

کاربردهای مدل مخلوط کروماتوگرافی در صنعت داروسازی و بیوفارماسی

دکتر سعیده اللهیاری^۱، دکتر فرناز منجمزاده^۲

^۱ گروه داروسازی صنعتی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۲ گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

انتخاب‌پذیری دقیق و بازداری کامل و هم‌زمان چندین ترکیب با قطبیت‌های متفاوت به‌خصوص مولکول‌های باردار و قطبی، به سرعت در صنعت داروسازی و بیوفارماسی رایج شده است.

تفاوت MMC با Single Mode Chromatography (SMC) در این است که در مورد SMC ممکن است یک سری واکنش‌های هیدروفیلی در ستون هیدروفوبی دیده شود اما این واکنش‌های ثانویه ضعیف بوده و تعدادشان کمتر است و سبب بازداری حل‌شوندن نمی‌گردد ولی MMC به‌گونه‌ای است که واکنش‌های ثانویه نیز قوی بوده و سبب بازداری و جداسازی در ستون می‌شوند.

▣ مزایای MMC

- ❖ انتخاب‌پذیری بالا: در یک بار لود کردن دارو می‌توان مواد با بارهای مثبت، منفی و خنثی را از یکدیگر جداسازی کرد.
- ❖ گنجایش ستون جهت لود کردن مواد نسبت به SMC بیشتر است: مثلاً ظرفیت ستون MMC

■ خلاصه

Mixed Mode Chromatography یک نوع کروماتوگرافی با ستون واحد است که می‌تواند از چند طریق با مواد پراکنده شده در فاز متحرک وارد واکنش شود. این تکنیک به‌علت دقت، انتخاب‌پذیری و سرعت بالا و هم‌چنین اندازه تزریق بالا، به سرعت پیشرفته است که در جایگزین استفاده از چند ستون متفاوت در یک فرآیند کاری کروماتوگرافی شود و بدین ترتیب در زمان و هزینه صرفه‌جویی خواهد شد. در این مقاله سعی کردیم تا ویژگی‌های این نوع کروماتوگرافی، مکانیسم‌های جداسازی مواد و هم‌چنین کاربردهای آن در صنعت را بیان کنیم.

■ مقدمه

Mixed Mode Chromatography (MMC) نوعی کروماتوگرافی است که در آن حل‌شونده با فاز ساکن از طریق بیش از یک واکنش وارد عمل می‌شود. MMC یا Multimode Chromatography

عنوان و یا خلاصه داده شده است، رو به افزایش بوده و این نشان دهنده جلب نظر محققان نسبت به این روش است (شکل ۱).

■ مکانیسم جداسازی روش MMC

حداقل دو نوع واکنش بین فاز حل شونده و فاز ساکن درگیر است که این واکنش‌ها می‌توانند به صورت همزمان و یا به صورت جداگانه باشند. هر گروه [مثلاً قطبی، غیرقطبی، آب‌دوست (هیدروفیل)، آب‌گریز (هیدروفوب) و یا گروه‌های اسیدی و بازی] روى فاز ساکن می‌توانند اختیال انجام واکنش‌های متنوعی را با حل شونده فراهم سازد.

□ طبقه‌بندی MMC براساس ستون جداسازی (فاز ساکن)

همان‌گونه که در شکل (۲) مشاهده می‌کنید ستون‌های MMC را براساس تعداد واکنش‌هایی

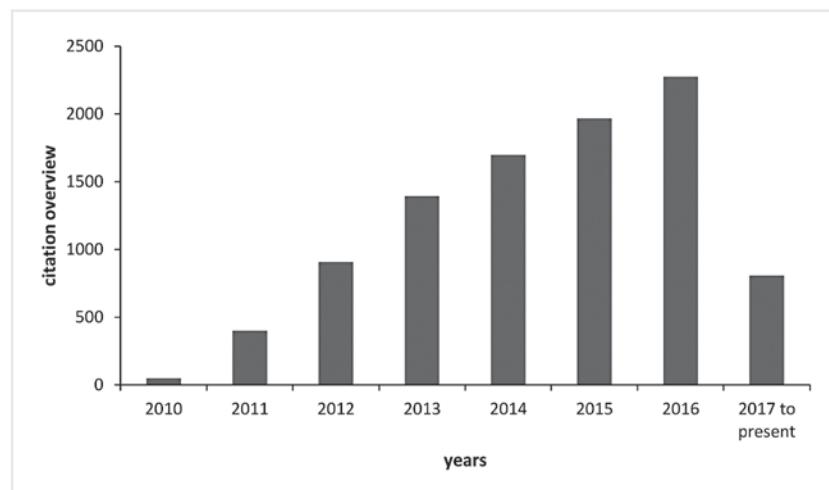
در آن واکنش‌های کاتیونی، آئیونی و هیدروفیلی درگیر است، لود دارو حدود ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از کروماتوگرافی مایع با ستون فاز معکوس است.

