پزشک آموز

به من نگاه کن

اولین رسانه دیجیتال در حوزه علوم پزشکی

011-3335 5440
0901 601 9192
0901 601 9192

pezeshkamooz.co@gmail.com
poshtibani@pezeshkamooz.com
pezeshkamooz.com

هدف کلی درس: آشنایی با روش های کنترل کیفی مواد اولیه، فراورده های دارویی، کنترل ناخالصی ها، ناپایداری های دارویی، نقش اصول GMP در فرایند کنترل کیفیت نهایی

فصل دوم: کاربرد واکنش های شیمیایی در آنالیز

پس از مطالعه این فصل شما قادر خواهید بود:

- مشتق سازی و کاربرد آن در شناسائی و اندازه گیری ترکیبات آلی به روش های شیمیایی و دستگاهی را بیان نمایید .
- ترکیبات حاوی گروه های عاملی هیدروکسی و تیول را به روش های مختلف شیمیایی و دستگاهی شناسایی یا اندازه گیری نمایید.
- میزان آب موجود در فراورده های داروئی را اندازه گیری کنید.
- روش های مختلف شیمیایی و دستگاهی برای شناسایی یا اندازه گیری ترکیبات حاوی گروه آمین، کربونیل یا گروه عاملی کربوکسیل و مشتقات مربوطه را بیان کنید.

☑ مقدمه

اغلب متد های آنالیتیکی براساس واکنش های شیمیایی هستند. مثلا روش های تیتراسیون برای اندازه گیری مواد اولیه دارویی و یا گاهی اوقات در آنالیز عنصری از واکنش شیمیایی استفاده می کنیم. گاهی استفاده از واکنش های شیمیایی، به همراه یکسری تکنیک های دستگاهی است که به آن ها متصل می شود؛ مثلا یک کار شیمیایی انجام می دهیم و یک مشتق می سازیم و بعد از آن یک متد فیزیکی یا دستگاهی انجام می دهیم تا دقت و حساسیت متد را افزایش دهیم.

وقتی کار شیمیایی انجام می دهیم هدف رسیدن به یک ترکیب است که ممکن است زمان طولانی طی شود و راندمان پایین باشد ولی چون هدف ساخت ترکیب است باز هم این کار ارزشمند است.

ولی در این درس هدف این است که از شیمی برای اندازه گیری و آنالیز دارو استفاده کنیم که تفاوت آن با روش قبل این است که ما نمی‌توانیم زمان طولانی را برای اندازه گیری یک ترکیب صرف کنیم و نمی توانیم یک راندمان کم (20 یا 30 درصد) را برای یک واکنش آنالیتیکی در نظر بگیریم.

در روش های آنالیتیکی دو قسمت عمده وجود دارد :

1) واکنش شیمیایی یا واکنش هایی که در آنها نمونه محصول ایجاد می شود مثلا a و b واکنش می دهند و c و d را میسازند.
2) اندازه گیری نهایی یا تشخیص انتهای کار را انجام بدهیم و بتوانیم بگوییم همه ماده اولیه به محصول تبدیل شده و بر این اساس اندازه گیری ماده اولیه را انجام دهیم.

به طور کلی یک واکنش آنالیتیکی را می توان بصورت زیر نوشت:

محصول 1 + محصول 2 ⟷ معرف + نمونه

برای این که کارایی متد آنالیتیکی ارزشمند باشد:

1) تعادل در واکنش آنالیتیکی برای ما معنی ندارد. ما از یک واکنش تعادلی نمی توانیم به عنوان یک واکنش آنالیتیکی استفاده کنیم.
2) سرعت واکنش باید مناسب باشد تا بتوانیم اندازه گیری را در زمان مناسب انجام دهیم.

چون اغلب واکنش های شیمیایی ممکن است تعادلی باشند یا سرعت کمی داشته باشند برای تبدیل این واکنش ها به واکنش های آنالیتیکی باید دستکاری هایی در شرایط واکنش(دما، کاتالیزور، حلال) انجام دهیم تا سرعت واکنش در حد مطلوب شود.

