بررسی کیفی و کمی هورمون‌های براسینواستروئیدی بوسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی مایع و شناسایی آن در کپسول‌های مکمل

پیمان خوشحال[۱]، محسن امینی[۱]، مرتضی پیرعلی همدانی[۱]*، شمسعلی رضازاده[۲]

۱- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
* آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی
تلفن:۶۶۹۵۹۰۶۶ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۹۵۹۰۶۶ (۰۲۱)
پست الکترونیک: piraliha@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۸ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۵/۱۱

چکیده

مقدمه: براسینواستروئیدها هورمون‌های استخراج شده از گیاه بوده و اثرات بیولوژیک متنوعی از جمله محرک رشد استرسی و آنابولیزان دارا می‌باشند به همین دلیل از این ترکیبات می‌تواند به عنوان مکمل‌های تقویتی نیروزا در ورزشکاران استفاده شود. از این رو نیاز به داشتن روش دقیقی برای اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی این ترکیبات در مکمل‌ها و حتی اندازه‌گیری و تخلیص سطح این هورمون‌ها در نمونه‌های خونی انسان وجود دارد.

هدف: در این مقاله از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به منظور شناسایی و تفکیک این هورمون‌های براسینواستروئیدی و همچنین اندازه‌گیری غلظت کمی این نمونه‌ها در یک نوع کپسول مکمل به نام «فیتولون» استفاده شد.

روش بررسی: به منظور آنالیز نمونه ها از یک سیستم کروماتوگرافی فاز معکوس وستون **C18** و یک فاز متحرک آب و استونیتریل با **pH** اسیدی و یک ردیاب ماورائ بنفش در طول ۲۱۰ نانومتر استفاده شد.

نتایج: در این مطالعه سعی بر آن شده است که شرایط بهینه از جمله فاز ثابت، حلال و سایر شرایط برای این اندازه‌گیری‌ها شناسایی شود. روش آنالیز از نظر اعتبار سنجی و شرایط بهینه مطالعه و حداقل مقدار قابل تشخیص و قابل اندازه‌گیری و محدوده خطی بودن روش و تکرار پذیری آن مطالعه شد.

نتیجه‌گیری: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به عنوان یک روش آنالیز مناسب می‌تواند برای شناسایی و اندازه‌گیری‌های کمی براسینواستروئیدها استفاده شود.

گل‌واژگان: اندازه‌گیری کمی و کیفی هورمون‌های گیاهی، براسینواستروئید، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، هورمون‌های گیاهی

مقدمه

در سال ۱۹۳۰ محققان دریافتند که عصاره‌ی استخراج شده از گرده باعث رشد گیاه می‌شود و اولین مقاله در این مورد در سال ۱۹۴۱ منتشر شد که در آن از عصاره‌ی هگزانی گرده برای برای دانه‌های لوبیا برای افزایش رشد استفاده شد. در سال ۱۹۶۰ محققان شروع به جست و جوی هورمون‌های گیاهی در این دانه‌های گرده کردند و نظر آنها این بود که عاملی که در عصاره‌ی دانه‌ی گرده باعث افزایش چشم گیر رشد می‌شود هورمون‌های گیاهی هستند.

این محققان دریافتند که عصاره‌ی گرده حاوی گروهی از هورمون‌های گیاهی لیپیدی است و آن را براسین نامیدند. در سال ۱۹۷۵ تحقیقاتی برای شناسایی ترکیبات اصلی این عصاره‌ی براسین و سنتز آن صورت گرفت.

به دنبال این تحقیقات براسینولاید به عنوان عامل اصلی اثرات این عصاره و اولین هورمون گیاهی ایزوله و استخراج شد. پس از شناسایی براسینولاید مجموعه‌ای از هورمون‌های خانواده‌ی براسینواستروئید از اندام‌های مختلف گیاه شناسایی و ایزوله شد.

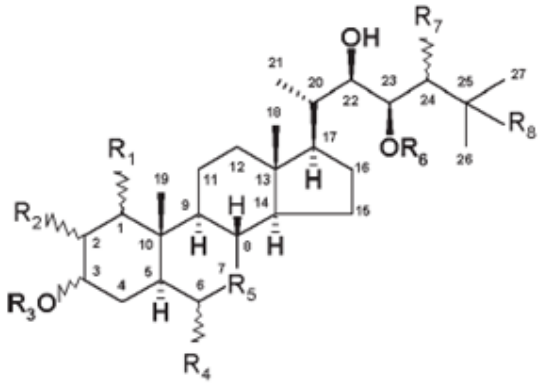
براسینواستروئید از اسکلت کربنی ۵ – آلفا کولستان مشتق شده‌اند که این حلقه می تواند حامل گروه‌های زیر باشد:

- حلقه‌ی A که می‌تواند به صورت مونو یا تری‌اکسیژنه باشد که همیشه در کربن شماره‌ی ۳ اکسیژنه می‌باشد.
- حلقه‌ی B که می‌تواند به صورت ۶- اکسو ۷- اگزالاکتون یا ۶- اکسو باشد و یا به صورت کاملاً اشباع
- حلقه‌های A-D به صورت all-trance می‌باشند.
- در موقعیت‌های ۲۲ و ۲۳ استخلاف عمدتاً به صورت ۲۲ – آلفا و ۲۳ – آلفا دی‌هیدروکسیلاته است و اغلب کربن شماره‌ی ۲۴ آلکیله است و در موقعیت ۲۵ اغلب کربن متیله می‌باشد و اغلب این ترکیبات چهار حلقه‌ای بین کربن ۲۴ و ۲۸ غیراشباع می‌باشد.

این هورمون‌های براسینواستروئیدی معمولاً به ترکیبات قندی و یا اسید چرب متصل هستند [۱].

در مورد فرآیندهای گیاهی اثرات براسینولاید در موارد زیر اثبات شده است:

- وسعت دادن و تقسیمات طولی به بافت از طریق آئوکسین
- نقش در تقسیمات سلولی و بازسازی دیواره‌ی سلولی
- ایجاد و گسترش دیفرنتاسیون عروقی که نقش براسینولاید در این مورد در حال مطالعه و بررسی است
- برای رشد طولی گرده‌ی گیاه و تشکیل لوله‌های گرده ضروری می‌باشد
- افزایش حساسیت در بافت‌های مرده کشت سلولی
- از گیاه در برابر استرس‌های خشکی و سرما محافظت می‌کند [۲].