❖ از به هدر رفتن و استفاده مکرر ماده در دسترس جلوگیری می‌کند و صرفه اقتصادی دارد.

□ معایب MMC

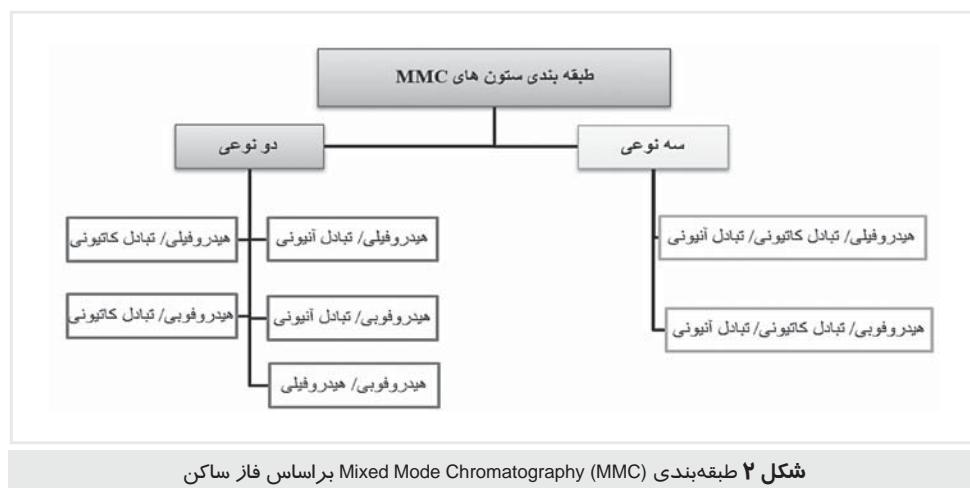
❖ در صورتی که ماده ناخالصی داشته باشد و هدف ما جداکردن آن ناخالصی نباشد، ممکن در روند جداسازی اختلال ایجاد کند.

❖ قیمت این نوع ستون‌ها در مقایسه با ستون‌های SMC، حداقل دو برابر بیشتر است. براساس مطالعه‌هایی که بر پایه جستجوی نام MMC در سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۷ میلادی در منابع اینترنتی انجام گرفت، می‌توان نشان داد که تعداد ارجاع‌هایی که به مقالات با نام Mixed Mode Chromatography



شکل ۱ مقایسه روند تعداد ارجاعات به مقالات با نام Mixed Chromatography Mode در عنوان یا خلاصه مقاله براساس داده‌های سایت scopus از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۷ میلادی

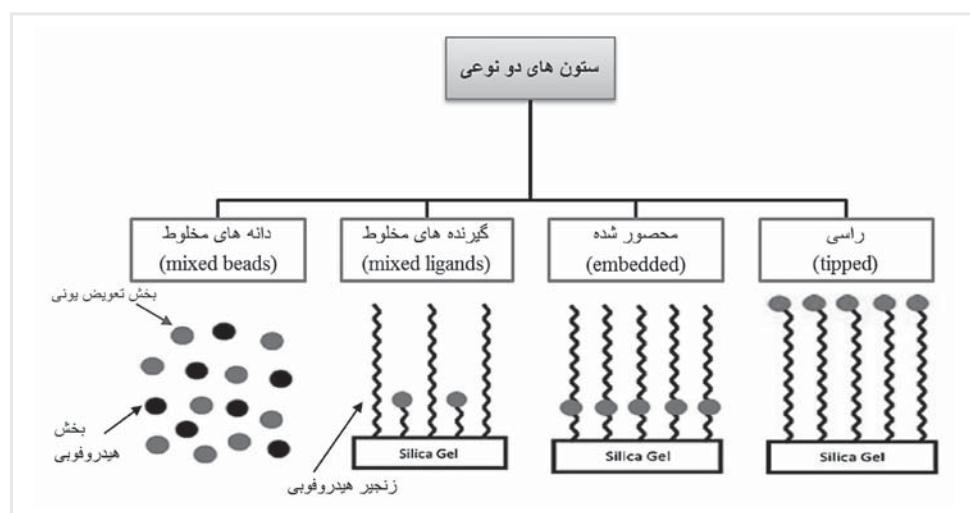
کاربردهای مدل مخلوط کروماتوگرافی در صنعت داروسازی و بیوفارماسی