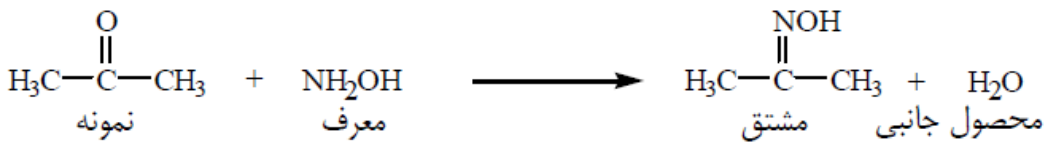
☒ مشتق سازی (Derivative formation)

بعضی اوقات خود ترکیب دارویی را می توانیم به روش مستقیم اندازه گیری کنیم ولی بعضی وقت ها خود دارو مستقیما قابل اندازه گیری نیست در نتیجه از آن ترکیب یک مشتق می سازیم یعنی یک واکنش شیمیایی روی ترکیب انجام می دهیم و یک ترکیب جدید می سازیم که این ترکیب جدید را اندازه گیری می کنیم .

- فرضا ترکیب فنول (C6H5OH)را نمی توانیم تعیین مقدار کنیم. فنول را با یک معرف (مثلا استیک انیدرید) واکنش می دهیم تا یک مشتق استری را ایجاد کنیم و محصول جانبی هم ممکن است ایجاد شود. وقتی ما مشتق استری ایجاد شده را اندازه گیری کردیم با محاسبات استوکیومتری هر تعداد مول ترکیب استری معادل با میزان فنول اولیه است.

$$C_6H_5OH + (CH_3CO)_2O \longrightarrow CH_3\text{-}COOC_6H_5 + CH_3COOH$$

- یا مثلا استون را با هیدروکسیل آمین واکنش می دهیم و اندازه گیری مشتق ایجاد شده مبین مقدار استون اولیه است



☑ مشتق سازی در تجزیه دستگاهی

مشتق سازی خیلی کاربرد دارد به خصوص در تجزیه دستگاهی. گاهی اوقات ترکیباتی می سازیم که میزان جذب مناسبی برای اندازه گیری (مثلا به روش UV) ندارند یا در GC قابل اندازه گیری نیستند؛ به همین دلیل مشتقاتی از ترکیبات می سازیم تا بتوانیم این مشتقات را به روش تجزیه دستگاهی اندازه گیری کنیم و سپس به ماده اولیه موجود پی ببریم.

☑ مشتق سازی در اسپکتروفتومتری:

مثلا آنالیزهای رنگی در اسپکتروفتومتری استفاده می شوند مثلا به آلکالوئید ها بعد از جداسازی معرف می زنیم تا یک رنگ خاص ایجاد کند؛ یعنی ترکیب بدون رنگ را با واکنش با یک معرف به یک ترکیب رنگی تبدیل می کنیم (در حقیقت طول موج جذب ترکیب را افزایش می دهیم تا ترکیب در ناحیه مرئی جذب داشته باشد و رنگی شود).