شکل شماره ۱- اسکلت کربنی و استخلاف‌های موقعیت‌های مختلف براسینواستروئیدها

به دنبال این اثرات و ساختار این ترکیبات که مشابه هورمون‌های آندروژنی انسانی می‌باشد بررسی اثرات بالینی این ترکیبات در انسان امروزه مورد توجه قرار گرفته که از این ترکیبات به عنوان هورمون‌های تزریقی ایمن در ورزشکاران استفاده شود و لذا به دست آوردن روشی برای اندازه‌گیری سطح این هورمون‌ها هم مورد توجه است.

در این مقاله سعی بر آن است که بررسی شود که کروماتوگرافی مایع روش مناسبی برای اندازه‌گیری هورمون‌های براسینولایدی می‌باشد یا خیر و در صورتی که بتوان این ترکیبات را با کروماتوگرافی مایع شناسایی کرد آیا امکان اندازه‌گیری‌های کمی وجود دارد یا خیر (شکل شماره ۲).

برای بررسی بهتر این ترکیبات ابتدا به بررسی برخی ویژگی‌های آن مثل بیوسنتز، متابولیسم و ... می‌پردازیم.

بیوسنتز ترکیبات براسینواستروئیدی:

بررسی متابولیسم و بیوسنتز ترکیبات براسینواستروئیدی باعث پی بردن بهتر به مکانیسم اثر و کاربردهای مختلف آن می‌شود.

به این منظور اولین مطالعات بر روی *Catharantusroseus* صورت گرفت؛ که برای این کار پیش‌ساز دوتریومی براسینولاید یعنی کامپسترول (ترکیب شماره‌ی ۸۷) را در گیاه به کار بردند. برای بررسی این مسیر بیوسنتز از طریق ایجاد موتاسیون سایر مسیرهای بیوسنتز ترکیبات براسینواستروئیدی را بلاک کردند و مشاهده کردند که اگر مرحله‌ی تولید پیش ساز کامپسترول هم بلاک شود، براسینولاید تولید نخواهد شد [۳].

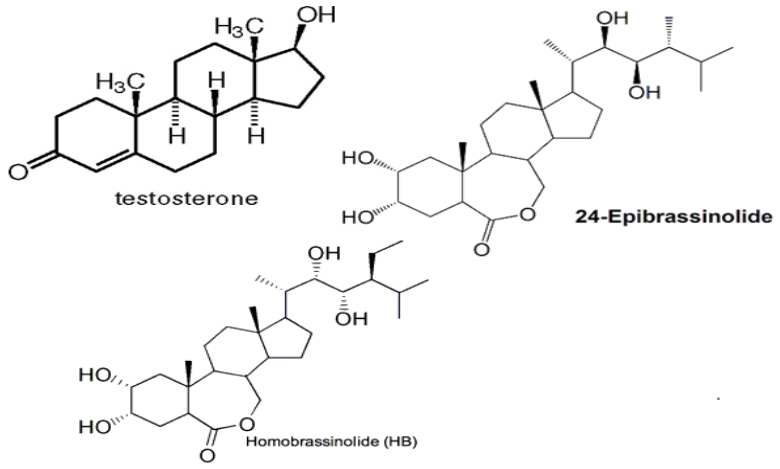
این بیوسنتز با کاهش کامپسترول (ترکیب شماره‌ی ۸۷) به کامپستانول (ترکیب ۸۸) آغاز شده و این کامپستانول به ۶ – آلفا هیدروکسی کامپستانول (ترکیب ۸۹) اکسیده می‌شود و این ترکیب خود به ۶- اکسو کامپستانول (ترکیب ۹۰) تبدیل می‌شود.

در مطالعات موازی نشان داده است که کاتاسترون (ترکیب ۵۳) پیش ساز بیوسنتز تیفاسترول (ترکیب ۲۵) و تیاسترون (ترکیب ۲۶) می‌باشد اما تبدیل ۶-اکسوکامپستانول (ترکیب ۹۰) به کاتاسترون (ترکیب ۵۳) اثبات نشده و حدواسط‌های آن شناسایی نشده است.

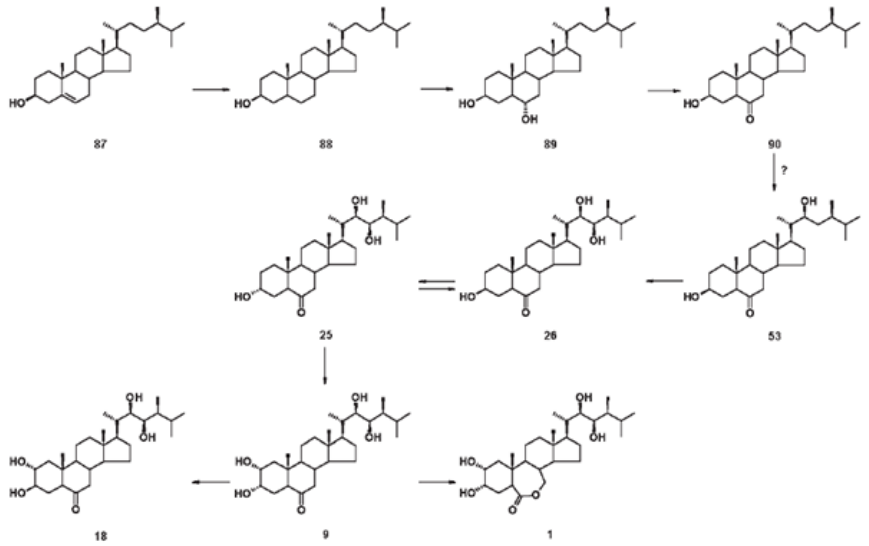
همچنین مشاهده شده است که ترکیبات ۲۵ و ۲۶ در تعادل و تبدیل به یکدیگرند و تیفاسترول (ترکیب ۲۵) به کاستسترون (ترکیب ۹) و سپس به براسینولاید (ترکیب ۱) تبدیل می‌شود.