شکل ۲ طبقه‌بندی Mixed Mode Chromatography (MMC) براساس فاز ساکن

دسته دیگر طبقه‌بندی می‌کنند. هر یک از ستون‌های دو نوعی و سه نوعی را همچنین می‌توان براساس نحوه قرارگیری گروه‌های شرکت‌کننده در واکنش، طبقه‌بندی

که در فاز ساکن قابل انجام هست، می‌توان به دو دسته اصلی Bimodal (دو نوعی) و Trimodal (سه نوعی) تقسیم‌بندی کرد و هر یک از آن‌ها را نیز براساس نوع و نحوه واکنش با حل‌شونده به چند



شکل ۳ تقسیم‌بندی ستون‌های دونوعی براساس شیمی ساختاری گروه‌های درگیر در واکنش

یونی آنیونی یا کاتیونی و سرکوب‌کننده یون دارد اما زمانی که از MMC استفاده می‌کنیم، دیگر نیازی به استفاده از روش‌های جداگانه برای آنالیز کاتیون‌ها و آنیون‌ها نخواهد بود. در شکل (۵) یک سری از محققان با استفاده از MMC و با ستون سری از Acclaim Trinity P1 (ستونی است براساس سیلیکا که دارای بخش‌های تعویض آنیونی و کاتیونی و بخش هیدروفوب می‌باشد) توانستند ۲۵ کاتیون را در داروسازی را در عرض ۲۰ دقیقه جadasازی کنند (شکل (۵)).

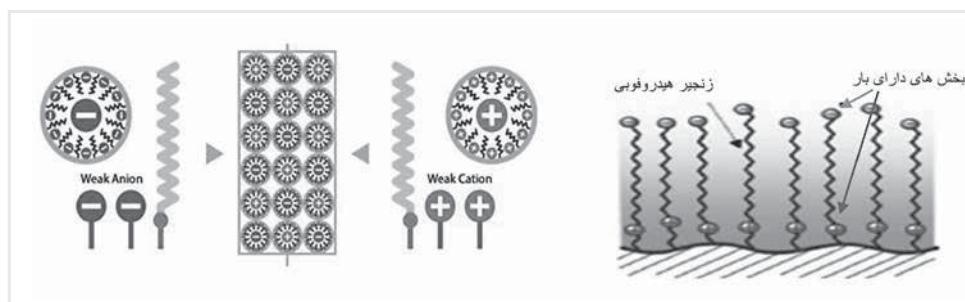
□ اجزای فعال دارویی و ترکیب‌های مرتبط با آن‌ها امروزه ستون فاز معمکوس بیشترین کاربرد را در آنالیز اجزای فعال دارویی بر عهده دارد اما نمی‌توان توسط آن مولکول‌های قطبی و باردار را جadasازی و تعیین مقدار کرد. بیس‌فسفونات یکی از گروه‌های دارویی است که از تخریب استخوان جلوگیری می‌کند. این مولکول‌ها قطبی و یونی بوده و بیشتر آن‌ها فاقد کروموفور UV می‌باشند. اتیدرونونیت یکی از داروهای آن گروه می‌باشد که ناخالصی‌های آن (به شکل فسفات و فسفیت) یک کروموفور UV ندارند و بسیار یونی می‌باشند و نمی‌توان با HPLC

کرد (شکل (۳)). ستون‌های سه تایی نیز براساس شیمی ساختاری و نحوه قرارگیری گروه‌های درگیر در واکنش به چند دسته‌ه می‌توان تقسیم‌بندی کرد ولی اسامی خاصی برای آن‌ها در نظر گرفته نشده است. به همین جهت فقط شکل دو نمونه از این نوع ستون‌ها جهت آشنایی در اینجا آورده شده است (شکل (۴)).