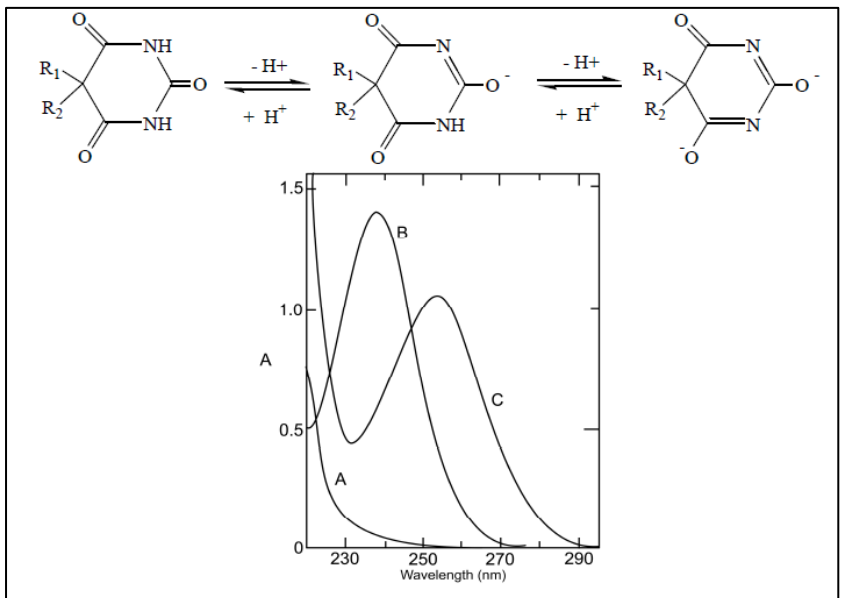
به این واکنش ها رنگ زا (Chromogenic) می گویند.

بعضی اوقات هم اصلا لازم نیست حتما ترکیب را رنگی کنیم؛ مثلا با متد UV در دستگاه HPLC، اگر ترکیب در ناحیه پایین طیف (مثلا 220نانومتر) جذب داشته باشد با خیلی از مواد دیگر از جمله حلال و سایر ترکیبات بیولوژیک تداخل دارد (چون این ترکیبات نیز در 220 نانومتر جذب دارند). با مشتق سازی از این ترکیبات می توانیم ترکیباتی ایجاد کنیم که λ_{max} بزرگتری دارند و در طول موج های بالاتری جذب داشته باشند پس تغییر رنگی نمی بینیم ولی با افزایش طول موج جذب می توانیم ترکیب را راحت تر و با تداخل کمتر با سایر ترکیبات اندازه گیری کنیم.

واکنش مشتق سازی می تواند به سادگی یونیزاسیون اسید–باز باشد که موجب تغییر در طیف UV می‌شود ؛ یعنی با تغییرPH ترکیب، طول موج جذب تغییر می کند(افزایش یا کاهش).

✓ طول موج جذبی ترکیبات در ناحیه UV، به تعداد پیوندهای پای(دوگانه) کنژوگه وابسته است.

- باربیتورات(باربیتوریک اسید)در محیط‌اسیدی سه پیوند دوگانه دارد ولی این ها یک در میان(کنژوگه) قرار نگرفته اند در نتیجه جذب خوبی ندارد. طیف UV آن در ناحیه پایین طیف جذب دارد ولی خیلی از حلال ها نیز در این ناحیه جذب دارند پس نمی توان برای اندازه گیری این ترکیب از آنالیز UV استفاده کرد (طیف جذبی A)



شکل 2-1. طیف جذبی باربیتال (1) A= 0.1 N H_2SO_4, B = buffer pH=9.9, C= 1 N NaOH

- حال اگر یک سیستم بافری با PH قلیایی(10) ایجاد کنیم. هیدروژن متصل به یکی از نیتروژن ها کنده می شود وقتی هیدروژن متصل به نیتروژن کنده شد یک زوج الکترون آزاد روی نیتروژن قرار می گیرد که این زوج الکترون می تواند روی باند N-C قرار گیرد و باند دوگانه ایجاد کند(ترکیب وسط). در ترکیب حاصله دو باند دوگانه به صورت کنژوگه قرار می گیرند و اگر از آن طیف UV بگیریم در طول موج بالاتر(حدود 240 نانومتر)، جذب پیدا می کند.(طیف جذبی B)

- اگر محیط را باز هم قلیایی تر کنیم (استفاده از NaOH با غلظت یک نرمال) هیدروژن متصل به دومین نیتروژن نیز کنده می شود، زوج الکترون ایجاد می شود و یک باند دوگانه ایجاد می کند و ترکیب حاصله سه پیوند دوگانه کنژوگه دارد(ترکیب سوم) که مجموعه پیوند های دوگانه کنژوگه و O^- باعث می شوند طول موج جذبی ترکیب زیاد (حدود 260 نانومتر) شود.(طیف جذبی C)

➢ پس با یونیزه‌تر کردن ترکیب λ_{max} را افزایش دادیم و هر چه طول موج جذب بیشتر شود اندازه‌گیری راحت‌تر و تداخل کمتر می‌شود.

