



بررسی طریقه تولید رادیوداروی ویتامین B₁₂ با درجه خلوص پزشکی (قسمت اول)

حسین غفوریان^{*}، مریم مظاهری تهرانی، سیدعلی ایزدی‌دار، مریم شمس رفیعی، امین نظری
مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۱۱۳۶۵-۳۴۸۶، تهران - ایران

چکیده: ویتامین B₁₂ نشاندار شده با کبالت - ۵۸ یکی از ابزارگان (کیت‌های) تشخیص کم‌خونی در بیماران مبتلا به آن است. به عبارت دیگر، جذب ناکافی ویتامین B₁₂ یکی از علل کم‌خونی در انسان بوده و یکی از روش‌های دقیق برای سنجش مقدار جذب آن، کاربرد رادیوداروی ویتامین B₁₂ نشاندار شده با رادیوایزوتوپ کبالت - ۵۸ است. مهمترین مرحله تولید ویتامین B₁₂ نشاندار شده، جداسازی و خلوص‌سازی آن از محیط تخمیر باکتری *Streptomyces Olivaceus* (DSM: 41536) است. بنابراین در نخستین مرحله این تحقیق، بررسی جداسازی و تخلیص این ویتامین به وسیله رزین‌های مختلف بر روی نمونه‌های سیانو کوبالامین حاوی کبالت - ۵۹، تولید شده توسط این باکتری صورت گرفت. در بررسی‌ها و آزمایش‌های اولیه، دو رزین غیرقطبی XAD-4 و XAD-7 انتخاب شد. نتایج آزمایش‌های متعدد بر روی این دو رزین نشان دادند که بهترین بازدهی برای تثبیت کوبالامین به وسیله رزین XAD-4 بدست می‌آید. در مرحله بعد، تحقیقات برای جداسازی ویتامین در ستون XAD-4 با استفاده از حلال‌های متانول، اتانول و ایزوپروپانول در غلظت‌های مختلف انجام گرفت. نتایج حاصل از TLC (کروماتوگرافی لایه نازک) نشان داد که بهترین شوینده‌ها برای خارج کردن کوبالامین از ستون XAD-4، حلال‌های متانول، اتانول و ایزوپروپانول با حداکثر غلظت ویتامین B₁₂، در محدوده غلظت‌های ۲۵ تا ۵۰ درصد، ۳۰ تا ۴۰ درصد و ۱۰ درصد هستند. کوبالامین دفع شده در حضور استن در دمای پایین متبلور شد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین B₁₂، جداسازی، خلوص‌سازی، آمبرلیت، کبالت ۵۸، کم‌خونی

Investigation for Preparation and Production of Radio-Kit Vitamin B₁₂ with Med-grade (Part-1)

H. Ghafourian^{*}, M. Mazaheri Tehrani, S.A. Ezadyar, M. Shams Rafiee, A. Nazari
Nuclear Research Center, AEOL, P.O. Box: 11365-3486, Tehran - Iran

Abstract: Labelled vitamin B₁₂ with ⁵⁸Co is one of the important ingredients of the diagnostic Kits for diagnosis of patients affected by anemia. The insufficient absorption of vitamin B₁₂ is one of the causes of anemia in humans and one of the accurate methods for measurement of the absorbed vitamin B₁₂ is application of labelled vitamin B₁₂ with the cobalt-58 radioisotope. The isolation and purifications of the labelled vitamin B₁₂ from fermentation medium of *Streptomyces Olivaceus* is an essential process for kit preparation. The first experiment in this research was isolation and purification of B₁₂ using different resins with the solution of cyanocobalamin containing cobalt-59, produced by this bacterium. After investigation and pre-feasibility experiments two non-polar resins XAD-4 and XAD-7 were selected. The results that obtained from different experiments on XAD-4 and XAD-7 showed that XAD-4 is much better than the latter one due to immobilization of cobalamin. The isolation of vitamin B₁₂ on XAD-4 column was achieved by different solvents such as methanol, ethanol and isopropanol in different concentrations ratios. The results of TLC (Thin Layer Chromatography) showed that the best eluant solutions for desorption of cobalamin from XAD-4 column are solvents such as methanol, ethanol and isopropanol with the maximum concentration of vitamin B₁₂ in the concentration ranges of 25 up to 50 percent, 30 up to 40 per-cent and 10 per-cent, respectively. Cobalamin was collected in acetone and crystallized in low temperature.