هم چنین کاستسترون (ترکیب ۹) به ترکیب ۳- اپی کاستسترون (ترکیب ۱۸) ایزومریزه می‌شود.

به دلیل تبدیل اولیه‌ی کامپستانول به ۶-α هیدروکسی کامپستانول (ترکیب ۸۸ به ۸۹) به این مسیر بیوسنتز مسیر اکسیداسیون کربن -۶ سریع می‌گویند (شکل شماره ۳) [۴].



شکل شماره ۲- ساختارهای براسینواستروئیدی



شکل شماره ۳- بیوسنتز براسینولایدها از طریق مسیر اکسیداسیون کربن- ۶ سریع

یک روش بیوسنتز دیگری برای ترکیبات براسینواستروئیدی شناسایی شده که به آن مسیر اکسیداسیون کربن –۶ تأخیری می‌گویند.

استفاده از ترکیبات نشان دار نشان می‌دهد که ۶ – دئوکسی تیاسترون (ترکیب ۴۳) به ۳- دهیدرو ۶- دئوکسی تیاسترون (ترکیب ۴۵) و سپس این ترکیب به ۶ – دئوکسی تیفاسترول (ترکیب ۴۲) تبدیل می‌شود؛ و این ترکیب شماره‌ی ۴۲ به ۶- دئوکسی کاستسترون (ترکیب ۳۶) و سپس به کاستسترون (ترکیب ۹) تبدیل می‌شود.

دریکی از این مطالعات نشان داده شده است که ترکیبات شماره‌ی ۴۳ و ۴۵ و ۴۲ به مشتقات ۶ – اکسوی آن تبدیل نمی‌شوند (شکل شماره ۴) [۵].

متابولیسم ترکیبات براسینواستروئیدی

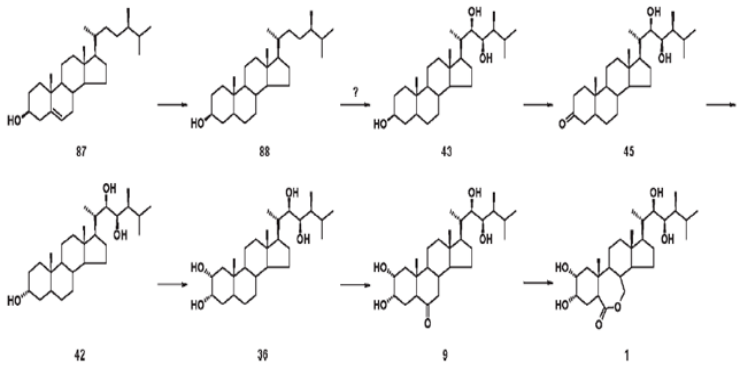
در این بخش به بررسی مسیر متابولیسمی ۲۴- اپی براسینولاید به عنوان ترکیب شاخص خانواده‌ی هورمون‌های براسینولایدی پرداخته می‌شود.

در بررسی یکی از این مسیرهای متابولیسمی در یکی از گونه‌های گیاه گوجه فرنگی به نام *L. esculentum* ۲۴ – اپی براسینولاید طی ترانسفورماسیون گلیکوپیرانوزیده شده و ترکیبات ۱۱۸ و ۱۱۹ ایجاد می‌شود.

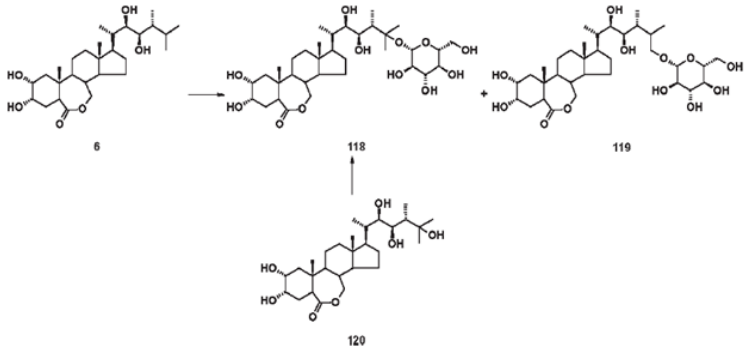
همچنین ممکن است ۲۴–اپی براسینولاید به وسیله‌ی ۲۵- هیدروکسیلاز که یکی از آنزیم‌های پروتئینی سیتوکروم p450 است هیدروکسیله شده و ترکیب ۱۲۰ را ایجاد کند که این ترکیب هم پس از گلیکوزیله شدن به ترکیب ۱۱۸ تبدیل شود (شکل شماره ۵) [۶].

یک مسیر متابولیسمی دیگر برای ۲۴- اپی براسینولاید در گیاه *Ornithopus sativus Brot* شناسایی شده است که در این مسیر ۲۴- اپی براسینولاید ابتدا به ۳ و ۲۴ دی اپی براسینولاید (ترکیب ۱۳۳) تبدیل شده و این ترکیب ۱۳۳ می‌تواند به ۲۵ – هیدروکسی و ۳ و ۲۴ – دی اپی براسینولاید (ترکیب ۱۳۱) و ترکیبات استری ۱۲۸-۱۳۰ و همچنین R۲۰ – هیدروکسی ۳ و ۲۴ – دی اپی براسینولاید (ترکیب ۱۳۲) تبدیل می‌شود که این ترکیب ۱۳۲ هم در ادامه به α۲ و β۳ – دی هیدروکسی –B- هومو – ۷ – اکسا – ۵ α – پرگنان – ۶ و ۲۰ – دی ان (ترکیب ۱۲۷) تبدیل می‌شود (شکل شماره ۶) [۷].

