

# کاربردهای مدل مخلوط کروماتوگرافی در صنعت داروسازی و بیوفارماسی

دکتر سعیده اللهیاری<sup>۱</sup>، دکتر فرناز منجمزاده<sup>۲</sup>

۱ گروه داروسازی صنعتی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

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

## ■ 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 به علت دقت، انتخاب‌پذیری و سرعت بالا و همچنین داشتن اندازه تزریق بالا، به سرعت پیشرفت کرده و می‌تواند 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.

انتخاب‌پذیری دقیق و بازداری کامل و هم‌زمان چندین ترکیب با قطبیت‌های متفاوت به خصوص 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 حل‌شونده نمی‌گردند 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 که

## ■ 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 به علت

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 حل‌شونده 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] روی فاز ساکن می‌توانند احتمال انجام واکنش‌های متنوعی را با حل‌شونده فراهم سازد.

### □ طبقه‌بندی MMC براساس ستون جداسازی (فاز ساکن)

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

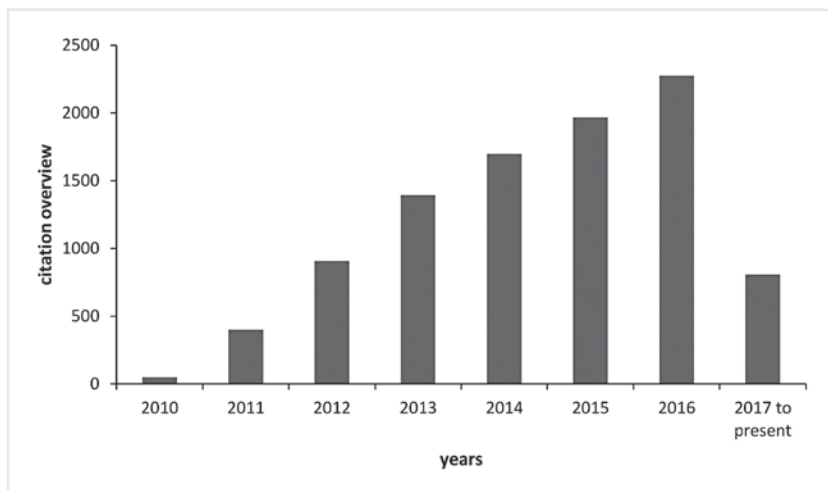
در آن واکنش‌های کاتیونی، آنیونی و هیدروفیلی درگیر است، لود دارو حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از کروماتوگرافی مایع با ستون فاز معکوس است. ✧ از به هدر رفتن و استفاده مکرر ماده در دسترس جلوگیری می‌کند و صرفه اقتصادی دارد.

### □ معایب MMC

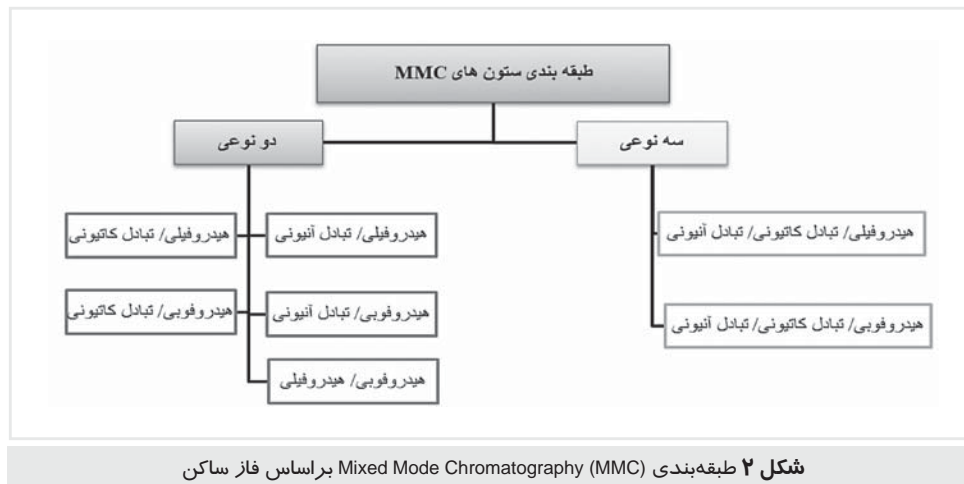
✧ در صورتی که ماده ناخالصی داشته باشد و هدف ما جداکردن آن ناخالصی نباشد، ممکن در روند جداسازی اختلال ایجاد کند.