Keywords: Vitamin B₁₂, isolation, purification, amberlite, cobalt 58, anemia

* e-mail: ghafourian@aeoi.org.ir

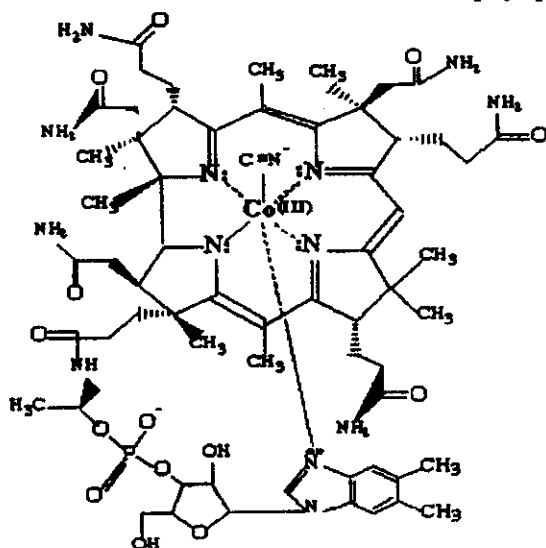
۱- مقدمه

(آنتی بیوتیکها)، ویتامینهای گروه B، حشره کشهای کلردار، ترکیبات متنوع آروماتیک نیتروژن دار و پروکسیدهای هیدروژن بکار می روند و معروفترین آنها XAD-2، XAD-4 و XAD-7 می باشند [۵ و ۶].

رزینهای XAD-2 و XAD-4 غیرقطبی هستند و کاربرد بیشتری در جداسازی ترکیبات آلی موجود در طبیعت دارند. XAD-7 یک رزین حد واسط قطبی است که فنلها را بخوبی جذب می کند. این نوع رزین قابلیت جذب مواد آبدوست را از ترکیبات آب دار و مواد آب گریز را از سیستمهای بدون آب دارد. مشخصات این رزینها در جدول ۱ مندرج است.

ساختار شیمیایی آمبرلیت

بررسی همه آمبرلیتها با توجه به تنوع ساختار آنها دشوار است. IR-P64 نوعی آمبرلیت است که برای جداسازی و خالص سازی ویتامین B₁₂ بکار می رود. بخش ماتریکسی آن شامل کوپلیمری از متاکریلیک اسید و دی وینیل بنزن است. ساختار شیمیایی آمبرلیت IR-P64 در شکل ۲ نشان داده شده است [۵ و ۶].



شکل ۱- ساختار ویتامین B₁₂

ویتامین B₁₂ یا سیانو کوبالامین^(۱) یک همتافته آلی- فلزی است که فلز کبالت به عنوان اتم مرکزی در آن جای گرفته است (شکل ۱). ویتامین B₁₂ که با رادیوایزوتوپهای کبالت نشاندار می شود کاربردهای بسیار مهمی به ویژه در زمینه تشخیص پزشکی دارد. یکی از کاربردهای بارز آن سنجش مقدار جذب ویتامین B₁₂ در روده کوچک است که به تشخیص بیماریهای کم خونی megaloblastic و سندرم جذب نابهنجار روده ای (intestinal malabsorption) کمک می کند [۱].

ویتامین B₁₂ را با یکی از ایزوتوپهای رادیوآکتیو کبالت Co-57، Co-58 و Co-59 می توان نشاندار کرد. مقدار دز تابشی رادیوایزوتوپ کبالت باید در حدی باشد که دز جذب شده توسط سایر اعضای بدن به حداقل برسد. کبالت - ۵۸ در میان رادیوایزوتوپهای کبالت، به دلیل دارا بودن دز مناسب، نیمه عمر کوتاه و قابلیت اندازه گیری با انواع شمارشگرها، برای مصارف پزشکی مناسبتر تشخیص داده شده است. جذب ویتامین B₁₂ نشاندار شده به صورت روشی دو مرحله ای قابل اجرا بوده و مقدار جذب ویتامین به روشهای مختلف از جمله روش دفع ادراری شیلینگ (Schilling) اندازه گیری می شود [۲ و ۳].