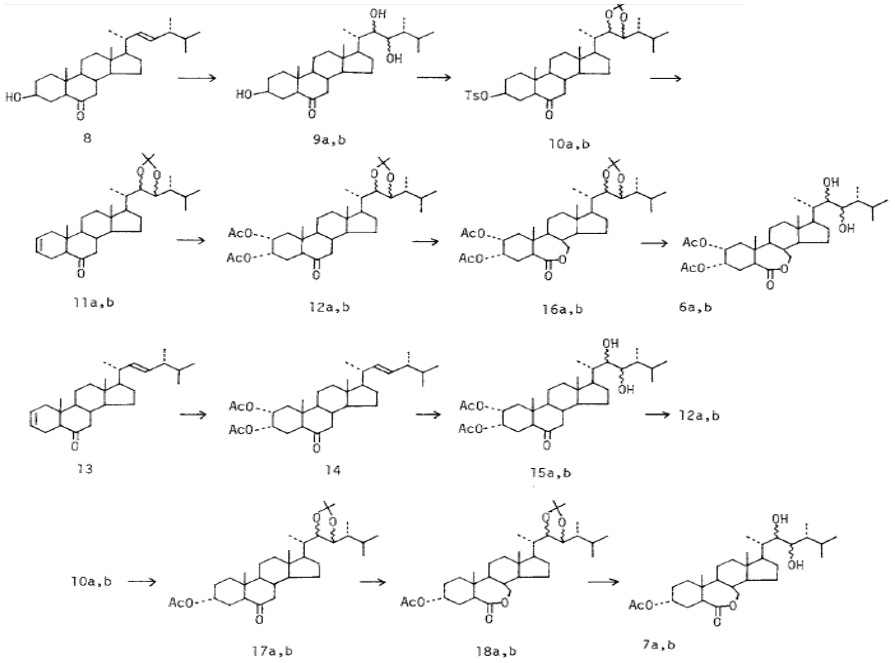
همچنین در یک مطالعه بر روی گیاه *B. napus* نشان داده شده است که ترکیبات براسینواستروئیدی ممکن است تحت تأثیر واکنش‌های سولفوناسیون آنزیماتیک در موقعیت ۲۲ قرار بگیرند که در این روش متابولیسمی این آنزیم سولفوترانسفراز تمایل بیشتری برای متابولیسم ترکیب ۲۴ – اپی کاستسترون دارد [۸].



شکل شماره ۴- بیوسنتز براسینولایدها از طریق مسیر اکسیداسیون کربن-۶ تأخیری



شکل شماره ۵- متابولیسم ۲۴ – اپی براسینولاید بوسیله‌ی *esculentum* L.



شکل شماره ۶- سنتز ترکیبات براسینواستروئیدی

سنتز ترکیبات براسینواستروئیدی

در شکل شماره ۶ مراحل سنتز ترکیبات اپی براسینولایدی مشاهده می‌شود.

برای شروع سنتز ترکیب شماره‌ی ۸ که یک 22-ene می‌باشد بوسیله‌ی اسمیم تترااکساید (OsO_4) و ان – متیل مورفولین ان- اکساید، هیدروکسیله شده و پس از جداسازی بوسیله‌ی کروماتوگرافی دو ترکیب (22S,23S)-3,22,23 triol(9b , 52%) با قطبیت زیاد و یک ترکیب (22R,23R)- isomer (9a, 27%) با قطبیت کمتر ایجاد می‌شود.

ترکیب تری ال (9a, 9b) به ترتیب تحت فرآیند تشکیل استوناید و سپس تاسیلاسیون قرار می‌گیرد که ترکیب تاسیله شده‌ی 10a, 10b را ایجاد می‌کند که این ترکیب در دمای ۱۵۰ درجه به همراه لیتیم برماید و ان و ان – دی متیل فرمامید حرارت داده می‌شود تا مشتق 2-ene (11a , 11b) با بازده بالایی ایجاد شود.

سپس ترکیبات 11a,11b بوسیله‌ی اسمیم تترا اکسید هیدروکسیله شده و سپس استیله می‌شود و مشتق α۲ و α۳ – دی استوکسی -۶- کتون یعنی ترکیبات 12a, 12b با بازده ۷۵ درصد ایجاد می‌شود.

دو ترکیب 12a, 12b با یک روش متغیر دیگر از ترکیب 2,22-diene-6-one (ترکیب ۱۳) ایجاد می‌شود. در طی این واکنش ترکیب ۱۳ بوسیله‌ی اکسیداسیون باند دوگانه‌ی کربن ۲ بوسیله‌ی اسمیم تترا اکساید و به دنبال آن انجام واکنش استیلاسیون ترکیب ۱۴ (α۲ و α۳ دی استات) را ایجاد می‌کند؛ که بازده تقریبی این واکنش ۷۰ درصد است.

ترکیب ۱۴ دوباره بوسیله‌ی اسمیم تترااکساید هیدروکسیله شده و یک ترکیب با قطبیت زیاد (15b) و یک ترکیب با قطبیت کمتر (15a) را می‌دهد که بازده این واکنش‌ها به ترتیب ۴۷ و ۲۴ است. این ترکیبات diol (15a,15b) طی وانش استوناید فرمیشن تبدیل به فرم‌های استوناید یعنی 12a, 12 b می‌شود.

پس از شکل‌گیری 12a, 12b با انجام واکنش اکسیداسیون بایر- ویلیگر بوسیله‌ی مونوکلروپارا بنزوئیک اسید (mCPBA) مشتق ۷- اگزالاکتون یعنی دوترکیب 16a, 16b شکل می‌گیرد.

بازده این واکنش ۷۰ درصد است که پس از آن باید خالص‌سازی با کروماتوگرافی صورت بگیرد.

گروه‌های محافظت کننده‌ی استوناید در 16a, 16b بوسیله‌ی حرارت دادن با محلول مایی ۸۰ درصد استیک اسید، مشتق ۲و۳ دی استات 6a , 6b با بازده ۸۰ درصد ایجاد می‌شود.

برای سنتز ترکیب ۲-دئوکسی (7a, 7b)، ترکیب تاسیلات 10a, 10b بوسیله‌ی سزیم استات و18-crown-6 در رفلاکس با بنزن قرار می‌گیرد و مشتق ۳ α – استات یعنی ترکیبات 17a, 17b با بازده ۶۰ درصد ایجاد می‌شود.

