Archive of SID

نویسندگان
مهندس فاطمه قدمی جوجاده[1*]
دکتر علی داوودی[2]
*Ghadami_f@yahoo.com

بررسی متابولومیکس کلونی‌های قارچی و باکتریایی با استفاده از GC-MS

واژه‌های کلیدی
منابع طبیعی، ترکیبات قارچی و باکتریایی، میکروارگانیسم، آنالیز ترکیبات.

چکیده

منابع طبیعی یکی از مهمترین منابع برای تهیه دارو، شناسایی و جداسازی ترکیبات طبیعی دارای اثرات زیستی است. لذا با توجه به وجود بیماری‌های مختلف و ایجاد بیماری‌های جدید، کشف داروهای جدید حائز اهمیت است. ترکیبات با منشاء طبیعی به دو دسته متابولیت اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. بیشتر ترکیبات تولیدی میکروارگانیسم‌های مختلف به‌خصوص قارچها و باکتری‌ها، به دلیل رشد سریع و اگزوژن بودن از نظر متابولیت‌های ثانویه بسیار حائز اهمیت خواهند بود. آنالیز جامع و مطالعات متابولومیکس کلونی‌های قارچی و باکتریایی به‌عنوان منابع مهم کشف دارو، بسیار حائز اهمیت است. ترکیبات طبیعی به دو روش کیفی و کمی مورد بررسی قرار می‌گیرند. بررسی‌های کیفی و کمی ترکیبات به‌طور عمده براساس مطالعات میکروشیمیایی بر پایه ایجاد رسوب یا رنگ مشخص و نورسنجی انجام می‌شود. روند جداسازی ترکیبات با روش‌های متعددی انجام شده که روش رسوب نمک[3] و روش‌های کروماتوگرافی از مهمترین روش‌های کاربردی هستند. هدف از این مطالعه، آنالیز و متابولومیکس ترکیبات قارچی و باکتریایی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی – اسپکتروسکوپی جرمی به‌منظور کشف داروهای جدید است. دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی[4] به دلیل دارا بودن کتابخانه ترکیبات، قابلیت آنالیز و شناسایی ترکیبات در عصاره‌ها و منابع طبیعی دیگر برتری دارد. ترکیب مورد آنالیز باید نقطه جوش کمتر از حدود ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد داشته باشد و یا با استفاده از روند مشتق‌سازی فرار شود تا بتوان با این روش مورد آنالیز قرار داد.

www.SID.ir

rchive of SID

مقالات

مقدمه

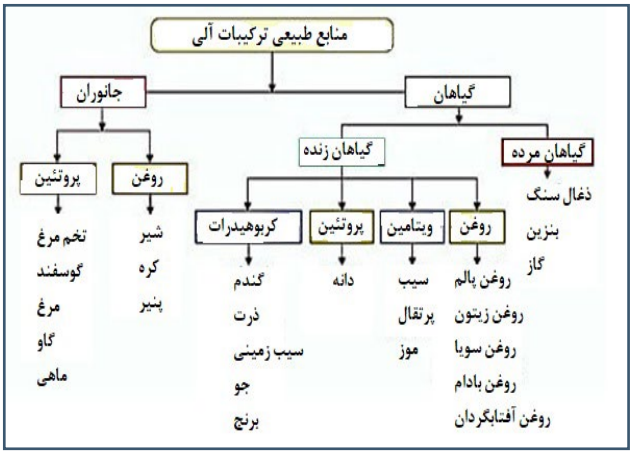
از زمان‌های قدیم، جامعه بشری به دنبال راهکارهایی برای تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها بوده که یکی از مهمترین آن‌ها، استفاده از منابع طبیعی به‌عنوان منابع تهیه دارو است. هم اکنون، با توجه به پیشرفت مطالعات دارویی و اهمیت روز افزون کیفیت درمان با داروها، آنالیزهای دقیق آن‌ها ضرورت بالایی دارد. منابع طبیعی شامل گیاهان، قارچ‌ها و جلبک‌ها از مهمترین منابع در دسترس برای شناسایی و جداسازی ترکیبات طبیعی بالقوه دارای اثر بیولوژیک بوده که از دیرباز مورد توجه اساسی بوده‌اند به‌گونه‌ای که بخش اعظم ترکیبات دارویی موجود از منابع طبیعی استخراج شده و بخش خیلی زیادی از آن‌ها با الگوبرداری از ترکیبات با منشاء طبیعی طراحی شده‌اند. با توجه به وجود بیماری‌های مختلف در سطوح انسانی و ایجاد بیماری‌های جدید، کشف و تهیه داروهای جدید الزامی بوده که منابع طبیعی نقش به‌سزایی را ایفا خواهند کرد.