در این کار پژوهشی، از نمونه حاوی ویتامین B₁₂ غیر آکتیو، که منبع کبالت آن کلراید کبالت با شش مولکول آب بوده، طی فرایندهای جداسازی و خالص سازی، ویتامین B₁₂ به دست آمده است. از سال ۱۹۴۵ تاکنون روشهای زیادی برای جداسازی و خالص سازی همسانهای کوبالامین^(۲) بکار رفته است که ابتدائی ترین آنها آلومین، زغال فعال و سیلیکاژلها می باشند. اکنون یکی از متداولترین و مؤثرترین روش جداسازی همسانهای کوبالامین کاربرد رزینهای مبادله یونی است [۴].

آمبرلیت های^(۳) پلیمر (XAD) تعدادی از رزینهای غیرقطبی هستند که برای جدا کردن و خالص سازی پادزیها

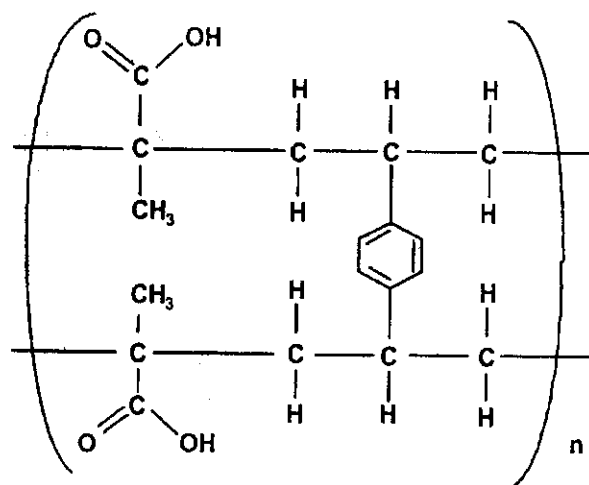
جدول ۱- مشخصات آمبرلیت های (XAD)

شماره کاتالوگ	پایه و درجه	نوع ماتریکس	اندازه	سطح تماس (mm ²)	قطر متوسط (A°)
۲۱۶۴۶-۱	XAD-2	پلی استیرن	۲۰-۶۰	۳۰۰	۹۰
۲۱۶۴۸-۸	XAD-4	پلی استیرن	۲۰-۶۰	۷۲۵	۴۰
۲۱۶۴۹-۶	XAD-7	اکریلیک استر	۲۰-۶۰	۴۵۰	۹۰



رزینهای IR-410 و IR-120 انجام گرفت. در این مرحله با استفاده از رزینهای مبادله کننده کاتیونی و آنیونی، آب مقطر دوبار تقطیر شده از دو ستون هر یک بطول ۵۰ cm و قطر ۰/۵ cm پُر شده از رزینهای IR-410 و IR-120 در دماهایی، در محدوده ۷۰-۲۵ °C، عبور داده شد. قابلیت هدایت آب یونزدایی شده در دماهای مختلف قبل از ورود به ستون کاتیونی IR-120 و بعد از خروج از ستون آنیونی IR-410 اندازه گیری و مقادیر آنها در جدول ۲ درج شده است.

با توجه به نتایج جدول ۲ برای یونزدایی، آب مقطر در دمای ۴۵ °C که پائین ترین هدایت الکتریکی را پس از خروج از ستون داشت انتخاب شد.



شکل ۲- ساختار شیمیایی آمبرلیت IR-P64

۲- مواد و دستگاهها

- مواد مورد استفاده برای اجرای طرح عبارتند از: آمبرلیت های IR-120، IR-410، XAD-4، XAD-7، اتیل الکل، متانول، آب مقطر دوبار تقطیر و یونزدایی شده، کاغذ TLC، استن، ایزوپروپانول، همه مواد با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد.

- دستگاههای بکار رفته: HPLC (Intertail OSD-2)، متر pH متر (744 Metrhom) لامپ UV 254 nm، بهمزن دوار (4002 Heidolph)، پمپ خلاء (Shimadzu).

۳- روش کار

۳-۱ تهیه محیط کشت تولید ویتامین B_{۱۲}

به منظور تولید ویتامین B_{۱۲} باکتری Streptomyces Olivaceus به شماره DSM: 41536 از بانک میکروبی آلمان به محیط کشت حاوی (گرم در لیتر): گلوکز ۱۰، کربنات کلسیم ۵، عصاره مالت ۱۰، عصاره مخمر ۴ و کلرور کبالت ۱۰ ppm تلقیح شد و به مدت ۴ روز در دمای ۳۰ °C و ۱۵۰ دور در دقیقه در بهمزن انکوباتور قرار گرفته و پس از آن عملیات خالص سازی ویتامین B_{۱۲} بر روی نمونه انجام گرفت. باکتری S. Olivaceus بر روی محیط کشت Oatmeal Agar در یخچال نگهداری شد.

