

## مقایسه استخراج همین با دو روش اسید استیک و استرنسیوم کلراید از کیسه های خون تاریخ گذشته

## چکیده:

**زمینه و هدف:** همین (Hemin)، ترکیب پورفیرینی از مشتقات هموگلوبین است که خود، ماده پیش ساز در تهیه بقیه مشتقات پورفیرینی هموگلوبین می باشد. این ماده دارای کاربردهای فراوانی در پزشکی می باشد و همچنین ماده اولیه تهیه هماتین است. بر این اساس و با در نظر گرفتن کاربردهای وسیع این دارو در درمان و تشخیص بیماریها و کاربردهای تحقیقاتی آن، بر آن شدیم تا علاوه بر سنتز این ماده در فاز آزمایشگاهی برای اولین بار در کشور، بهترین روش سنتز همین از ضایعات خونی را با بالاترین میزان بازدهی تعیین نماییم.

**روش بررسی:** در روش اول به خون سیترا، استیک اسید گلاسیال و کلرید سدیم در دمای بالا اضافه گردید. سپس کریستالهای همین با سرد کردن مخلوط از آن جدا شد و در نهایت محصول بدست آمده توسط طیف سنجی مرئی و طیف سنجی مادون قرمز با نمونه استاندارد مقایسه گشت. علاوه بر این به منظور مقایسه بازدهی، خون سیترا، خون سیترا، لیز شده با آب مقطر و سلولهای خون سیترا شسته شده با نرمال سالین، به عنوان ماده اولیه در تهیه همین، مورد استفاده قرار گرفت. در روش دوم، به محلول استرنسیوم در اسید استیک و استون، خون را اضافه نمودیم. پس از رسوب کریستالهای همین، آنها را با استون شسته و خشک کردیم.

**یافته ها:** وضوح گروههای عاملی موجود در نمونه همین در نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز، نشان دهنده تولید این ترکیب است. بررسی نتایج طیف سنجی مرئی در مقایسه با نمونه شاهد و همچنین نتایج توزین نمونه ها، مؤید بازدهی بالای مراحل سنتز و خلوص ترکیبات حاصل از آنهاست. بر اساس نتایج حاصله، تولید همین با استفاده از روش استرنسیوم کلراید از بازدهی وزنی و درجه خلوص بالاتری نسبت به سایر روشهای بکار رفته، برخوردار بود.

**نتیجه گیری:** استفاده از خون سیترا بدون تغییر در بافت خون، محصول وزنی بیشتری را در مقایسه با انواع دیگر به دست می دهد. علاوه بر این روش اسید استیک با استفاده از خون سیترا، بدون نیاز به انجام مراحل اضافی روی خون، روش بهینه برای تولید به نظر می رسد.