ترکیبات با منشاء طبیعی:

منابع طبیعی حاوی ترکیباتی هستند که به واسطه حضور آن‌ها اعمال فیزیولوژیک خود را انجام می‌دهند که بسته به مسیرهای متابولیسمی جاندار، در هر سلسله جانداری متفاوت بوده و باعث ایجاد عملکرد فارماکولوژیک می‌شوند.

این ترکیبات به دو دسته متابولیت اولیه[5] و ثانویه[6] تقسیم می‌شوند. ترکیبات کربوهیدراتی، لیپیدی، پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک جزء متابولیت‌های اولیه و ترکیباتی مانند آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها و استروئیدها جزء متابولیت‌های ثانویه هستند. از نظر فارماکولوژیک، هر کدام از این دسته ترکیبات با داشتن ساختمان شیمیایی منحصر به فرد، روی گیرنده‌ای خاص در محیط بیولوژیک اثر گذاشته و عملکرد آگونیستی یا آنتاگونیستی را ایجاد می‌کنند (شکل (۱)) [۱].

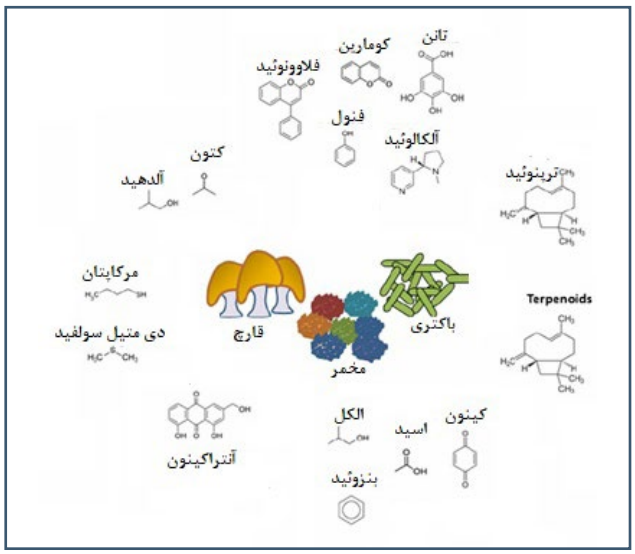
به‌طور کلی، از مهمترین اثرات این ترکیبات می‌توان به اثرات آنتی اکسیدانت، ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، سایتوتوکسیک و تنظیم کننده سیستم ایمنی اشاره نمود که میزان اثربخشی آنها به‌طور کامل به نوع و ساختار ترکیب وابسته است [۲].



شکل (۱): دسته‌بندی کلی ترکیبات با منشاء طبیعی [۲].

متابولیت‌های قارچی و باکتریایی

میکروارگانیسم‌های مختلف به‌خصوص قارچ‌ها و باکتری‌ها به واسطه مسیرهای متابولیسمی منحصربه فرد توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات را دارند. این دسته از منابع طبیعی به دلیل رشد سریع و اگزوژن بودن بیشتر ترکیبات آن‌ها از نظر متابولیت‌های ثانویه بسیار حائز اهمیت خواهند بود. این میکروارگانیسم‌ها به‌منظور مصارف دارویی در محیط‌های کشت و در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی کشت داده شده و متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها را جمع‌آوری می‌کنند. (شکل (۲)) [۳].



شکل (۲): متابولیت‌های مختلف قارچی و باکتریایی [۳].