۳-۲ تهیه آب یونزدایی شده

به منظور جدا کردن یونهای مزاحم موجود در آب مقطر و در نتیجه کاستن قابلیت هدایت آن، یونزدایی از آب مقطر به وسیله

۳-۳ تثبیت^(۴) کوبالامین بروی رزینهای آمبرلیت XAD-4 و آمبرلیت XAD-7

برای جداسازی زیست توده^(۵) از محیط تخمیر، ابتدا آن با کاغذ صافی و دستگاه سانتریفوژ تصفیه و برای بالابردن غلظت ویتامین B_{۱۲}، با دستگاه بهمزن در خلاء تقطیر شد. محلول تصفیه و تغلیظ شده بر روی XAD-4 و XAD-7 تثبیت گردید. برای این آزمایش ۱۰ میلی لیتر از محلول اولیه برداشته و درون بالن ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد، سپس تا ۷ برابر حجمش به آن رزین اضافه گردید و به مدت چند ساعت این مخلوط بهمزده شد، سپس محتویات بالن مجدداً به دستگاه تقطیر در خلاء انتقال یافت تا رزین کاملاً خشک شود. بدین ترتیب ستونی از رزین خشک شده حاوی ویتامین B_{۱۲} بطول ۵۰ cm و قطر ۰/۵ cm تهیه شد [۷].

جدول ۲- قابلیت هدایت الکتریکی آب مقطر در دماهای مختلف

دما (°C)	قابلیت هدایت الکتریکی قبل از ورود به ستون (µS)	قابلیت هدایت الکتریکی خروج از ستون (µS)
۲۵	۵۹/۳	۴۴/۴۲
۳۵	۵۶/۵	۴۱/۲
۴۰	۵۵/۲	۴۰/۱
۴۵	۵۳/۶	۳۸/۲
۵۰	۵۱/۹	۴۱/۱
۵۵	۵۰/۹	۴۰/۶
۶۰	۴۸/۸	۴۰/۸
۶۵	۴۷/۲	۴۱/۰
۷۰	۴۶/۶	۴۲/۱



۳-۴ عملیات دفع ویتامین B₁₂ تثبیت شده در ستون

برای جداسازی ویتامین B₁₂ از روی ستونهای رزین XAD-4 و XAD-7 و خالص سازی آن محلولهای زیر تهیه و با استفاده از TLC، عملیات دفع انجام گرفت.

۱- محلول متانول در غلظتهای ۵۰-۲۵ درصد حجمی

۲- محلول اتانول در غلظتهای ۴۰-۳۰ درصد حجمی

پس از شستشوی ستون با این حلالها، قسمتهای مختلف حاصل از شستشو به دستگاه تقطیر در خلاء منتقل شدند تا حلال جدا شود. جزء باقیمانده در یخچال قرار داده شد و پس از سرد شدن بلورهای سوزنی شکل کوبالامین در حضور استن بدست آمد. برای بدست آوردن نتایج مورد قبول، آزمایشها با روش HPLC تحت شرایط کروماتوگرافی با استفاده از ستون ODS2-intertail، فاز متحرک: A: pentane sulfonate Na+0.1%H₃PO₄ و B: pentane sulfonate Na+0.1%H₃PO₄ in 80%CH₃CN با سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه، در دمای ۴۰°C و لامپ UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر انجام شد.

۴- بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این جداسازیها از راه مقایسه کروماتوگرامهای حاصل از دستگاه HPLC مربوط به ویتامین B₁₂ استاندارد و نمونه مورد آزمایش در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

- نمودار ۱ بیانگر نمونه ای است که هیچگونه عملیات خالص سازی روی آن انجام نشده است. شلوغی در پیکهای نمودار ۱ مربوط به ناخالصیهای محلول حاوی ویتامین B₁₂ حاصل از میکروب می باشد که در طی مراحل بعدی جداسازی و خالص سازی حذف شده اند.
- نمودار ۲ بیانگر نمونه استاندارد بوده و از آن به عنوان شاهد در همه آزمایشها استفاده شده است. همانطور که در این نمودار مشخص شده پیک مربوط به (R.T) ۲۰/۷۱، معرف ویتامین B₁₂ است و پیکهای ۴/۶۸ و ۳/۲۷ (R.T) مربوط به ناخالصیهای نمونه استاندارد می باشد.
- نمودار ۳ بیانگر نمونه ای است که خالص سازی شده و با نمونه شاهد ویتامین B₁₂ بخوبی مطابقت دارد و تغییر در حلالهای بکار رفته و تزریق شده به دستگاه

HPLC باعث جابجایی مختصری (Chemical Shift)

در پیک ویتامین B₁₂ نمونه گردیده است.

