

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی سنتز شیمیایی هورمون اکسی‌توسین

مجتبی بیژنی^۱، حسین عطار^۱، هومن کاغذیان^{۲*}

۱. گروه مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشکده فنی مهندسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

ش: ۲۳ آذر ۱۴۰۴

دریافت: ۰۳ آذر ۱۴۰۴

چکیده

زمینه و هدف: هورمون اکسی‌توسین یک نانوپپتید حلقوی متشکل از نه اسیدآمین به یک پیوند دی‌سولفیدی درون‌مولکولی است که نقش اساسی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک نظیر انقباضات رحمی، شیردهی و فعالیت محور هیپوتالاموس هیپوفیز آدرنال دارد. حساسیت ساختاری این مولکول و نیمه‌عمر کوتاه آن، دستیابی به روش‌های سنتز دقیق با خلوص دارویی را ضروری می‌سازد. هدف این پژوهش، بهینه‌سازی مراحل سنتز شیمیایی اکسی‌توسین به روش فاز جامد و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی محصول نهایی است.

روش‌ها: سنتز پپتید بر پایه رزین رینک آمید و سیستم فعال‌ساز شامل HATU و باز آلی دی‌ایزوپروپیل ایتل آمین انجام شد. پس از تکمیل زنجیره، پپتید با مخلوط تریفلوئوراستیک‌اسید/تری‌اتیل‌سیلیان/آب از رزین جدا و پیوند دی‌سولفیدی میان سیستم‌های یک و شش تحت شرایط قلیایی کنترل‌شده در pH حدود ۸ تشکیل شد. محصول خام با کروماتوگرافی فازی معکوس در مقیاس خالص‌سازی جداسازی شد. آنالیزهای نهایی شامل کروماتوگرافی تحلیلی، طیف‌سنجی جرمی، سنجش pH، آزمون اندوتوکسین و ارزیابی ظاهری انجام گرفت.

یافته‌ها: پپتید حاصل دارای خلوص ۹۹/۶ درصد، پیک یکتای کروماتوگرافی و جرم مولکولی منطبق با مقدار تئوریک بود. طیف سنجی جرمی یونش پاششی پیک غالب (نسبت جرم به بار ۱۰۰۷/۲) را نشان داد. مقدار pH برابر 5.2 ± 0.1 و آزمون اندوتوکسین مقدار (کمتر از ۰/۲۵) واحد اندوتوکسین در هر میلی‌لیتر) را ثبت کرد، که حاکی از ایمنی میکروبیولوژیک و حذف کامل آلودگی‌های پیروژنی است. این مجموعه یافته‌ها نشان داد که فرآیند طراحی شده قادر است پپتیدی با پایداری فیزیکی مناسب، ساختار صحیح، خلوص دارویی و یکنواختی ظاهری تولید کند.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی مرحله‌ای سنتز فاز جامد شامل تنظیم نسبت فعال‌ساز/باز، افزایش کنترل‌شده زمان کوپلینگ و اجرای اکسیداسیون ملایم، منجر به تولید اکسی‌توسین با خلوص بالا، جرم منطبق با مقدار تئوریک و بازده ۶۹/۸ درصد شد. کاهش زمان فرایند از ۸۰ به ۶۸ ساعت بیانگر افزایش راندمان بدون افت کیفیت بود. این پروتکل به‌عنوان نسخه‌ای اصلاح‌شده و قابل‌اتکا، قابلیت تکرارپذیری و انتقال به مقیاس‌های بزرگ‌تر را دارد.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، سنتز پروتئین، فاز جامد، هورمون اکسی‌توسین.

مقدمه

هورمون اکسی‌توسین یک نانوپپتید حلقوی متشکل از نه اسیدآمین و دارای یک پیوند دی‌سولفیدی درون‌مولکولی میان باقی‌مانده‌های سیستمی^۱ در موقعیت‌های یک و شش است که آن را به یکی از بنیادی‌ترین نوروپپتیدهای تنظیم‌کننده در

دستگاه‌های فیزیولوژیک پستانداران تبدیل می‌کند [۱-۳]. این مولکول از دو اکسی‌والان اسیدآمین سیستمی و یک اکسی‌والان از گلايسين^۲، لوسين^۳، پرولين^۴، آسپارژين^۵، گلوتامين^۶، ایزولوسين^۷ و تیروزین^۸ تشکیل شده است و ساختار حلقوی آن نقش