یک واکنش شیمیایی می تواند دو پارامتر مهم E_{max} و λ_{max} را تحت تاثیر قرار دهدکه بدین ترتیب انتخابی بودن (Selectivity) و حساسیت (Sensitivity) آنالیز ممکن است تحت تاثیر قرار گیرد.

- وقتی λ_{max} را افزایش می دهیم؛ انتخابی تر قابل اندازه گیری است چون احتمال تداخل با سایر اجزا نمونه (مثل حلال یا ترکیبات موجود در پلاسما در نمونه های بیولوژیکی) کمتر می شود.
- وقتی E_{max} افزایش می یابد یعنی قله پیک جذب افزایش یافته است و حساسیت متد بیشتر می شود و مقادیر کمتری را به راحتی می‌توان اندازه گیری کرد.

از مشتق سازی در اسپکتروفتومتری به وفور استفاده می شود:

جدول 2-1. مشتق سازی در اسپکتروفتومتری (1)

Sample	Reagent	Comment
Alcohols	3,5-Dinitro benzoyl cholride	Acylation
Phenols	Fe (III)	Blue violet or red color
Phenols	Diazotized sulfanilic acids	Coupling reaction
Carbonyls	2,4-Dinitrophenyl hydrazine	-
Aldehydes	2,3-Dimethyl-bis-hydroxyl-aminobutirate; peridate	Free radical formation
Formaldehyde	Chromotropic acid	Specific for H_2CO
Primary and secondary amines	1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene	Arylation of amine
Tertiary amines	Tertacyanoethylene	Charge transfer complex
Amino acids	Ninhydrine	Blue-violet color
Primary aromatic amines	Nitrous acid then Barton Marshall reagent	Diazotization and coupling
Esters	Hydroxylamine then Fe (III)	Hydroxamic acid formation
Barbiturates	Cobalt salt and an amine	Parri or Zwikker test

- اگر نمونه الکل را با 3و5 دی نیترو بنزوئیل کلراید واکنش دهیم یک واکنش آسیلیشن صورت می گیرد که سبب می شود ترکیب در اسپکتروفتومتری جذب بهتری بدهد.
- از واکنش فنول ها با Fe(III) ترکیبات رنگی(قرمز یا آبی بنفش) ایجاد می شود.
- در صورت دی آزوتایز کردن فنول ها با سولفانیلیک اسیدها واکنش Coupling رخ می شود و سبب افزایش سیستم کونژوگه می‌شود.
- اگر ترکیبات کربونیل دار را با 2و4 دی نیتروفنیل هیدرازین واکنش دهیم ترکیبات رنگی ایجاد می شود.
- آلدهیدها هم می توانند با برخی ترکیبات شیمیایی وارد واکنش شوند.
- در هنگام مشتق سازی و آنالیز اگر بتوانیم متد های شیمیایی اختصاصی برای یک ترکیب خاص پیدا کنیم؛ به خوبی می توان ترکیب مد نظر را در حضور سایر ترکیبات بدون دخالت آن‌ها و بدون نیاز به استخراج آن‌ها اندازه‌گیری کنیم. مثلا در واکنش فرمالدهید با کروموتروپیک اسید (یک نفتالن سولفونیک اسید است)؛ فقط فرمالدهید را اندازه‌گیری می‌کنیم و اگر سایر آلدهید ها باشند تحت تاثیر قرار نمی گیرند.
- آمین های نوع اول و دوم با 1 فلوئورو-2و4 دی نیتروبنزن واکنش داده و مشتق ایجاد می کند.
- آمینواسید ها با نین هیدرین واکنش می دهند و ترکیبات رنگی آبی-بنفش ایجاد می کنند.