**واژه های کلیدی:** همین، خون، اسید استیک، استرنسیوم کلراید، استخراج

## سید علی علوی

پزشک عمومی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق

## شهلا مرادی

لیسانس شیمی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق

## نوشین میرخشی

پزشک عمومی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق

## آتوسا قدیری

لیسانس شیمی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق

## فاطمه هادیزاده

پزشک عمومی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق

## نویسنده مسئول: سید علی علوی

تلفکس: ۰۳۱۱-۶۶۹۸۵۱۸

آدرس: اصفهان، خ توحید، خ قزلباش، پلاک ۵

شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان، شرکت تحقیقاتی

حکیمان شرق - کد پستی: ۸۱۷۳۹۵۴۵۴۱

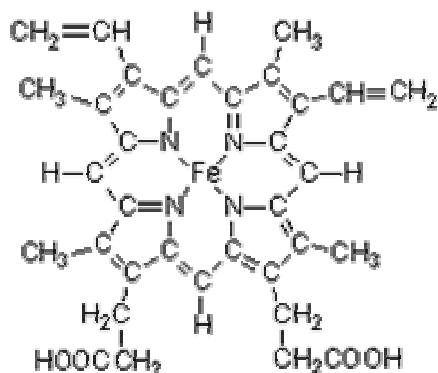
پست الکترونیکی: alavi@pharm.mui.ac.ir

وصول مقاله: ۸۶/۱/۸

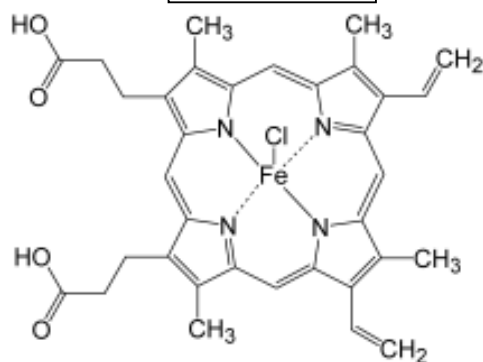
اصلاح نهایی: ۸۶/۳/۲۲

پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱۶

شکل ۱- فرمول باز همین



شکل ۲- فرمول باز همین



### روش بررسی

خون مورد نیاز را از سازمان انتقال خون اصفهان، استیک اسید گلاسیال، کلرید سدیم و متانول را از شرکت MERCK و همین را از شرکت SIGMA تهیه کردیم. در این مطالعه از pack cell هایی که تاریخ انقضای آنها گذشته بود، استفاده کرده، کلیه آزمایشها را در شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق اجرا نمودیم.

۱- روش اسید استیک: به یک حجم خون سیتراته، ۳ حجم استیک اسید گلاسیال و یک گرم کلرید سدیم در دمای  $90^{\circ}\text{C}$  اضافه کردیم. مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه در همان دما نگهداشتیم پس از آن کریستال همین را با سرد کردن مخلوط از آن جدا و با کاهش دما، فیلتر کردیم. رسوب با سانتریفوژ و روی فیلتر با متانول شستشو شد.

برای ماده اولیه از دو شکل دیگر خون نیز استفاده کردیم:

الف- خون سیتراته لیز شده با آب مقطر هم حجم

ب- خون سیتراته شسته شده با سه حجم نرمال سالین

همین (Hemin)، یا Ferriprotoporphylin IX chloride، با فرمول  $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{ClFeN}_4\text{O}_4$  و وزن مولکولی ۶۵۲، ترکیب پورفیرینی از مشتقات هم می باشد (شکل ۱ و ۲) که خود ماده پیش ساز در تهیه بقیه مشتقات پورفیرینی هموگلوبین، از جمله هماتین (Hematin)، هماتوپورفیرین (Hematoporphyrin)، هماتوپورفیرین استیله (Acetylated Hematoporphyrin) و پورفیرین سدیم (Porfimer Sodium) است (۱). در تحقیقات دارویی کارایی همین در مهار لیگومر شدن بتا آمیلوئید (که نقش کلیدی در ایجاد آلزایمر دارد) و جلوگیری از بروز آلزایمر تأیید شده است (۲). کاربرد دیگر همین در سنتز بتاهماتین (Beta-hematin) می باشد (۳). این ماده با انگل مالاریا برای کاهش سمیت مشتقات هماتین در پروسه فعالیت انگل ساخته می شود و به این دلیل شاخص بسیار مهمی برای اندازه گیری میزان تأثیر داروهای ضد مالاریا می باشد. فرم سنتیک بتاهماتین (هموزوئین - Hemozoin) برای این اندازه گیریها مورد استفاده قرار می گیرد (۴-۶). علاوه بر این همانطور که گفته شد، همین پیش ساز سنتز هماتین می باشد که هماتین دارای کاربردهای فراوانی از جمله درمان بیماری پورفیریا (۷-۹) و مهار تقسیم سلولهای استوسارکوم می باشد (۱۰).

همین با افزایش تجلی ژن هم اکسیژناز-۱ منجر به جلوگیری از آنمی نفروژنیک (۱۱) و افزایش مقاومت جزایر پانکراس نسبت به اکسیداتیو استرس در شرایط هایپرگلاسمیک می گردد (۱۲). همچنین، افزودن همین به والپروئیک اسید منجر به افزایش ۱۰ برابری در سنتز گاماگلوبولین شده است که در درمان هموگلوبینوپاتی ها نقش کلیدی دارد (۱۳).