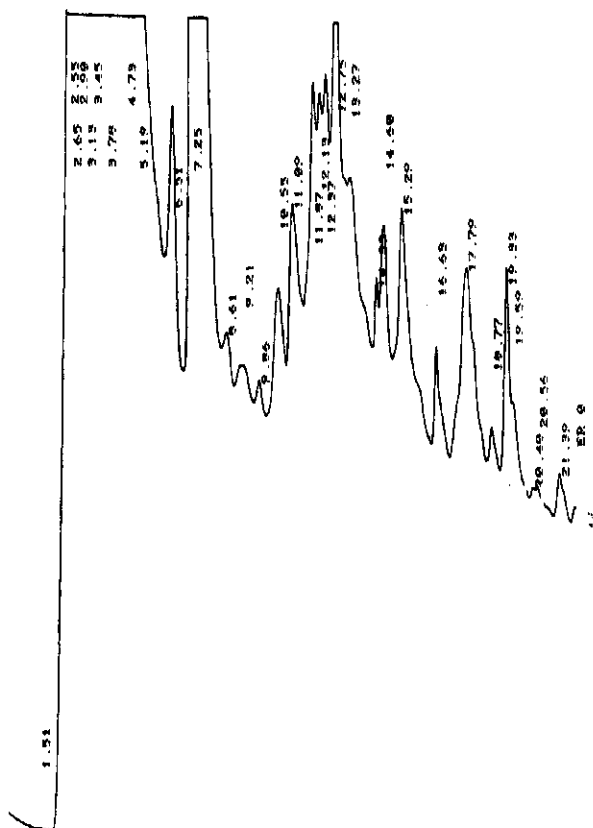
از نتایج مهم در این پژوهش، شستشوی کوبالامین تثبیت شده بر روی رزین با الکل های سبک آلیفاتیکی: متانول، اتانول و ایزوپروپانول است که نسبت حلالهای مختلف بکار رفته در فرآیند شویندگی درجه بندی شده (gradient elution) بسیار اهمیت داشته و با استفاده از کروماتوگرافی روی لایه نازک تعیین گردید.

بررسیهای تجربی نشان داد که مقدار کوبالامین در قسمتهایی از محلولهای جمع آوری شده از زیر ستون وقتی حداکثر است که نسبت حجمی حلالهای بکار رفته به صورت زیر باشد:

۱- متانول ۵۰٪-۲۵٪ حجمی - حجمی (شویندگی درجه بندی شده منظم)

۲- اتانول ۴۰٪-۳۰٪ حجمی - حجمی (شویندگی درجه بندی شده منظم)

۳- ایزوپروپانول ۱۰٪ حجمی - حجمی (شویندگی بی نظم)



نمودار ۱- نمونه اولیه قبل از عملیات خالص سازی



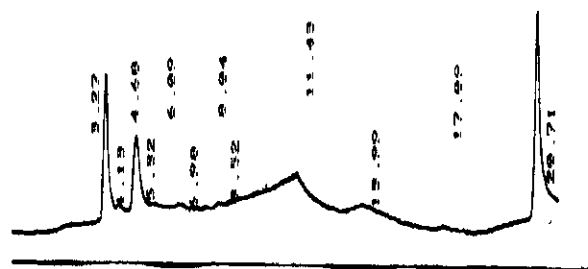
بررسی معادله وان دیمیتز درباره آمبرلیت های XAD-4 و XAD-7

بطوری که قبلاً بیان شد، کوبالامین بر روی دو نوع آمبرلیت XAD-4 و XAD-7 تثبیت می شود. قطر ذرات XAD-4 برابر 40 A° و قطر ذرات XAD-7 برابر 90 A° است. با توجه به معادله وان دیمیتز^(۱)، که تأثیر عواملی از جمله نفوذگر دابی، نفوذ طولی و انتقال جرم نامتعادل را بر بازدهی یک ستون تبیین می کند و با مقایسه نمودارهای ۳ و ۴ مشاهده می شود که با انتخاب آمبرلیت XAD-4، هر یک از عاملهای معادله وان دیمیتز به حداقل مقدار ممکن رسانده می شود و حداکثر بازده کوبالامین بدست می آید [۸ و ۹].

