنوان
۵۸	۴-۴-۶- تهیه خون با هماتوکریت ۱۰٪
۵۹	۴-۴-۷- تهیه بافر با pH = 7.2
۵۹	۴-۴-۸- تهیه رنگ گیمسا با غلظت ۵٪
۵۹	۴-۴-۹- تهیه محلول سوربیتول ۵ W/V٪
۵۹	۴-۴-۱۰- تهیه محلول جنتامایسین
۵۹	۴-۵- جداسازی انانتیومرهای مفلوکین
۶۰	۴-۵-۱- جداسازی دیاستریومر حاصل از (-)- مفلوکین و معرف
۶۰	۴-۵-۲- جداسازی دیاستریومر حاصل از (+)- مفلوکین و معرف
۶۰	۴-۵-۳- هیدرولیز دیاستریومرهای حاصل و جداسازی انانتیومر (+) و (-) مفلوکین
۶۱	۴-۵-۴- تهیه ملح هیدروکلراید انانتیومر (+) و انانتیومر (-) مفلوکین
۶۱	۴-۶- شرایط کروماتوگرافی جهت تعیین خلوص انانتیومرها
۶۲	۴-۷- تعیین چرخش نوری انانتیومرهای مفلوکین
۶۲	۴-۸- تعیین فعالیت ضدپارازیت مفلوکین و انانتیومرهای آن
۶۲	۴-۸-۱- جداسازی پلاسمودیوم فالسیپارم
۶۳	۴-۸-۲- آدآپتاسیون پلاسمودیوم فالسیپارم جدا شده در شرایط آزمایشگاهی
۶۳	۴-۸-۳- کشت پلاسمودیوم فالسیپارم
۶۴	۴-۸-۴- مراحل انجام تست تعیین حساسیت دارویی
۶۴	۴-۸-۴-۱- تعیین پارازیتی پلاسمودیوم فالسیپارم
۶۵	۴-۸-۴-۲- Synchronization یا هم زمان کردن پلاسمودیوم فالسیپارم
۶۵	۴-۸-۴-۳- تست تعیین حساسیت دارویی

عنوان	صفحه
۵-۸-۴- آماده سازی لام‌ها برای بررسی میکروسکوپی.....	۶۷
۶-۸-۴- مطالعه میکروسکوپی.....	۶۷
۷-۸-۴- محاسبات.....	۶۸
فصل پنجم: نتایج و بحث.....	
۱-۵- جداسازی انانتیومرهای مفلوکین و خالص‌سازی آنها.....	۷۱
۱-۱-۵- جداسازی اولیه و خلوص انانتیومرهای بدست آمده.....	۷۱
۲-۱-۵- خالص‌سازی مجدد انانتیومر (+) - مفلوکین.....	۷۲
۳-۱-۵- اندازه‌گیری نقطه ذوب انانتیومرهای جدا شده.....	۷۴
۴-۱-۵- اندازه‌گیری چرخش نوری انانتیومرهای مفلوکین.....	۷۴
۲-۵- تعیین فعالیت ضد پارازیت مفلوکین و انانتیومرهای آن.....	۷۴
۱-۲-۵- فعالیت ضد پارازیت مفلوکین هیدروکلراید راسمیک.....	۷۵
۲-۲-۵- فعالیت ضد پارازیت انانتیومر (-) - مفلوکین هیدروکلراید.....	۷۷
۳-۲-۵- فعالیت ضد پارازیت انانتیومر (+) - مفلوکین هیدروکلراید.....	۷۹
۴-۲-۵- مقایسه فعالیت ضد پارازیت انانتیومرهای (+) و (-) - مفلوکین هیدروکلراید و مفلوکین هیدروکلراید راسمیک.....	۸۱
۳-۵- نتیجه نهائی و بحث.....	۸۴
خلاصه انگلیسی.....	۸۶
منابع.....	۸۷

خلاصه

در حدود ۶۰٪ از ترکیبات مورد استفاده در درمان کایرال می‌باشند که حدود ۹۰٪ این ترکیبات به صورت راسمیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعات نشان‌دهنده تفاوت بین انانتیومرها است. درحالی‌که یک انانتیومر دارای اثر بیولوژیک خاصی است انانتیومر دیگر می‌تواند همان اثر یا اثری کاملاً متفاوت و یا کاملاً بی‌اثر داشته باشد. هم‌چنین در بسیاری از موارد ویژگیهای فارماکوکینتیک انانتیومرهای یک مخلوط راسمیک نیز با یکدیگر تفاوت دارند. بنابراین ضرورت روز افزون انجام تحقیقات آکادمیک و صنعتی برای بررسی خصوصیات فارماکودینامیک و فارماکوکینتیک ترکیبات دارویی کایرال احساس می‌گردد.

در مطالعه حاضر ابتدا اهمیت جداسازی و سپس روشهای مختلف جداسازی انانتیومرها مورد بحث قرار گرفته است و سپس بررسی و مقایسه فعالیت مخلوط راسمیک مفلوکین هیدروکلراید و انانتیومرهای (+) و (-) - مفلوکین هیدروکلراید بر روی پلاسمودیوم فالسیپارم مقاوم به کلروکین مورد مطالعه قرار گرفته است.

مفلوکین دارویی کایرال است که به صورت مخلوطی از انانتیومرهای (+) و (-) در درمان و پیشگیری از مالاریا مورد استفاده قرار می‌گیرد. انانتیومرهای این دارو در ویژگیهای فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک متفاوت می‌باشند. از طرفی در چندین مطالعه که روی فعالیت ضد پلاسمودیوم فالسیپارم انانتیومرهای مفلوکین انجام شده است نتایج متناقضی گزارش شده است.

جداسازی انانتیومرهای مفلوکین بر پایه کریستالیزاسیون جزء به جزء نمکهای دیاستریومر انجام گرفت. در این روش از معرف (+) - ۳ - برومو - ۸ - کامفورسولفونیک اسید برای تشکیل مشتق دیاستریومر انانتیومرهای مفلوکین استفاده شد. مخلوط دیاستریومرهای حاصل با توجه به تفاوت میزان حلالیت جدا شده و با چند بار کریستالیزاسیون خالص شد. دیاستریومرها، هیدرولیز شده و انانتیومرهای (+) و (-) خالص جداسازی گردید. پس از جداسازی و خالص‌سازی انانتیومرها