شایان ذکر است که همین را می توان از ضایعات خونی تولید نمود. (۱۴-۱۶) علیرغم تایید داروی همین از سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) (۹) و همچنین کاربردهای وسیع این دارو در درمان و تشخیص بیماریها و اهمیت تحقیقاتی آن، تا کنون سنتز آن در داخل کشور صورت نگرفته است. از این روی، ما در این مطالعه بر آن شدیم تا علاوه بر سنتز همین از ضایعات خونی، به بررسی مقایسه ای بازدهی سه شکل مختلف از خون بعنوان ماده اولیه فرایند سنتز بپردازیم.

### یافته ها

نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز نمونه خشک همین های سنتتیک و نمونه استاندارد در محدوده  $4000-650 \text{ cm}^{-1}$ ، حاکی از تشابه پیکهای مربوط به گروههای عاملی است. برای نمونه، طیف جذبی نمونه تولید شده با روش استیک اسید با ماده اولیه خون سیراته و طیف نمونه استاندارد در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است.

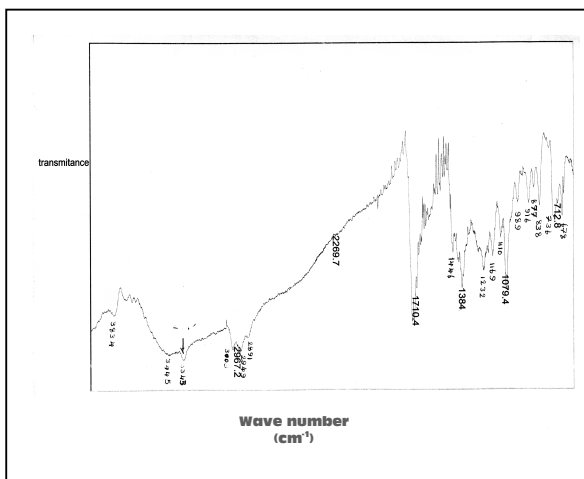
نتایج حاصل از طیف نگاری محلول نمونه همین سنتتیک و نمونه استاندارد در سود ۱۰٪ (w/v) با اسپکتروفتومتر نور مرئی در محدوده طول موج های  $450-800 \text{ nm}$ ، نشان دهنده وجود پیکهای جذبی  $623 \text{ nm}$ ،  $564$ ،  $540$ ،  $508$  و تطابق پیکهای جذبی بین نمونه های استاندارد و سنتتیک بود. دو نمونه از طیف های جذبی نور مرئی نمونه ها در نمودارهای ۳ و ۴ نشان داده شده اند.

۲- روش استرانسیوم کلراید:

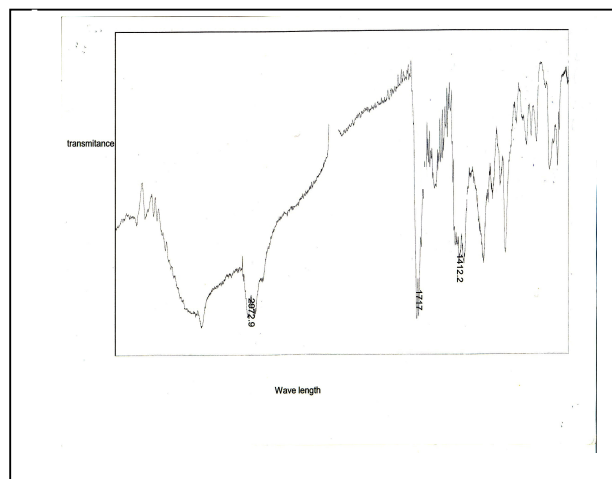
ابتدا یک محلول استوک ۲% (w/v) از  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  در استیک اسید گلاسیال، تهیه گردید. یک حجم از محلول  $\text{SrCl}_2$  با سه حجم استون مخلوط شد. به ۱۲ حجم از این حلال، یک حجم خون اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه دردمای آزمایشگاه نگه داشته شد. سپس مخلوط توسط قیف بوختر فیلتر و رسوب با ۲ حجم از استون شسته شد. با قرار دادن در انکوباتور  $40^\circ \text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه، رسوبها خشک گردید. برای شناسایی محصول عمل، طیف سنجی مادون قرمز نمونه خشک همین سنتتیک، داخل قرص پتاسیم بروماید توسط دستگاه Buck Scientific مدل Buck-500 در محدوده  $4000-650 \text{ cm}^{-1}$  طیف نمونه استاندارد با استفاده از همین شرکت سیگما، ترسیم شد. علاوه بر این محلول نمونه ها در سود ۱۰٪ (w/v) با اسپکتروفتومتر نور مرئی Secomam در محدوده طول موج های  $450-800 \text{ nm}$  طیف نگاری شد.