به‌طور عمده، این متابولیت‌ها از دسته ترکیبات نیتروژن‌دار، گوگرددار، ترکیبات ترپنوئیدی، آلکالوئیدها و ترکیبات نئوفلاوونوئیدی هستند که در بسیاری از موارد از ترکیبات آن‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود.

بررسی‌های متابولومیک ترکیبات کلونی‌های قارچی و

www.SID.ir

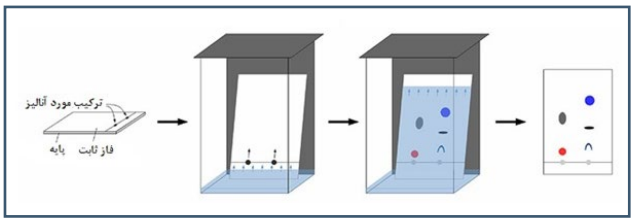
Archive of SID

باکتریایی در شرایط مختلف کشت برای رسیدن به ترکیبات جدید دارای اثرات بیولوژیک بسیار حائز اهمیت است.

روش‌های آنالیز و شناسایی ترکیبات طبیعی

بررسی‌های کیفی ترکیبات براساس مطالعات میکروشیمیایی بر پایه ایجاد رسوب یا رنگ مشخص انجام می‌شود. بدین صورت که رنگ یا رسوب تشکیل شده نشان دهنده حضور یا عدم حضور یک دسته ترکیب خاص است. البته در مطالعات بررسی کیفی، روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۷] و کروماتوگرافی لایه نازک[۸] نیز بسیار کمک کننده هستند. (شکل‌های (۳ و ۴)) [۴ و ۵].

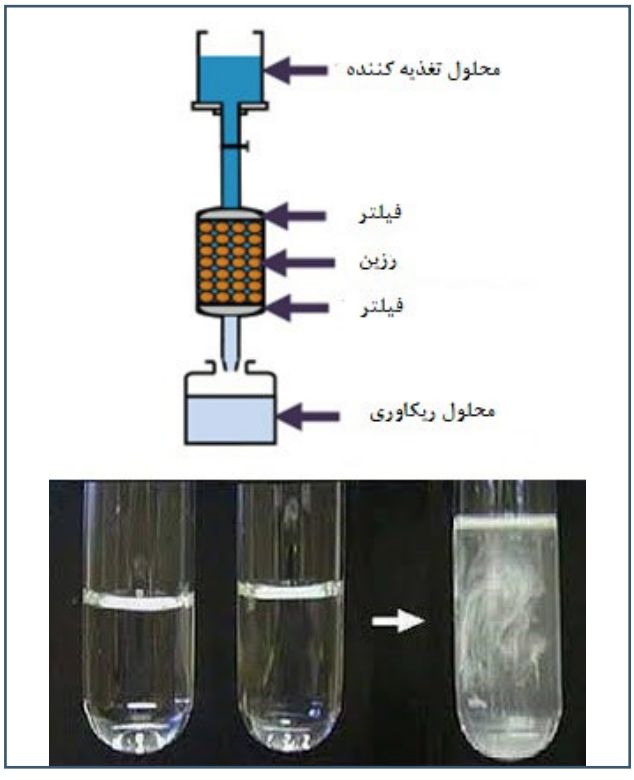
شکل (۳): دستگاه HPLC [۴].



شکل (۴): روش بررسی با TLC [۵].

روش‌های بررسی کمّی ترکیبات به ۲ دسته بررسی تام ترکیبات و بررسی جزء به جزء ترکیبات تقسیم‌بندی می‌شوند که همگی بر پایه نورسنجی هستند. روش‌های بررسی تام ترکیبات با توجه به پایه ساختاری آن‌ها و در حضور یک عامل کمپلکس دهنده‌ای که در طیف UV آن‌ها شیفت باتوکرومیک یا هیپسوکرومیک ایجاد کنند، انجام می‌شود. همچنین، بررسی کمّی جزء به جزء ترکیبات به‌طور عمده با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی انجام شده که متعاقب جداسازی ترکیبات، عمل تعیین مقدار براساس نورسنجی یا شناساگرهای دیگر مانند ضریب شکست انجام خواهد شد.