این ترکیبات 17a, 17b تحت واکنش اکسیداسیون بایر – ویلیگر قرار می‌گیرد و مشتق ۷- اگزالولاکتون یعنی ترکیبات 18a, 18b با بازده ۶۰ درصد ایجاد می‌شود، در طی این واکنش مقدار کمی هم مشتق ۶- اگزالولاکتون ایجاد می‌شود که بوسیله‌ی کروماتوگرافی ستون می‌تواند جداسازی شود.

دو ترکیب 18a, 18b بوسیله‌ی حرارت دادن با محلول مایی ۸۰ درصد استیک اسید با بازده بالایی تبدیل به مشتقات 7a, 7b می‌شود [۹،۱۰].

شناسایی و آنالیز ترکیبات براسینواستروئیدی

به دلیل این که مقدار براسینواستروئیدها در گیاهان خیلی کم (در حد ۱۰-۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم گرده) است، فرآیندهای تشخیص و شناسایی و جداسازی آنها فرآیندی سخت و گران قیمت است؛ بنابراین به روش‌های آنالیز مخصوص و دقیقی برای این کار نیاز است.

برای جداسازی ترکیبات براسینواستروئیدی از گیاه و بخش‌های مختلف آن برای جداسازی و کروماتوگرافی از استخراج بوسیله‌ی متانول و یا مخلوط متانول/اتیل استات صورت می‌گیرد که به دنبال آن استخراج بین آب/کلروفرم و محلول ۸۰ درصد متانول/ n- هگزان به عنوان یک فرآیند استاندارد انجام می‌شود [۱۱].

آنالیز براسینواستروئیدها با دستگاه کروماتوگرافی گازی

به دلیل مقدار بسیار کم ترکیبات براسینواستروئیدی در

منابع گیاهی باید روش دقیقی برای این تشخیص و شناسایی و اندازه‌گیری‌های کمی این ترکیب وجود داشته باشد.

روش کروماتوگرافی گازی که میتواند با مس اسپکترومتری همراه شود حساسیت خوبی را برای ترکیبات براسینواستروئیدی ایجاد می‌کند؛ که این حساسیت حدود ۱۰ پیکوگرم است.

برای شروع کروماتوگرافی گازی این ترکیبات نیازمند آماده‌سازی می‌باشند که ترکیبات سیس – هیدروکسی را با متانبورونیک اسید واکنش می‌دهند تا مشتقات متان یا بیس متان بورونات آنها ایجاد شود مثل براسینولاید متان برونات.

در مشتقات ۲- دئوکسی پس از بروناسیون گروه هیدروکسیل حلقه‌ی اول را تری متیل سیلاتد می‌کنند.

این مشتقات بوسیله‌ی کروماتوگرافی گازی با زمان بازداری بسیار دقیق که حساسیت بالایی به تغییر ساختمان براسینواستروئید دارد؛ آنالیز می‌شوند. مشتقات برونات هم چنین می‌توانند بوسیله‌ی mass آنالیز شوند و حتی برای این ترکیبات می‌توان از selective scan ion monitoring استفاده کرد [۱۲].

شناسایی و تعیین مقدار براسینواستروئیدها با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

با توجه به محدودیت‌های روش کروماتوگرافی گازی و قیمت بالای این روش امکان استفاده از این دستگاه برای آنالیز همه‌ی داده‌ها وجود ندارد. در این پایان‌نامه یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با دتکتورUV که جهت شناسایی و تعیین مقدار براسینواستروئیدها حساسیت کافی دارد؛ همچنین حلال‌های مناسب برای استخراج این ترکیبات از کپسول‌های مکمل حاوی این هورمون‌ها، فاز ثابت مناسب، فاز متحرک و سایر شرایط بهینه برای اندازه‌گیری‌های کمی با انجام آزمایش‌های فراوان به دست آمده است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از مواد و حلال‌های زیر استفاده شده است:

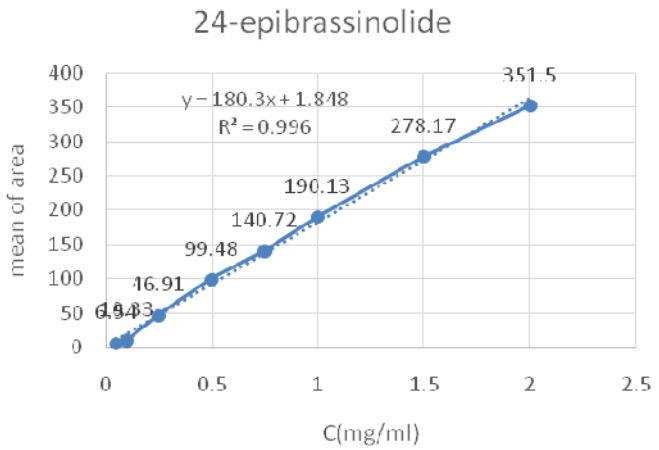
- پودرهای خالص از ترکیبات ۲۴ – اپی براسینولاید و ۲۸ – هومو براسینولاید
- کپسول مکمل فیتولون (حاوی ترکیبات براسینواستروئیدی)
- متانول درجه HPLC ساخت شرکت مرک
- استونیتریل درجه HPLC ساخت شرکت مرک
- آب مقطر دوبار تقطیر
- اتیل استات
- فسفریک اسید

همچنین برای این آزمایش از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با مشخصات زیر و همچنین از ابزارهای زیر استفاده شده است:

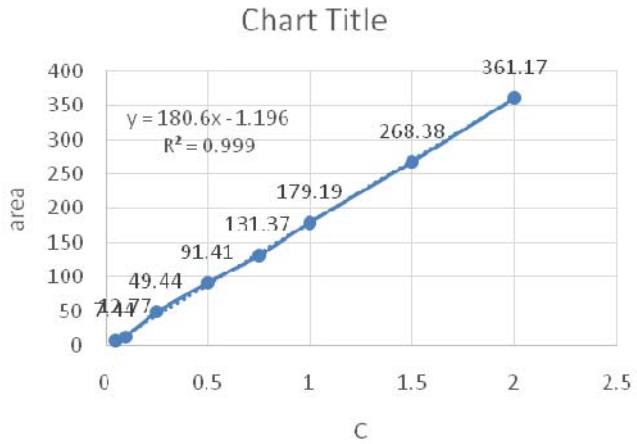
- دستگاه HPLC
- دتکتور water 486 tunable absorbance detector
- CTS 30 column oven
- پمپ water 600 controller
- سرنگ Hamilton-BonDuzSchwetz 100µl
- ستون: column 150×4.E mm in 5 mm B/N 090204/1606
- نرم‌افزار ثبات: chrome & spec 1.5
- دستگاه اولتراسونیک
- دستگاه rotary
- صافی میلی پور ۰/۴۵ میکرون
- پیپت‌های ۱ میلی‌لیتری – ۱۰ میلی‌لیتری
- ترازو

رسم منحنی کالیبراسیون برای ۲۴- اپی براسینولاید و ۲۸- هوموبراسینولاید

برای رسم منحنی کالیبراسیون از هر یک از پودرهای خالص اپی براسینولاید و هوموبراسینولاید محلول‌هایی با غلظت استاندارد ۲ و ۱/۵ و ۱ و ۰/۷۵ و ۰,۵ و ۰/۲۵ و ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر تهیه می‌شود. برای حل کردن پودرهای این براسینواستروئیدها و برای به حجم رسانی از حلال متانول استفاده می‌شود (شکل شماره۷ و۸).



شکل شماره ۷- منحنی کالیبراسیون غلظت استاندارد پودر خالص ۲۸- هوموبراسینولاید



شکل شماره ۸- منحنی کالیبراسیون غلظت استاندارد پودر خالص ۲۴-اپی براسینولاید

برای آنالیز، شرایط آنالیزی برای دستگاه باید به این صورت برقرار باشد: طول موج دتکتور uv ۲۱۰ نانومتر، حجم تزریقی ۱۰۰ میکرولیتر، فاز متحرک محلول ۰/۱ درصد حجم در حجم اسید فسفریک در آب در ترکیب با استونیتریل با نسبت ۲۰ به ۸۰، دمای ستون ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان ۱/۰۰ سانتی‌متر مکعب در دقیقه می‌باشد. با اعمال این شرایط فشار ستون بین ۱۸۳۰ – ۱۸۵۰ پوند بر اینچ مربع می‌باشد.

پس از انجام تزریق و بررسی داده‌ها، ۲۴- اپی براسسینولاید با زمان بازداری ۹/۷ دقیقه و ترکیب ۲۸- هوموبراسینولاید با زمان بازداری ۷/۹ دقیقه به دست می‌آید.

داده‌های آماری

برای رسم منحنی کالیبراسیون و منحنی رگرسین غلظت برای این دو براسینواستروئید از دو نرم‌افزار SPSS و Exel استفاده شده است.

رسم منحنی کالیبراسیون و غلظت

غلظت‌های مختلف از محلول‌های تهیه شده برای هر دو ماده‌ی اپی براسینولاید و هوموبراسینولاید را به دستگاه تزریق می‌کنیم (برای هر غلظت سه بار) و با ثبت نتایج منحنی کالیبراسیون (غلظت – سطح زیر منحنی) معادله‌ی منحنی را به دست می‌آوریم.

این معادله در محدوده‌ی غلظت‌های یاد شده خطی می‌باشد و همچنین r^2 به دست آمده بزرگتر از ۰/۹۹ می‌باشد.

با رسم این منحنی‌ها معادله‌ی خطی غلظت برای دو براسینولاید به صورت زیر برقرار می‌باشد:

اپی براسینولاید $Y = 180.32x + 1.8488$

هوموبراسینولاید $Y = 180.61x - 1.1962$

بررسی تکرارپذیری و دقت روش

در این روش اندازه‌گیری مساحت زیر منحنی با ۸ غلظت مختلف انجام شده و دقت آن بوسیله‌ی انحراف معیار و ضریب تغییرات بیان می‌شود.

برای دقت تعیین مقدار ۲۴- اپی براسینولاید با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جدول شماره ۱ به دست می‌آید.

برای دقت تعیین مقدار ۲۸-اپی براسینولاید با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جدول شماره ۲ به دست می‌آید.

حداقل غلظت قابل تشخیص (LOD) و حداقل غلظت قابل تعیین مقدار (LOQ)

پس از آزمایش بر روی سری غلظت‌های ترکیبات براسینواستروئیدی غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با در نظر گرفتن نسبت signal: noise (3: 1) معادل limit of detection در نظر گرفته شده است.

جدول شماره ۱- بررسی دقت تعیین مقدار اپی براسینولاید بوسیله‌ی hplc (طول موج ۲۱۰ نانومتر، تعداد نمونه ۳ عدد)

غلظت نمونه(mg/ml)	میانگین (AUC)	انحراف معیار	ضریب تغییرات
۰/۰۵	۶/۵۴	۱/۶۹	۰/۲۵۸
۰/۱	۱۰/۳۳	۱/۴۷	۰/۱۴
۰/۲۵	۴۶/۹۱	۴/۱۳۲	۰/۰۸۸
۰/۵	۹۹/۴۸	۵/۸۲۷	۰/۰۵۸
۰/۷۵	۱۴۰/۷۲	۷/۸۵۵	۰/۰۵۵
۱	۱۹۰/۱۳	۳/۱۰۶	۰/۰۱۶۳
۱/۵	۲۷۸/۱۷	۹/۷۴۱	۰/۰۳۵
۲	۳۵۱/۵	۲۸/۷۰۹	۰/۰۸۱

جدول شماره ۲- بررسی دقت تعیین مقدار هوموبراسینولاید بوسیله‌ی hplc (طول موج ۲۱۰ نانومتر، تعداد نمونه ۳ عدد)

غلظت نمونه (mg/ml)	میانگین (AUC)	انحراف معیار	ضریب تغییرات
۰/۰۵	۷/۴۴	۰/۳۰۱	۰/۰۴۰۵
۰/۱	۱۲/۷۷	۰/۲	۰/۰۱۵۶
۰/۲۵	۴۹/۴۴	۵/۷۸۰	۰/۱۱۶
۰/۵	۹۱/۴۱	۴/۹۴۷	۰/۰۵۴۱
۰/۷۵	۱۳۱/۳۷	۵/۳۳۲	۰/۰۴
۱	۱۷۹/۱۹	۱۲/۴۴۲	۰/۰۶۹۴
۱/۵	۲۶۸/۳۸	۲/۸۳۷	۰/۰۱
۲	۳۶۱/۱۷	۱۳/۵۶۲	۰/۰۳۷۵

همچنین پیک حاصل از تزریق غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از ماده با در نظر گرفتن نسبت signal: noise (۱ به ۱۰) به عنوان حداقل مقدار قابل تشخیص تعیین شد.