به منظور تعیین درجه خلوص محصول، منحنی استاندارد با استفاده از جذب نوری همین استاندارد در  $508 \text{ nm}$  کشیده شد و جذب نوری سایر نمونه ها در این طول موج با آن مقایسه گردید. محاسبات برای تعیین هزینه مواد اولیه مورد استفاده برای تولید، با هر یک از دو روش اسید استیک و استرانسیوم، بر اساس قیمت های کتاب MERCK 2006 صورت گرفت.

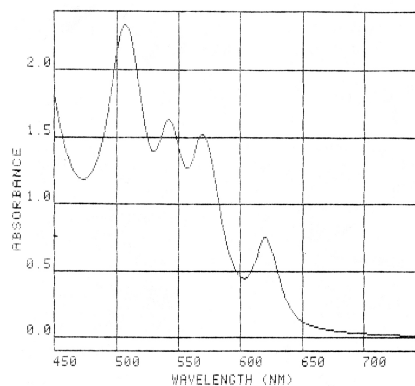
نمودار ۲- طیف مادون قرمز نمونه همین سیگما



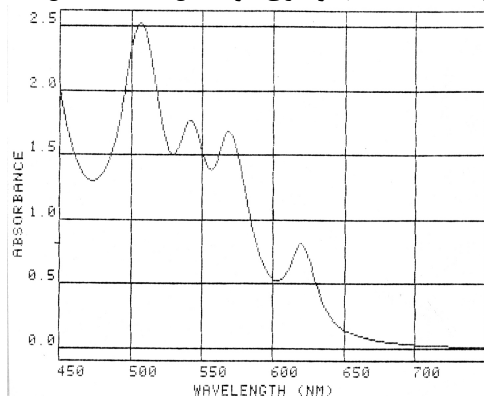
نمودار ۱- طیف مادون قرمز نمونه همین سنتتیک



نمودار ۳- طیف جذب نور مرئی نمونه همین شرکت سیگما



نمودار ۴- طیف جذب نور مرئی نمونه همین سنتتیک به روش اسید استیک



جدول ۱- بازدهی وزنی روشهای تولید همین نسبت به خون مصرفی

۱/۳۰٪	خون سیتراته	روش اسید استیک
۱/۱۸٪	خون سیتراته لیز شده	
۱/۲۸٪	خون سیتراته شسته شده	
۱/۴۰٪		روش استون استیک اسید-SrCl <sub>2</sub>

کششی مشخصه گروههای عاملی مهم مانند O-H ، N-H ، C=O را مشاهده کرد و ناحیه 900 تا  $1300\text{ cm}^{-1}$  که ناحیه اثر انگشت (Finger Print) است و برای هر ترکیب ساختار ویژه ای دارد، تشکیل شده است (۱۸). در نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز بین ساختار طیف نمونه سنتتیک و نمونه شاهد (نمودارهای ۱ و ۳) تشابه قابل توجهی دیده میشود. در طیف حاصل از نمونه سنتتیک، در ناحیه گروه های عاملی، در محدوده  $1540-1850\text{ cm}^{-1}$ ، پیک جذب واضح و قوی در  $1717\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه عاملی کربونیل C=O دیده می شود که این گروه در نمونه شاهد در فرکانس جذب  $1710/4\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده است. حضور پیک پهن در  $3370\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده وجود گروه هیدروکسیل است (۱۸) که به همراه گروه کربونیل شاهدی بر حضور گروه کربوکسیلیک اسید می باشد. وجود نوارهای جذبی قوی در محدوده  $650-900\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده ساختار آروماتیک در ترکیب است و

بازدهی روشهای تولید بکار رفته در جدول شماره یک آورده شده است.