البته، در تعیین مقدار ترکیبات با این روش حضور ترکیبات استاندارد آن‌ها لازم است. در تمامی ترکیبات آلکالوئیدی، بر پایه حضور گروه آمینی بررسی کیفی و کمّی انجام می‌شود. در تمامی ترکیبات گیاهی، قارچی و جانوری، استخراج براساس پلاریته آن‌ها انجام می‌شود. برای این منظور، ترکیبات غیر پلارتر مانند لیپیدها، استروئیدها و ترپنوئیدها با استفاده از حلال‌های غیر پلار مانند هگزان، کلروفرم و دی کلرومتان، ترکیبات دارای پلاریته متوسط مانند فلاوونوئیدها، اسیدهای فنلیک و آلکالوئیدها با حلال‌های دارای پلاریته متوسط مانند اتیل استات، استون و اتانل و ترکیبات دارای پلاریته بالا مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها با حلال‌های بسیار پلار مانند آب استخراج می‌شوند. همچنین، در روند استخراج به‌طور عمده از روش‌های ماسراسیون[۹] با خیساندن گیاه در حلال برای مدت مشخص، پرکولاسیون[۱۰] با تکیه بر ماسراسیون و اختلاف اسمولاریته موجود بین سلول‌های گیاهی و حلال، سوکسله[۱۱] با تکیه بر حلال گرم شده و اختلاف اسمولاریته موجود بین سلول‌های گیاهی و حلال، اولتراسونیک[۱۲] با ایجاد ضربات مکانیکی به سلول و خروج بهتر ترکیبات استفاده می‌شود. هر کدام از این روش‌ها دارای مزایا و معایب منحصر به فرد بوده و قابلیت مصرف اختصاصی برای هر استخراج هر دسته ترکیب را دارند. همچنین، برای تهیه عصاره‌های سرشار از دسته ترکیبات مورد نظر، روش‌های متعددی مانند تغییرات pH، کمپلکس‌سازی با فلزات سنگین، استفاده از رزین‌های کاتیونی و آنیونی و غیره وجود دارند(شکل (۵)) [۶].



شکل (۵): سیستم جداسازی با رزین و رسوب [۶].

www.SID.ir

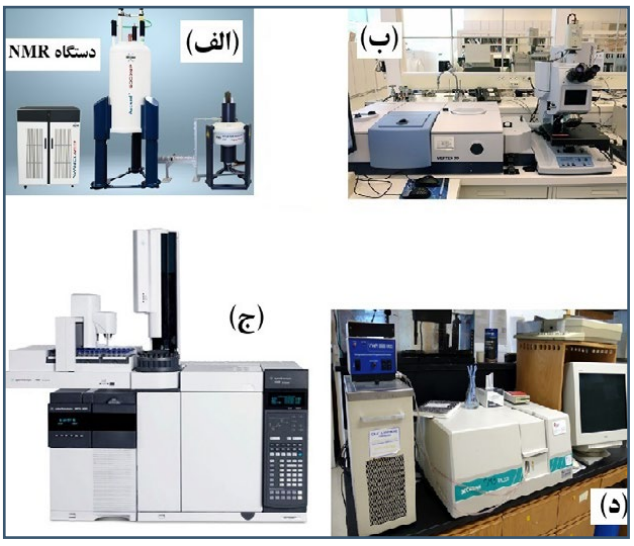
rchive of SID

در تمامی مطالعات فیتوشیمیایی برای جداسازی و شناخت ترکیبات موثره گیاهی روند منطقی استخراج بر پایه تهیه عصاره‌های سرشار از ترکیبات هدف است. در این موارد، به‌طور تقریبی، تمامی عیوب روش‌های جداسازی و خالص‌سازی سنتی مانند اختلاط چند دسته ترکیب با پلاریته‌های مشابه و اختلال در روند جداسازی از بین خواهند رفت. روند جداسازی ترکیبات با روش‌های متعددی انجام می‌شود که روش رسوب نمک و روش‌های کروماتوگرافی از مهمترین روش‌های کاربردی هستند.