استخراج براسینواستروئیدها از کپسول‌های مکمل فیتولون

پس از انجام آزمایش‌ها بر روی کپسول‌ها برای رسیدن به حداکثر بازده برای استخراج و حداکثر حذف اکسیپانت‌های دارویی روش زیر به دست آمد که شرح داده می‌شود.

تعداد ۲۰ عدد از کپسول‌های مکمل را باز کرده و محتویات آن را در داخل بشر می‌ریزیم و با ۷۵ میلی‌لیتر از حلال اتیل استات حل می‌کنیم. مقداری رسوب و اکسیپانت‌ها باقی‌مانده که با سونیکیت کردن مقدار بیشتری از مواد را در حلال حل می‌کنیم.

برای جداسازی رسوب‌ها از مواد حل شده در اتیل استات محلول را با صافی صاف کرده و رسوب را جدا می‌کنیم.

ترکیبات براسینواستروئیدی ما در فاز محلول حل شده که آن را ۳ مرتبه (هر بار ۲۵ میلی‌لیتر از آن را) در یک ارلن ریخته و آرام آرام با دستگاه روتاری هر بار مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از حلال آن را تبخیر می‌کنیم که رسوب سفید رنگی باقی می‌ماند.

برای استخراج بهتر رسوب باقی مانده را هم دو بار هر بار با ۴۰ میلی‌لیتر اتیل استات حل کرده و سپس اتیل استات را با دستگاه روتاری تبخیر می‌کنیم.

رسوب باقی مانده در ته ارلن را با ۲ میلی‌لیتر از متانول حل می‌کنیم که این بار هم برای حل شدن کامل از سونیکیت کردن استفاده می‌شود و محلول حاصل از استخراج ما برای تشخیص و تعیین مقدار آماده‌ی تزریق به دستگاه است.

شناسایی و تعیین مقدار براسینواستروئیدهای موجود در کپسول‌های مکمل فیتولون

پس از آماده‌سازی محلول حاصل از استخراج کپسول دستگاه را با همان شرایط یاد شده بارگذاری کرده و محلول حاصل را به دستگاه تزریق می‌کنیم.

با توجه به زمان بازداری حاصل از پیک تزریق پودر خالص دو ماده‌ی اپی براسینولاید و هومو براسینولاید، این دو ماده در کپسول قابل تشخیص است که می‌توان از روی معادله‌ی خطی که به دست آمده است غلظت این دو ماده را در پودر حاصل از استخراج ۲۰ کپسول به دست آورد.

مقدار سطح زیر منحنی برای پیک هوموبراسینولاید ۲۰/۷۸ (میلی‌ولت × ثانیه) می‌باشد که غلظت را می‌توان محاسبه کرد.

همچنین مقدار سطح زیر منحنی برای پیک اپی براسینولاید ۲۹/۴۴ (میلی‌ولت × ثانیه) می‌باشد که غلظت را می‌توان محاسبه کرد.

Homobrassinolide RT = 7.9 min
Y = 180.61x – 1.1962 20.78 = 180.61x – 1.1962 x = 0.121 mg in 2 ml

EpibrassinolideRT: 9.7 min
Y = 180.32x + 1.8488 29.44 = 180.32x + 1.8488 x = 0.153 mg in 2 ml

نتایج

بدین‌ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می‌تواند در محدوده‌ی قابل توجه و مناسبی با توجه به داده‌های به دست آمده که در بخش روش‌ها توضیح داده شد ترکیبات براسینواستروئیدی هوموبراسینولاید و اپی براسینولاید را تشخیص بدهد و با توجه به منحنی‌های کالیبراسیون غلظتی که در محدوده‌ی تقریباً وسیعی خطی و قابل تخمین است، اندازه بگیرد و با توجه به شرایط اتخاذ شده و انتخاب روش‌های جداسازی مناسب این ترکیبات را از داخل کپسول‌های مکمل حاوی این هورمون‌های گیاهی، که می‌تواند به عنوان یک نمونه از هورمون‌های گیاهی آندروژنی مشابه هورمون‌های آندروژنی انسان در مورد ورزشکاران به عنوان هورمون‌های ایمن به کار گرفته شود، جداسازی شود و با توجه به این که سطح این هورمون‌ها در خون نباید از حده مجازی بیشتر شود و شرایط بالینی خاصی را برای آن در نظر می‌گیرند باید روش مناسبی برای اندازه‌گیری دقیق این ترکیبات وجود داشته باشد که در این مورد کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می‌تواند در مواردی که کروماتوگرافی گازی محدودیت دارد از جمله گران تر بودن این روش جایگزین آن شود.

بحث

نمی‌توان از این موضوع گذشت که کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حساسیت کمتری نسبت به کروماتوگرافی گازی دارد و در مواردی که نیاز به اندازه‌گیری در غلظت‌های در حد پیکوگرم است این روش نمی‌تواند اندازه‌گیری مناسبی را انجام دهد.

به دلیل مقدار بسیار کم ترکیبات براسینواستروئیدی در منابع گیاهی باید روش دقیقی برای این تشخیص و شناسایی و اندازه‌گیری‌های کمی این ترکیب وجود داشته باشد.