منحنی استاندارد جذب نوری در  $508\text{ nm}$  با استفاده از نمونه استاندارد، حاکی از تبعیت منحنی از قانون بیرلامبرت بود. مقایسه درجه خلوص محصول عمل با هر یک از روشها نسبت به محصول شرکت سیگما برای نمونه های تهیه شده به روش اسید استیک با خون سیتراته ، خون سیتراته لیز شده ، خون سیتراته شسته شده و روش استرانسیوم، به ترتیب عبارت بود از : ۸۹درصد ، ۸۸درصد ، ۹۳درصد و ۹۴درصد و در نهایت محاسبه هزینه مواد مصرفی برای تولید یک کیلوگرم محصول با هر یک از دو روش اسید استیک و استرانسیوم کلراید ، عبارت بود از  $12/6$  میلیون ریال برای روش اول و  $43/3$  میلیون ریال برای روش دوم.

### بحث

ما در این مطالعه دو روش سنتز همین با استفاده از اسید استیک و استرانسیوم کلراید را با بکارگیری اصول کلی روش سنتز همین که توسط Kevin M Smith و همکاران جهت تولید همین ارائه شده است، مقایسه نمودیم (۱۷). اگرچه این دو روش از قدیم در سنتز همین مورد استفاده قرار می گرفته اند، تا کنون از نظر میزان بازدهی و درجه خلوص محصول مورد مقایسه قرار نگرفته اند.

طیف مادون قرمز در محدوده  $400$  و  $4000\text{ cm}^{-1}$  (بین نواحی مرئی و میکروویو) از ترکیب محدوده  $1300$  تا  $4000\text{ cm}^{-1}$  که ناحیه گروههای عاملی است و در آن می توان فرکانسهای

مقایسه طیفهای گرفته شده از نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی ضمن نشان دادن تطابق قله های جذبی، چون مطابق کاتالوگ شرکت سیگما، درجه خلوص همین این شرکت، لااقل ۸۰٪ اعلام شده است و ماده اولیه نشان دهنده درجه خلوص نمونه ها نیز می باشد. اینکه نمونه های سنتتیک نسبت به نمونه شرکت سیگما از درجه خلوص بالاتری برخوردارند، مربوط به روش ساخت، مراحل تخلیص و مواد اولیه می باشد مورد استفاده از خون گاو بوده است، ممکن است علت این تفاوت مربوط به ماده اولیه خون باشد؛ چون ما از خون انسان برای این منظور استفاده نمودیم. علاوه بر این قیمت هر ۲۵ گرم از نمونه همین شرکت سیگما (با شماره کاتالوگ H 5533) معادل ۱۷۸ میلیون ریال می باشد، این در حالی است که قیمت تمام شده این ماده با ۱۳٪ خلوص بالاتر، همانطور که گفته شد معادل ۴۳/۳ میلیون ریال است که علیرغم خلوص بیشتر، قیمت آن معادل یک چهارم نمونه شرکت سیگماست.

**نتیجه گیری** از مقایسه بازدهی روشهای تولید و هزینه مواد اولیه و در نظر گرفتن طولانی تر بودن فرایند تولید با روش استرانسیوم کلراید نسبت به روش اسید استیک، روش اسید استیک با استفاده از خون سیترا، بدون نیاز به اجرای مراحل اضافی روی خون، روش بهینه برای تولید به نظر می رسد.

نوارهای جذبی در ناحیه وسیع  $1200-800 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی ضعیف C-C است. همچنین نوار جذبی حاصل از ارتعاش کششی ضعیف گروههای C-H اشباع در ناحیه  $3000-2840 \text{ cm}^{-1}$  دیده می شود. گروه  $\text{CH}_3$  نیز دارای نوار مشخص در  $2872-2962$  است (۱۷). همانطور که حضور چند گروه متیل در یک مولکول، نوار جذبی قوی در این ناحیه می دهد، برای نمونه همین شاهد و سنتتیک این نوار جذبی به وضوح دیده می شود. اتصالات C-H آلیفاتیک دارای پیکهای قوی در نزدیکی  $2890 \text{ cm}^{-1}$  هستند. همچنین وجود تشابه کامل در ساختار ویژه ناحیه اثر انگشت ( $900 \text{ cm}^{-1}$ - $1300$ ) تأییدی بر یکسان بودن دو نمونه سنتتیک و شاهد است. سایر پیکها در دو ترکیب، مشابه هم بوده و نشان دهنده اتصالات  $\text{C}=\text{C}$  مزدوج و C-N می باشند.