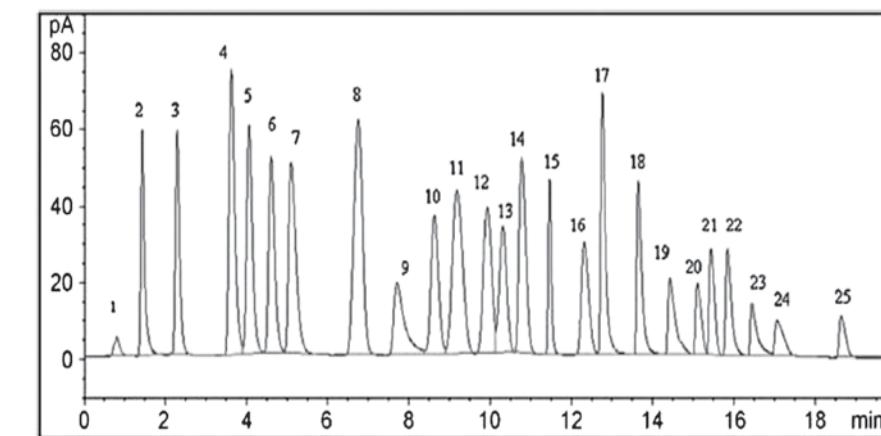
■ کاربردهای Mixed Mode Chromatography (MMC) در صنعت داروسازی و بیوفارماسی

□ جadasازی یون‌های همراه تقریباً نیمی از داروهایی که به تأیید FDA رسیده‌اند، به شکل نمکی هستند. زیرا شکل نمکی سبب بهبود ویژگی‌های فارماکودینامیکی و فارماکوکنیتیکی از جمله افزایش محلولیت و پایداری دارو خواهد شد. آنالیز یون همراه یکی از کارهای کلیدی در تحقیقات فارماسیوتیکی و کنترل کیفیت می‌باشد.

اگر بخواهیم با HPLC آن را آنالیز کنیم، نیاز به یک سیستم یون کروماتوگرافی خواهیم داشت که نیاز به یک موبایل فاز خاص، ستون تعویض



شکل ۴ ستون‌های سه‌نوعی براساس شیمی ساختاری گروه‌های درگیر در واکنش



1 = lactate , 2 = procaine , 3 = choline , 4 = tromethamine , 5 = sodium , 6 = potassium , 7 = meglumine
 8 = mesylate , 9 = gluconate , 10 = maleate , 11 = nitrate , 12 = chloride , 13 = bromide , 14 = besylate
 15 = succinate , 16 = tosylate , 17 = phosphate , 18 = malate , 19 = zinc , 20 = magnesium , 21 = fumarate
 22 = tartrate , 23 = citrate , 24 = calcium , 25 = sulfate
 Adapted from REF (1).

شکل ۵ جداسازی ۲۵ یون رایج داروسازی با استفاده از MMC

□ جداسازی اکسپیبان‌های موجود در فرمولاسیون

بیشتر اکسپیبان‌ها یا باردار هستند و یا بسیار محلول در آب، به همین جهت با استفاده از ستون فاز معکوس قابل جداسازی نخواهند بود و با حجم مرده شسته می‌شوند. سورفکتانت‌های غیریونی مثل پلی‌سوربات ۲۰ یا ۸۰ در فرمولاسیون‌های دارویی پروتئینی به عنوان حامل جهت افزایش محلولیت و پایداری دارو استفاده می‌شوند. جداسازی آن‌ها به علت همراهی قوی با غلظت بالایی از پروتئین‌ها و طبیعت هتروژنیسیته آن‌ها، سخت می‌باشد. در مطالعه‌ای پلی‌سوربات ۲۰ را توسط ستون تجویض آئیونی همراه با بخش‌های غیرقطبی، جداسازی

معمولی آن را جداسازی کرد، پس می‌توان از MMC که دقیق و صحی خوبی درباره خود دارو و ناخالصی‌هایش دارد، استفاده کرد.