^۵ Asparagine (C₄H₈N₂O₃)

^۶ Glutamine (C₅H₁₀N₂O₃)

^۷ Isoleucine (C₆H₁₃NO₂)

^۸ Tyrosine (C₉H₁₁NO₃)

^۱ Cys¹-Cys⁶

^۲ Glycine (C₂H₅NO₂)

^۳ Leucine (C₆H₁₃NO₂)

^۴ Proline (C₅H₉NO₂)

در چارچوب فیزیولوژی هورمون و توسعه داروهای پپتیدی تحلیل شود تا زمینه‌ای علمی برای تولید آنالوگ‌های پایدارتر مانند کاربتوسین و پتانسیل طراحی مسیرهای صنعتی سنتز پپتیدهای زیست‌فعال فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از درجه خلوص سنتزی یا کروماتوگرافی تهیه شدند. رزین رینک آمید با ظرفیت بارگذاری (۳۰۸/۰ میلی مول بر گرم) و مشتقات اف‌موک آمینه‌اسیدی از شرکت بیوشم^{۱۷} تهیه شدند. معرف‌های فعال‌ساز شامل HATU و باز آلی دی ایزوپروپیل ایتل آمین از شرکت سیگما آلدريج^{۱۸} خریداری گردیدند. حلال‌های مورد استفاده شامل دی کلرومتان^{۱۹}، دی متیل فرمامید^{۲۰} و اتیل اتر^{۲۱} از نوع آنالیتیکال گرید تهیه گردید. سایر مواد مانند تریفلوئوراستیک اسید^{۲۲}، تری‌اتیل سیلان^{۲۳}، پپیریدین^{۲۴} و محلول آمونیاک^{۲۵} با خلوص بالا از شرکت مرک^{۲۶} مورد استفاده قرار گرفتند. آب مورد استفاده در تمام مراحل سنتزی و خالص‌سازی، از نوع دی‌یونیزه عاری از دی‌اکسید کربن و تهیه‌شده با دستگاه آب‌ساز میلی‌کیو^{۲۷} بود.

طراحی آزمایش

آماده‌سازی رزین و اتصال نخستین اسید آمینه

در این پژوهش، سنتز شیمیایی هورمون اکسی‌توسین با استفاده از روش فاز جامد و راهبرد محافظتی اف‌موک انجام گرفت. برای این منظور از رزین رینک آمید بهره گرفته شد؛ رزینی که به دلیل ایجاد انتهای آمیدی در پایان زنجیره پپتیدی، انتخاب استاندارد برای سنتز پپتیدهای حلقوی و زیست‌فعال از جمله اکسی‌توسین محسوب می‌شود [۱۱، ۱۲]. به منظور آغاز فرایند سنتز، مقدار سه گرم از رزین به درون راکتور شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری مجهز به فیلتر گلس انتقال داده شد. رزین در ابتدا برای حذف ناخالصی‌های سطحی و فعال‌سازی محیط

تعیین‌کننده‌ای در پایداری فضایی و فعالیت زیستی آن دارد [۴]. این هورمون در نورون‌های مگنوسلولار^۹ هسته‌های سوپرااپتیک^{۱۰} و پاراوانتریکیولار^{۱۱} هیپوتالاموس سنتز شده و از طریق آکسون‌های طولی به لوب خلفی هیپوفیز منتقل و در پاسخ به تحریکات نورونی ترشح می‌شود [۵، ۶]. نقش‌های اکسی‌توسین محدود به اعمال کلاسیک آن در القای انقباضات رحمی و تنظیم شیردهی نیست، بلکه در سال‌های اخیر ابعاد گسترده‌ای از عملکرد آن در تنظیم محور هیپوتالاموس هیپوفیز آدرنال، کنترل هموستاز قلبی عروقی، تعدیل رفتارهای اجتماعی، پیوندهای عاطفی و تنظیم پاسخ‌های استرس آشکار شده است [۷، ۸]. دستیابی به روش‌های سنتز دقیق، تکرارپذیر و مقرون‌به‌صرفه که بتواند این هورمون را با خلوص دارویی، پایداری فضایی کافی و یکنواختی ساختاری تولید کند، اهمیتی کلیدی دارد. در این میان، سنتز پپتید به روش فاز جامد^{۱۲} با راهبرد محافظتی اف‌موک^{۱۳} استانداردترین روش تولید پپتیدهای حلقوی نظیر اکسی‌توسین است، زیرا امکان کنترل مرحله‌به‌مرحله اتصال اسیدهای آمینه، حذف گزینشی گروه‌های محافظ و تشکیل هدفمند پیوندهای دی‌سولفیدی را فراهم می‌کند [۹-۱۱]. کارایی سنتز فاز جامد به شدت تحت تأثیر نوع رزین، بازده واکنش‌های کوپلینگ، کیفیت مراحل محافظت زدایی، و شرایط اکسیداسیون دی‌سولفیدی است. شواهد پژوهشی اخیر نشان داده‌اند که به کارگیری ترکیبات فعال‌ساز کارآمد مانند HATU^{۱۴} و تنظیم نسبت‌های مولی بازهای آلی نظیر دی ایزوپروپیل ایتل آمین^{۱۵} می‌تواند به طور قابل توجهی بازده اتصال، خلوص نهایی و کاهش واکنش‌های جانبی را بهبود دهد [۱۲-۱۴]. در همین راستا، پژوهش حاضر با بهره‌گیری از رزین رینک آمید^{۱۶} و سامانه فعال‌ساز و با تنظیم عامل‌های کلیدی سنتز، به دنبال ارائه پروتکلی بهینه‌شده برای تولید اکسی‌توسین با خلوص دارویی است. هدف نهایی این مطالعه، سنتز اکسی‌توسین به روش فاز جامد و انجام ارزیابی‌های فیزیکی‌شیمیایی بود. تلاش شد نتایج