در مورد نتایج حاصل از طیف سنجی مرئی، جذب مولکولی در ناحیه فرابنفش و مرئی بستگی به ساختمان الکترونی ترکیب دارد و از ارتقای الکترونها از اوربیتالهای واقع در تراز اصلی به اوربیتالهای با تراز انرژی بالاتر (تراز برانگیخته) حاصل می شود این طیف سنجی بیشتر به آن دسته از ترکیبات آلی محدود می شود که دارای سیستم های مزدوج باشند (۱۸).

## Refences

- 1) Budavari S. *The Merck Index*, 12th ed. New york: Merck & Co; 1996. p. 792-794.
- 2) Howlett D, Cutler P, Heales S, Camilleri P. *Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation*. FEBS Lett 1997; 417:249-51
- 3) Bohle DS, Helms JB. *Synthesis of beta-hematin by dehydrohalogenation of hemin*. Biochem Biophys Res Commun 1993;193(2):504-8.
- 4) Kurosawa Y, Dorn A, Kitsuji-Shirane M, Shimada H, Satoh T, Matile H, et al. *Hematin polymerization assay as a high-throughput screen for identification of new antimalarial pharmacophores*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:2638-44
- 5) Dominguez JN, Leon C, Rodrigues J, Gamboa de Dominguez N, Gut J, Rosenthal PJ. *Synthesis and evaluation of new antimalarial phenylurenyl chalcone derivatives*. J Med Chem. 2005; 48(10):3654-8.
- 6) Ncozaki KK, Egan TJ. *A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds*. Anal Biochem 2005; 338(2):306-19.

- 7) Maramattom BV, Zaldivar RA, Glynn SM, Eggers SD, Wijidicks EF. *Acute intermittent porphyria presenting as a diffuse encephalopathy*. Ann Neurol 2005; 57(4):581-4.
- 8) Tenhunen, R., Mustajoki, P. *Acute porphyria: treatment with heme*. Semin Liver Dis 1998; 18(1): 53-5.
- 9) Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, Kushner JP, Pierach CA, Pimstone NR, et al. *Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias*. Ann Intern Med 2005; 142(6):439-50.
- 10) Ortalli I, Pedrazzi G, Giuliani N, Cai SZ, Fano V, Ma W, et al. *The possible role of hematin and Mossbauer effect in the inhibition of osteosarcoma cell proliferation*. Anticancer Res 1998; 18(6A): 4127-30
- 11) Liu S, Shi L, Liu X. *Effect of heme oxygenase-1 inducer hemin on chronic renal failure rats*. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci. 2004;24(3):250-3
- 12) Won KC, Moon JS, Eun MJ, Yoon JS, Chun KA, Cho IH, Kim YW, Lee HW. *A protective role for heme oxygenase-1 in INS-1 cells and rat islets that are exposed to high glucose conditions*. J Korean Med Sci. 2006 Jun;21(3):418-24.

- 13) Marianna P, Kollia P, Akel S, Papassotiriou Y, Stamoulakatou A, Loukopoulos D. *Valproic acid, trichostatin and their combination with hemin preferentially enhance gamma-globin gene expression in human erythroid liquid cultures*. Haematologica. 2001;86(7):700-5
- 14) Senior J.O. *The merck index*. 13<sup>th</sup> ED. USA; 2001; P:829.
- 15) Nishida L., *Synthesis of heme compounds from blood*. Biochim. Biophys. Acta, 1957,26:437-442.
- 16) Tsutsui K., *Affinity chromatography of heme-binding proteins: Synthesis of heme-agarose*. Meth. Enzymol., 1986, 123:331

17) Kevin M Smith, J E Falk. *Synthesis and Preparation of Porphyrin Compounds*. Porphyrins and metalloporphyrins. Amsterdam; New York : Elsevier Scientific. 1975;p:46-53

۱۸) ویلیام کمپ. طیف بینی آلی. ترجمه عباس ترسلی، مجید هروی، مهدی بکاوی. چاپ اول، تهران، نشر علوم دانشگاهی، ۱۳۷۷، صفحات ۲۶-

۱۱۷-۱۳۰ و ۴۲