در روش رسوب نمک با استفاده از یک حلال با قابلیت انحلال‌پذیری بیشتر در محلول حاوی ترکیب یا دسته ترکیبات عمل رسوب ترکیبات مورد نظر انجام شده و در پایان با صاف کردن ترکیبات به‌دست می‌آیند.

در روش‌های کروماتوگرافی، بر پایه یک فاز ساکن و مجموعه‌ای از حلال‌ها با پلاریته‌های مختلف برای ترکیبات غیر فرار و برخی گازها برای ترکیبات فرار روند جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات انجام می‌شود. از مهمترین روش‌های کروماتوگرافی می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی ستونی[۱۳]، TLC نوع تهیه‌ای، HPLC نوع تهیه‌ای، کروماتوگرافی گازی نوع تهیه‌ای و کروماتوگرافی مایع-مایع اشاره نمود.

در تمامی مطالعات فیتوشیمیایی بعد از مراحل استخراج، جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات، روند تعیین ساختار شیمیایی آن‌ها انجام می‌شود. برای این منظور، از روش‌های وابسته به رزونانس هسته مانند ^{1}H NMR، ^{13}C NMR، HSQC، HMBC، NOESY، COSY و TOCSY، روش‌های وابسته به شکست قطعات پایدار ساختمان شیمیایی ترکیبات مانند اسپکتروسکوپی جرمی[۱۴]، روش‌های وابسته به ارتعاشات پیوندی بین اتم‌های ترکیبات مانند مادون قرمز[۱۵] و روش‌های وابسته به جذب و عبور امواج فرابنفش و مرئی مانند فرابنفش[۱۶] استفاده می‌شوند (شکل (۶)) [۴].



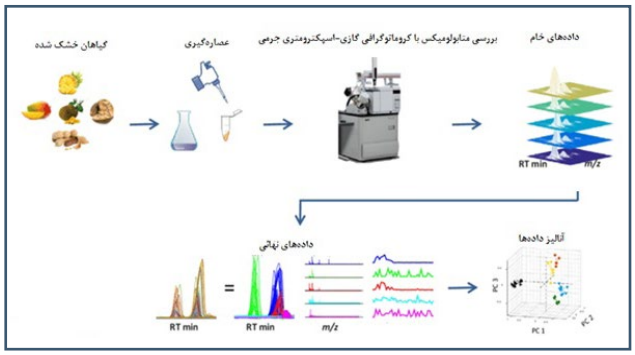
شکل (۶): (الف): دستگاه NMR، (ب): دستگاه IR، (ج): دستگاه MS، (د): دستگاه UV [۶].

www.SID.ir

آنالیز متابولومیکس متابولیت‌های میکروارگانیسم‌ها با GC-MS

میکروارگانیسم‌های باکتریایی و قارچی به‌عنوان موتورهای زیستی[۱۷] میکروسکوپی مطرح هستند که توانایی تولید بخش وسیعی از ترکیبات دارویی و بالقوه دارویی را دارند و این ترکیبات، مستقل از دسته ساختاری به‌صورت اندوژن یا اگزوژن هستند. با توجه به شرایط محیطی و تداخلات در روند رشد و متابولیسم سلولی آن‌ها، مسیر بیوسنتزی آن‌ها تغییر یافته و منتج به تولید ترکیبات جدید خواهد شد (شکل (۷)).

دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی به واسطه کتابخانه ترکیبات، قابلیت آنالیز و شناسایی ترکیبات در عصاره‌ها و منابع طبیعی دیگر را دارد. در روند بررسی برخی ترکیبات، نیاز به بعضی از واکنش‌های شیمیایی به‌منظور تولید مشتقات فرار از ترکیب بوده که روند آنالیز را میسر خواهد کرد [۷].



شکل (۷): روند بررسی ترکیبات با دستگاه GC-MS [۷].