- آمین های آروماتیک نوع اول با نیتروس اسید و سپس با معرف بارتُن مارشال می توانند واکنش دهند.

نیتروس اسید با آمین های آروماتیک نوع اول واکنش داده و نمک دی آزونیوم ایجاد می کنند. نمک های دی آزونیم بسیار واکنش پذیر و فعال هستند که می توانند با معرف های مختلف (برای مثال بارتُن مارشال) واکنش دهند و سیستم هایی ایجاد کنند که جذب بالایی از خود نشان می دهند.

- استرها با هیدروکسیل آمین، هیدروکسیلامیک اسید ایجاد می کنند و در نهایت با Fe(III) ترکیبات رنگی به وجود می آورند.
- باربیتورات ها با کبالت مشتق سازی می کنند.

☑ مشتق سازی در فلوریمتری

از روش های بسیار پرکاربرد است که حدود هزار بار حساسیت بالاتری از کلریمتری (رنگ سنجی) دارد. اغلب ترکیبات شیمیایی و دارویی ممکن است در ناحیه UV جذب داشته باشند ولی تعداد کمتری ترکیبات به طور طبیعی فلورسانس دارند در نتیجه مشتق سازی در روش فلوریمتری بسیار پر کاربردتر است تا بتوانیم در ترکیب فلورسانس ایجاد کنیم.

مثلا؛

- فنول ها با اتیل استواستات در محیط اسید سولفوریک
- آروماتیک آمین های نوع اول با 9 کلروآکریدین
- آلیفاتیک آمین های نوع اول با فلورسکامین
- آمین های نوع اول با اورتوفتال دی آلدئید

واکنش می دهند تا فلورسانس ایجاد کنند. (و سایر موارد ذکرشده در جدول مقابل)

جدول 2-2. تعدادی از واکنش‌های فلوروژنیک (1)

Sample	Reagent
Phenols	Ethyl acetoacetate, H_2SO_4
Primary aromatic amines	9-Chloroacrydine
Primary aliphatic amines	Fluorescamine
Primary amines	o-Phthaldialdehyde
Guanidines	Ninhydrine
Phenothiazines	$KmnO_4$
Carboxylic acids	4-Bromamethyl-7-methoxy coumarine
Indole derivatives	H_2O_2, HCHO in acid

☑ مشتق سازی در گازکروماتوگرافی(GC)

در متد گازکروماتوگرافی، ترکیب باید بتواند به صورت فاز بخار در بیاید.

دو دلیل عمده جهت تغییر ساختمان شیمیایی ترکیبات و مشتق سازی قبل از آنالیز با گازکروماتوگرافی وجود دارد:

1) افزایش فراریت ترکیبات؛ خیلی از ترکیبات در دمایی که GC انجام می دهیم فرار نیستند در نتیجه قابل اندازه‌گیری نیستند و باید مشتقی از آن ایجا کنیم که فراریت بالایی داشته باشد.

2) افزایش قدرت ردیابی(detectability) ترکیبات در GC

البته جهت موارد دیگری مثل پایداری گرمایی بهتر و شکل قرینه تر پیک ها نیز این عمل انجام می شود.

اگر به ساختار شیمیایی ترکیبات توجه کنیم بسیاری از ترکیبات دارویی فراریت کافی ندارند که بتوان آن ها را با گاز کروماتوگرافی آنالیز کرد. فراریت ترکیب به میزان باند های هیدروژنی که در ترکیب می تواند ایجاد شود بستگی دارد هر چه میزان این باند های هیدروژنی بیشتر باشد نقطه ذوب و نقطه جوش ترکیب بالاتر می رود. وجود هیدروژن های فعال در گروه های COOH- و SH- ، OH-، NH- موجب ایجاد باند هیدروژنی بین مولکولی و کاهش فراریت می شود.