✧ 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 در قسمت

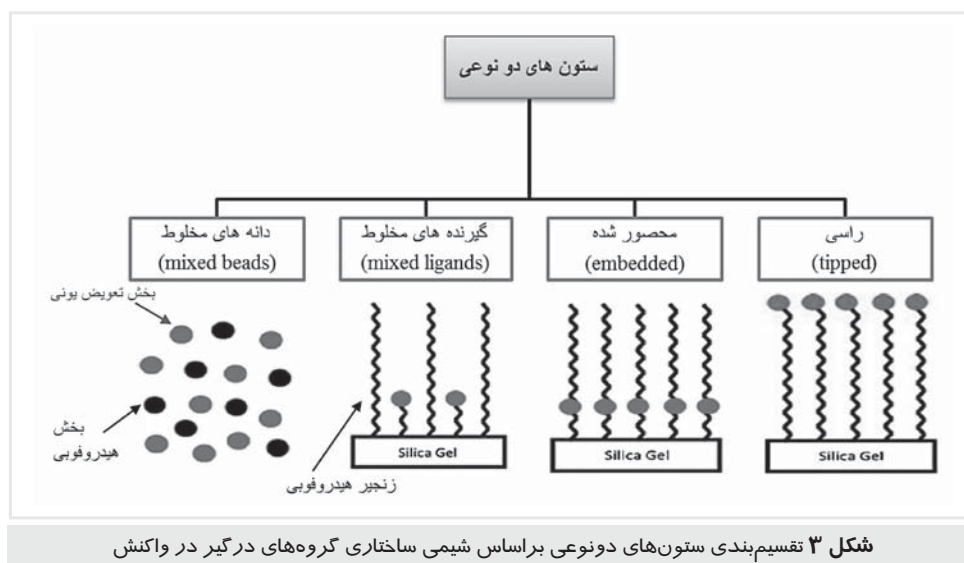


شکل ۱ مقایسه روند تعداد ارجاعات به مقالات با نام Mixed Chromatography Mode در عنوان یا خلاصه مقاله براساس داده‌های سایت scopus از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۷ میلادی



دسته دیگر طبقه بندی می کنند. هر یک از ستون های دو نوعی و سه نوعی را هم چنین می توان براساس نحوه قرارگیری گروه های شرکت کننده در واکنش، طبقه بندی

که در فاز ساکن قابل انجام هست، می توان به دو دسته اصلی Bimodal (دو نوعی) و Trimodal (سه نوعی) تقسیم بندی کرد و هر یک از آنها را نیز براساس نوع و نحوه واکنش با حل شونده به چند



یونی آنیونی یا کاتیونی و سرکوب کننده 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 Acclaim Trinity P1 (ستونی است براساس سیلیکا که دارای بخش‌های تعویض آنیونی و کاتیونی و بخش هیدروفوب می‌باشد) توانستند ۲۵ کاتیون رایج در داروسازی را در عرض ۲۰ دقیقه جداسازی کنند (شکل ۵).

□ اجزای فعال دارویی و ترکیب‌های مرتبط با آن‌ها امروزه ستون فاز معکوس بیشترین کاربرد را در آنالیز اجزای فعال دارویی بر عهده دارد اما نمی‌توان توسط آن مولکول‌های قطبی و باردار را جداسازی و تعیین مقدار کرد. بیس فسفونات یکی از گروه‌های دارویی است که از تخریب استخوان جلوگیری می‌کند. این مولکول‌ها قطبی و یونی بوده و بیشتر آن‌ها فاقد کروموفور UV می‌باشند. اتیدرونیت 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 دسته 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 این جا آورده شده است (شکل ۴).