در این روش، ترکیب مورد آنالیز باید نقطه جوش کمتر از حدود ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد داشته یا با روند مشتق‌سازی قرار شود تا با این روش مورد آنالیز قرار گیرد. از ویژگی‌های منحصربه فرد این روش، وجود کتابخانه ترکیبات بوده که در عدم حضور ترکیب استاندارد، شناسایی به نسبت دقیق آن را در مخلوط امکان‌پذیر خواهد کرد.

آنالیز جامع و مطالعات متابولومیکس کلونی‌های قارچی و باکتریایی به‌عنوان منابع مهم کشف دارو، بسیار حائز اهمیت است به‌گونه‌ای که بعد از شناسایی ترکیبات آن‌ها با استفاده از روش GC-MS، با مطالعات داکینگ و دینامیک مولکولی، برآورد جامعی از اثرات ترکیبات آن‌ها به‌دست می‌آید.

در این فرآیند، ابتدا ترکیبات کلونی با استفاده از حلال استخراج و سپس با استفاده از مشتقات سیلیکا، مشتق‌سازی شده و سپس به دستگاه تزریق می‌شود. در نهایت با به‌دست آوردن پیک عصاره و الگوی شکست هر ترکیب و کتابخانه دستگاه، ترکیبات موجود در کلونی شناسایی خواهد شد.

Archive of SID

نتیجه‌گیری

روش آنالیز ترکیبات با دستگاه GC-MS به واسطه دارا بودن کتابخانه ترکیبات به روز و کامل و محاسبات اندیس کواتز، قابلیت شناسایی تقریبا تمامی ترکیبات فرار، ترکیبات مشتق‌سازی شده به‌منظور ایجاد فراریت و ترکیبات دارای نقطه جوش کمتر از ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد را دارد. این روش، برای مطالعات متابولومیکس کلونی‌های قارچی و باکتریایی فعال و دارای قابلیت تولید ترکیبات جدید به‌خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها روش مناسب و انتخابی خواهد بود.

پی‌نوشت

۱. استادیار فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. کارشناس ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

3. Salting out
4. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)
5. Primary Metabolites
6. Secondary Metabolites
7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
8. Thin Layer Chromatography (TLC)
9. Maceration
10. Percolation
11. Soxhelet
12. Ultrasonic
13. Column Chromatography
14. Mass Spectrometry (MS)
15. Infra-Red (IR)
16. Ultra-Violet (UV)
17. Bioreactors

مراجع

[1] Mirzaee F, Hosseini A, Jouybari HB, Davoodi A, Azadbakht M. Medicinal, biological and phytochemical properties of Gentiana species. Journal of traditional and complementary medicine. 2017;7(4):400-8.

[2] Davoodi A, Azadbakht M, Hosseinimehr SJ, Emami S, Azadbakht M. Phytochemical profiles, physicochemical analysis, and biological activity of three colchicum species. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2021;16 (2).

[3] Bakhshi Jouybari H, Bekhradnia A, Mirzaee F, Hosseinzadeh MH. Chemical composition of the lumpy bracket mushroom (Trametes gibbosa). Research Journal of Pharmacognosy. 2022;9(2):19-27.

[4] Azadbakht M, Davoodi A, Hosseinimehr SJ, Keighobadi M, Fakhar M, Valadan R, et al. Tropolone alkaloids from Colchicum kurdicum (Bornm.) Stef.(Colchicaceae) as the potent novel antileishmanial compounds; purification, structure elucidation, antileishmanial activities and molecular docking studies. Experimental parasitology. 2020;213:107902.

[5] Azadbakht M, Davoodi A, Hosseinimehr SJ, Emami S, Azadbakht M, Mirzaee F, et al. Phytochemical, physicochemical and biological evaluation of Colchicum kurdicum (Bornm.) Stef.: a study on materia medica of Persian medicine. Journal of Medicinal Plants. 2020;19(76):36-45.

[6] Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Chinese medicine. 2018;13(1):1-26.

[7] Mohammadpour M, Abaszadeh B, Azadbakht M, Minooei Moghadam J. Investigation of main constituents of Satureja hortensis L. essential oil under sowing date and plant density in Mazandaran province. Journal of Medicinal Herbs. 2017;8(3):141-8.

www.SID.ir