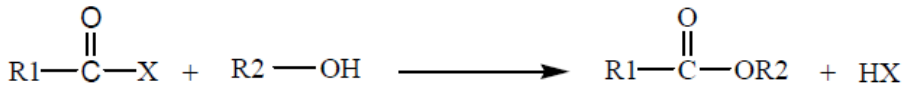
برای این که بتوانیم این ترکیبات را به روش GC اندازه گیری کنیم باید این گروه های هیدروژنی فعال را به طریقی حذف کنیم یعنی مشتقاتی بسازیم که حاوی این هیدروژن های فعال نباشند. با انجام این عملیات ترکیبات با فراریت مناسب به دست می آیند که به روش GC قابل اندازه‌گیری هستند.

روش های مختلفی برای مشتق سازی در GC استفاده می شوند، تعدادی از واکنش هایی که در این خصوص بکار می روند به شرح زیر می‌باشند:

1) آسیلاسیون

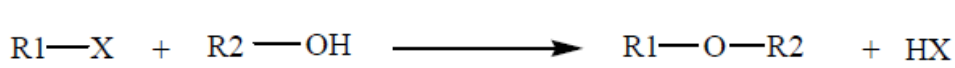
به دلیل حضور گروه OH در ترکیبات الکلی، این ترکیبات نقطه جوش بالای دارند. یک روش مشتق سازی این ترکیبات استفاده از مشتقات آسیل هالاید یا آسیل انهیدراید است.

H با X واکنش می دهد و HX خارج می شود. و در نهایت الکل به استر تبدیل می شود. این تبدیل باعث می شود هیدروژن فعال در مشتق ساخته شده وجود نداشته باشد پس نقطه جوش این ترکیب پائین تر است و می توانیم آن را با GC اندازه‌گیری کنیم.



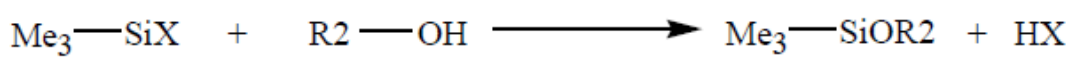
2) آلکیلاسیون

اگر همان ترکیب الکلی را با آلکیل هالاید واکنش دهیم، H با X واکنش می دهد و HX خارج می شود. در نهایت الکل به اتر تبدیل می شود. اتر به دلیل نداشتن هیدروژن فعال الکل، نقطه جوش پائین تری دارد و قابل استفاده در GC است.



3) سیلیلاسیون (Silylation)

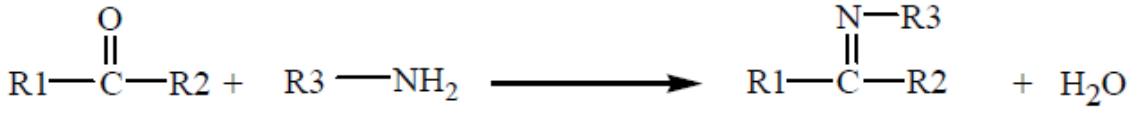
روشی پرکاربرد و گاهی اوقات اختصاصی است. این واکنش یک گونه ای از آلکیلاسیون است که در آن گروهی که جایگزین هیدروژن می‌شود. یک گروه تری آلکیل سیلیل، معمولا تری متیل سیلیل (TMS)، می باشد.



در این متد معرف های سیلیله خاصی داریم که برای الکل های خاصی استفاده می شوند و گفتیم هرچه متد ها اختصاصی تر باشد بهتر می توان یک ترکیب را در حضور ترکیبات مشابه آن اندازه‌گیری کنیم.