روش GC که میتواند با mass spectrometry همراه شود حساسیت خوبی را برای ترکیبات براسینواستروئیدی ایجاد می‌کند؛ که این حساسیت حدود ۱۰ پیکوگرم است و در مواردی که حساسیت بالایی لازم و غلظت اندازه‌گیری شده بسیار کم است باید از روش‌های ترکیبی کروماتوگرافی گازی و اندازه‌گیری‌های جرم‌سنجی استفاده شود.

همچنین تحقیقات وسیعی برای بررسی‌های بالینی استفاده از این ترکیبات برای انسان و همچنین خالص‌سازی و اندازه‌گیری غلظت این ترکیبات در نمونه‌های خونی انسانی در حال انجام و توسعه دادن است که در آینده احتمال جداسازی بهتر این ترکیبات در نمونه‌های خونی و آنالیزهای دقیق‌تر را فراهم می‌سازد.

نتیجه‌گیری

با انجام مطالعه حاضر روش کروماتوگرافی با کارکرد بالا و استفاده از یک روش فاز معکوس برای اندازه‌گیری کمی براسینو استروئیدها مناسب تشخیص داده شد و روش حاضر برای کنترل کیفی فراورده‌های دارویی و مکمل‌های ورزشی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از ریاست محترم دانشکده‌ی داروسازی و هیأت مدیره‌ی گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران برای تخصیص بودجه و تصویب اجرای این پروژه و همچنین اساتید راهنمای محترم دکتر محسن امینی و دکتر مرتضی پیرعلی همدانی برای راهنمایی‌های پروژه و مهندس دارابی برای نظارت بر پیشرفت پروژه و کمک‌های فراوان.

منابع

1. Marco António Teixeira Zullo and Günter Adam. Brassinosteroidphytohormones: structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol*. 2002; 14 (3): 143 - 81.

2. Debora Esposito, Slavko Komarnytsky, Sue Shapses and Ilya Raskin. Anabolic effect of plant brassinosteroid. *FASEB. J.* 2011; 25: 3708 - 19.

3. Asami T and Yoshida S. Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends in Plant Sci*. 1999; 4: 348 – 53.

4. Choi YH, Fujioka S, Harada A, Yokota T, Takatsuto S and Sakurai A. A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone. *Phytochem*. 1996; 43: 593 - 6.

5. Choi YH, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A. An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. *Phytochem*. 1997; 44: 609 - 13.

6. Hai T, Schneider B, Porzel A and Adam G. Metabolism of 24-epicastasterone in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochem*. 1996; 41: 197 - 201.

7. Kolbe A, Schneider B, Porzel A and Adam G. Metabolism of 24-epi-castasterone and 24-epibrassinolide in cell suspension cultures of *Ornithopus sativus*. *Phytochem.* 1996; 41: 163 - 7.

8. Grove MD, Spencer GF, Pfeffer PE, Mandava NB, Warthen JD and Worley JF. 6-Beta-

glucopyranosyl fatty acid esters from *Brassica napus* pollen. *Phytochem*. 1978; 17: 1187-92.

9. Suguru Takatsuto, 1 Masahito Muramatsu and Yoshie Ohya. Synthesis of 24-Epibrassinolide-related Compounds with Growth-promoting Activity. *Agric. Biol. Chem*. 1988; 52 (8): 2059 - 64.

10. Voigt B, Porzel A, Adam G, Golsch D, Adam W, Wagner C, Merzweiler K. Synthesis of 2, 24-diepicastasterone and 3, 24-diepicastasterone as potential brassinosteroid metabolites of the cockroach *Periplaneta americana*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 2002; 67: 91-102.

11. Anna Janeczko, Jolanta Biesaga-Kościelniak, Michał Dziurka, Jana Oklešťková, Maciej Kocurek, Grażyna Szarek-Łukaszewska and Zbigniew Janeczko. RESPONSE OF POLISH Cultivars of Soyvean (*Glycine max* L.) Merr.) To Brassinosteroid Application *Acta Sci. Pol. Agricultura*. 2011; 10 (2): 33 - 50.

12. Marco António Teixeira Zullo and Günter Adam. Brassinosteroidphytohormones: structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol*. 2002; 14 (3): 143 - 81.

Quality and Quantity Determination of Brassino-Steroid Hormones by HPLC and Related Assay in Some Supplement Capsules

Khoshhal P (Pharm.D.)[1], Mohsen Amini M (Ph.D.)[1], Pirali Hamedani M (Ph.D.)[1]*, Rezazadeh Sh (Ph.D.)[2]

1- Medicinal Chemistry Department, College of Pharmacy, Tehran Medical Sciences University (TUMS), Tehran, Iran
2- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Medicinal Chemistry Department, College of Pharmacy, Tehran Medical Sciences University (TUMS), Tehran, Iran
Tel & Fax: ++98 -21-66959066
E-mail: Piraliha@tums.ac.ir

Abstract

Background: Brassino-steroids as hormonal plants are of the most important components that have shown the biological effects. These compounds may be act as inducer of growth in the plant and their concentrations is increased under some stress conditions. Such clinical studies show that these hormones have also anabolic activities similar to the human anabolic hormones hence, may be administrated as supplements in athletes. Their increasing consumption as supplement suggests introducing a precise and accurate analytical method for determination of brassino-steroids in pharmaceutical dosage forms and also in some biological fluids.

Objective: In the current study an HPLC method for detect and determination of brassino-steroids in capsules was developed and optimized in aspects of analytical conditions.

Methods: In order to analysis of the sample a reversed phase HPLC system including a C_{18} column, and a mobile phase including water: Acetonitrile in an acidic media were used. Detection was carried out at 210 nm by an UV detector.

Results: In this study, we attempted to optimize some analytical aspects e.g: solvent, stationary phase and other assay parameters to obtain best condition to assay. Also the validation parameters such as LOD, LOQ, accuracy, precision and linearity of the method were also studied and were satisfactory.

Conclusion: Obtained data indicated that HPLC is a suitable analytical method for assay of brassino-steroids in pharmaceutical dosage forms.

Keywords: Brassino-Steroids, Determination, HPLC, Plant Hormons