□ ناخالصی‌ها

در تعیین ناخالصی‌ها مخصوصاً وقتی ناخالصی‌هایی با قطبیت‌های متفاوت وجود دارد نمی‌توان با استفاده از یک ستون آن‌ها را جداسازی کرد اما با استفاده از ستون MMC می‌توان این ناخالصی‌ها را در مدت زمان کم و یا استفاده از یک ستون استخراج کرد. مثلاً در مورد مطالعه‌های پایداری که ناخالصی‌های دارویی را در اثر شرایط استرسی ایجاد می‌کنیم می‌توانیم با کمک MMC شناسایی کنیم.

یک سری پاسخ‌های ایمونولوژیک را ایجاد کنند؛ به همین جهت حذف، جداسازی و کنترل میزان اگرگه‌ها مخصوصاً در مورد منوکلونال آنتی‌بادی‌ها از جمله کارهای اساسی در صنعت داروسازی خواهد بود. در این نوع ستون‌های چند نوعی (MMC) یک سری واکنش‌های الکترواستاتیک و هیدروفویک در اثر تغییر در pH ایجاد خواهد شد که سبب جداسازی این نوع درشت مولکول‌ها می‌شوند.

■ نتیجه‌گیری

Mixed Mode Chromatography انتخاب‌پذیری منحصر به‌فردی در جداسازی مولکول‌های باردار و غیرقطبی به‌طور همزمان دارد و نیز می‌تواند کاربردهای سیار وسیعی را در صنعت داروسازی داشته باشد.

■ نگاه به آینده

پیشبرد اهداف در جهت فراگیری وسیع‌تر روشن‌های جداسازی در ستون Mixed Mode Chromatography و نیز بهبود کارآیی آن در صنعت داروسازی و صنایع دیگر، از جمله کارهایی خواهد بود که توسعه خواهد یافت.

منابع

- Yang Y, Geng X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218(49): 8813-8825.
- Zhang K, Liu X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *J Pharmaceut Biomed Analys* 2016; 128: 73-88.
- McLaughlin LW. Mixed-mode chromatography of nucleic acids. *Chemi Revi*. 1989; 89(2): 309-319.

کردند. بدین ترتیب که پروتئین‌ها به‌علت دافعه الکترواستاتیک از طرف بخش تعویض آنیونی، به ستون تمایل نداشته و شسته می‌شدن و لی پلی‌سوربات ۲۰ به قسمت غیرقطبی ستون در MMC متصل می‌شد و بعد با تغییر حلال سبب جداسازی آن می‌گردید.

□ جداسازی دارو در نمونه‌های محیطی و بیولوژیکی

Solid Phase Extraction استفاده شود. از این روش در نمونه‌هایی که تنوع و مقدار مواد بسیار زیاد هست استفاده می‌کنیم تا یک مرحله قبل از کروماتوگرافی تمیزسازی انجام گیرد. مثلاً ۲۴ نوع دارو در فاضلاب شهری که توسط مردم شهر به شکل بیش از حد استفاده می‌شوند و یا جداسازی و تعیین ۶ نوع داروی ضدالتهاب غیراستروبویدی از فاضلاب‌های شهری (با استفاده از ستون حاوی قسمت تعویض آنیونی و قسمت غیرقطبی) و نیز تعیین مقدار یک دارو یا ماده دیگر مثل آنتاگونوست گیرنده آنتیوتانسین‌ها، می‌توانند از جمله کاربردهای این نوع روش جداسازی باشد.

□ پپتیدها و پروتئین‌ها

پپتیدها و پروتئین‌ها بسته به آمینواسیدهای به کار رفته، pH ایزوالکتریک متفاوتی خواهند داشت به همین جهت بسته به‌ویژگی‌های حل شونده و شرایط فاز متحرک ستون می‌توانند به شکل ترکیب‌های خنثی، آنیونی و یا کاتیونی باشند. اگرگه‌های پروتئینی نیز که طی ساخت و یا بسته‌بندی می‌توانند ایجاد شوند، سبب کاهش کارآیی محصول خواهند شد و نیز ممکن است