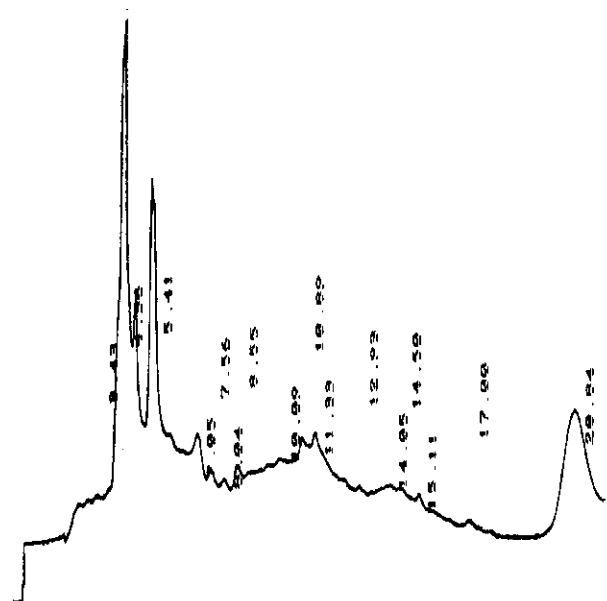
$$H=A+(B/U)+CU \quad \text{معادله وان دیمیتز}$$

پی نوشت ها:

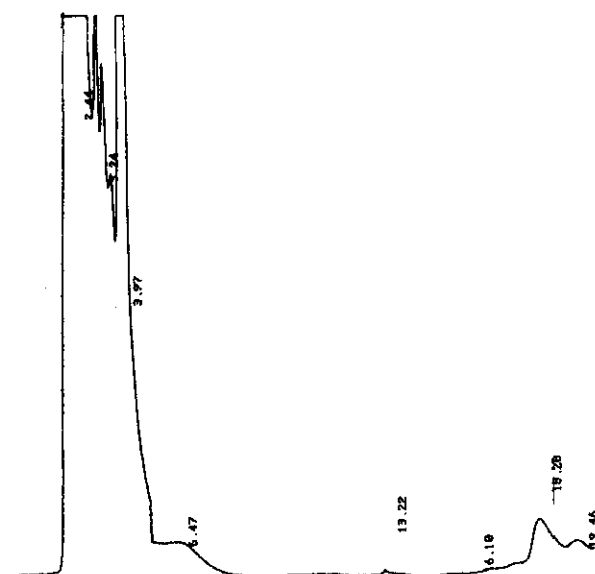
- ۱- Cyanocobalamin
- ۲- Cobalamin
- ۳- Amberlite
- ۴- Immobilization
- ۵- Biomass
- ۶- Vandemeter



نمودار ۲- نمونه استاندارد ویتامین B_{۱۲}



نمودار ۳- نمونه اولیه خالص سازی شده با ستون آمبرلیت XAD-4



نمودار ۴- نمونه اولیه خالص سازی شده با ستون آمبرلیت XAD-7



References:

1. B.M. Babior, "The megaloblastic anemia," Williams Hematology, **5**, 471-489 (1995).
2. E.H. Belcher, "Radioisotope in Medical diagnosis," Elsvier Press, 412-436 (1971).
3. J. Zittoun and R. Zittoun, "Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency," Semin. Hematol. **36**, 35-46 (1991).
4. S.J. Doaglas, "Process for the preparation of a ranitidine resin absorbate," U.S. Patent **5**, 219, 563 (1990).
5. J.Astruc and A.Sambet, "Ion exchanger resin: spiramycin composition," U.S. patent **1**, 180, 233 (1970).
6. S. Boredkin and D.P. Sundberg, "Chewable tables including coated particles of psudoephedine weak cation exchanger resin," U.S. Patent **3**, 597, 470 (1971).
7. Miles laboratories Inc, "Detection device for enzymes and other factors in body fluid," U.S. Patent **3**, 616, 251 (1970).
8. E. Heftman and B.L. Karger and L.R. Snyder, "An introduction to separation science," Chromatography (1979).
9. D.A. Skoog, and D.M. West, "Principles of instrumental analysis," Philadelphia. Saundlers. 677-679 (1980).