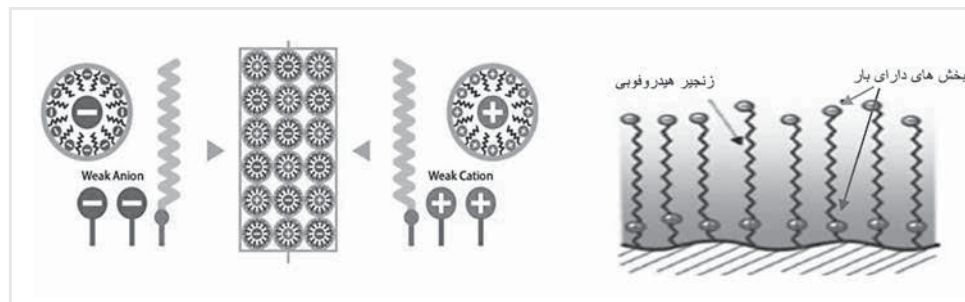
### ■ کاربردهای Mixed Mode Chromatography

#### (MMC) در صنعت داروسازی و بیوفارماسی

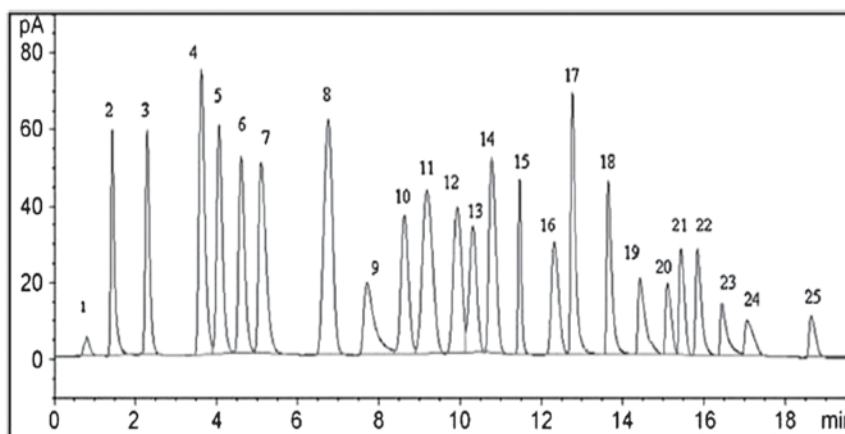
##### □ جداسازی یون‌های همراه

تقریباً نیمی از داروهایی که به تأیید FDA رسیده‌اند، به شکل نمکی هستند. زیرا شکل نمکی سبب بهبود ویژگی‌های فارماکودینامیکی و فارماکوکینتیکی 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 اکسیپیان‌های موجود در فرمولاسیون

بیشتر اکسیپیان‌ها 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 غیر یونی مثل پلی‌سوربات ۲۰ یا ۸۰ در فرمولاسیون‌های دارویی پروتئینی به‌عنوان حامل جهت افزایش محلولیت و پایداری دارو استفاده می‌شوند. جداسازی آن‌ها به‌علت همراهی قوی با غلظت بالایی از پروتئین‌ها و طبیعت هتروژنیسیته آن‌ها، سخت می‌باشد. در مطالعه‌ای پلی‌سوربات ۲۰ را توسط ستون تعویض آنیونی همراه با بخش‌های غیر قطبی، جداسازی

معمولی آن را جداسازی کرد، پس می‌توان از MMC که دقت و صحت 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 اگرگ‌ها 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 هیدروفوبیک در اثر تغییر در pH ایجاد خواهند شد که سبب جداسازی این نوع درشت مولکول‌ها می‌شوند.

### ■ نتیجه‌گیری

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

### ■ نگاه به آینده

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

### منابع

1. Yang Y. Geng X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218(49): 8813-8825.
2. Zhang K. Liu X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *J Pharmaceut Biomed Analys* 2016; 128: 73-88.
3. 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 می‌شدند ولی 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 هم می‌تواند به صورت Mixed Mode 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 یافتن 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 غیراستروئیدی از فاضلاب‌های شهری (با استفاده از ستون حاوی قسمت تعویض آنیونی و قسمت غیرقطبی) و نیز تعیین مقدار یک دارو یا ماده دیگر مثل آنتاگونیست گیرنده آنژیوتانسین II، می‌توانند از جمله کاربردهای این نوع روش جداسازی باشد.

### □ پپتیدها و پروتئین‌ها

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