4) کندانساسیون- تراکم (Condensation)

واکنش بین دو مولکول که موجب از دست رفتن آب شود به تراکم معروف است. مثلاً یک آمین به دلیل داشتن و باند های هیدروژنی نقطه جوش نسبتا بالایی دارد. از واکنش یک کتون با یک آمین هر دو هیدروژن ترکیب آمین و اکسیژن کربونیل تشکیل آب می دهند و شیفت بیس داریم. ترکیب نهایی فراریت بیشتری نسبت به ترکیب اولیه دارد.



جایگزینی یک هیدروژن فعال، فراریت و قابلیت ردیابی(Detectability) ترکیب را افزایش می دهد. این پدیده بخصوص برای دتکتور جمع کننده الکترون (ECD[1]) که بخصوص به هالوژن ها خیلی حساس است کاربرد داشته و نشان داده شده است.

جواب دهی نسبی ECD به هالوژن ها به ترتیب مقابل می باشد: ید (9×10^4) ، برم (3×10^2) ، کلر $(1) \ll$ فلوئور

اگر صرفا بر اساس جواب دهی بخواهیم تصمیم بگیریم؛ ید را انتخاب می کنیم ولی باید توجه داشت که فراریت ترکیب هم از اهمیت برخوردار است.

اگر به جای هیدروژن؛ ید، برم یا کلر قرار دهیم فراریت کاهش می یابد و برای جایگزینی مجاز به استفاده از آن ها نیستیم. تنها می توان از فلوئور استفاده کرد. فلوئور جواب دهی ترکیب را کاهش می دهد ولی از آن طرف فراریت خوبی به ترکیب می دهد. برای بهبود جواب دهی به دتکتور می توان تعداد زیادی اتم فلوئور روی ترکیب قرار داد. بنابراین مشتقات حاوی چندین استخلاف فلوئور به مقدار وسیعی به دلیل افزایش فراریت و همچنین بدلیل افزایش جواب دهی به دتکتور ECD درGC به کار می روند. گروه های هیدروکسی و آمین را با گروه های پرفلورو آسیل مثل تری فلورواستیل(CF_3CO)، پنتا فلوروپروپیونیل و هپتافلوروبوتیریل آسیله می نمایند.

☑ کروماتوگرافی مایع و مشتق سازی

مشتق سازی در کروماتوگرافی ممکن است جهت بهتر شدن جداسازی و افزایش ردیابی انجام شود. این پدیده معمولا در کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک به کار می رود. واکنش هایی که معمولا استفاده می شوند اغلب مشابه تست های رنگی نقطه ای و آنالیز رنگ سنجی یا کالری متری می باشند. معمولا معرف ها با اسپری کردن روی کروماتوگرام به کار می روند و پس از آن نقاط رنگی ظاهر می شوند و بیانگر ترکیب مد نظر است. مشتق سازی برای شناسایی ویا اندازه‌گیری استفاده می شود.

تست های نقطه ای می توانند در کلینیک مورد استفاده قرار گرفته و در حیات بیمار مانند بخش های مسمومیت کاربرد داشته باشند. بخشی از بزاق یا ترشحات بیمار در یک لوله آزمایش یا بر روی صفحهTLC با معرف های خاص ماده ای که حدس می زنیم سبب مسمومیت شده، تست های لحظه ای مشتق سازی انجام می شود. معرفی که بیانگر یک تغییر رنگ انتظار داریم، اگر این تغییر رنگ ایجاد شد مسمومیت با ماده خاص تایید می شود.

مشتق سازی در روش های HPLC بسیار پر کاربرد است. زمانی که از دتکتور UV یا فلورسانس برای اندازه گیری یک ترکیب استفاده کنیم می توانیم میزان جذب ترکیب را با مشتق سازی افزایش دهیم و مقادیر بسیار کم در حد نانوگرم و پیکوگرم و حتی کمتر را به دلیل حساسیت متد اندازه گیری کنیم.

[1] Electron Capture Detector