¹⁸ Sigma-Aldrich

¹⁹ Dichloromethane

²⁰ N,N-Dimethyl formamide

²¹ Diethyl ether

²² Trifluoroacetic acid

²³ Triethylsilane

²⁴ Piperidine

²⁵ Ammonium hydroxide

²⁶ Merck, Germany

²⁷ Milli-Q, Millipore, USA

⁹ Magnocellular

¹⁰ supraoptic nucleus

¹¹ paraventricular nucleus

¹² Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

¹³ Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)

¹⁴ O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate

¹⁵ N,N-Diisopropylethylamine

¹⁶ Rink Amide-MBHA Resin

¹⁷ GL Biochem

اتصال دومین اسیدآمینه به زنجیره در حال رشد

پس از تأیید آزاد بودن گروه آمینی رزین با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی کایزر، مرحله اتصال دومین اسیدآمینه توالی اکسی‌توسین آغاز شد [۱۹]. اسیدآمینه محافظت‌شده در دی‌متیل‌فرم‌آمید حل شد و معرف فعال‌ساز HATU همراه با باز آلی دی‌ایزوپروپیل‌اتیل‌آمین به‌صورت جداگانه در دی‌متیل‌فرم‌آمید تهیه گردید. این مخلوط، حدواسط فعال O- (آزاینوترازول-۱-یل)-استر^{۲۸}، را تشکیل داد؛ گونه‌ای که از نظر واکنش‌پذیری یکی از مؤثرترین فعال‌کننده‌ها در سنتز فاز جامد پپتید محسوب می‌شود [۱۲، ۱۱]. حدواسط فعال شده بلافاصله به رزین متورم منتقل گردید و تحت هم‌زدن اوربیتالی قرار گرفت. پس از اتمام واکنش، رزین چند مرحله با دی‌کلرومتان شسته شد. آزمون کایزر عدم وجود گروه آمینی آزاد را نشان داد و تکمیل واکنش کوپلینگ تأیید گردید. در مرحله بعد، کپینگ برای غیرفعال‌سازی گروه‌های آمینی واکنش‌نداده و جلوگیری از تشکیل توالی‌های حذف‌شده انجام شد. برای این منظور، مخلوط تازه‌تهیه‌شده انهیدرید استیک/دی‌ایزوپروپیل‌اتیل‌آمین/دی‌متیل‌فرم‌آمید به رزین افزوده شد و پس از آنکوباسیون، رزین شست‌وشو گردید. آزمون نینهیدرین^{۳۱} نبود آمین آزاد را تأیید و کارایی مرحله کپینگ را تثبیت کرد [۱۰]. فرایندهای محافظت زدایی، کوپلینگ^{۳۲} و کپینگ^{۳۳} با همین الگوی واکنش برای تمامی اسیدآمینه‌های توالی اکسی‌توسین تکرار شد تا زنجیره کامل پپتید تشکیل گردد [۱۳]. شرایط انتخاب‌شده با گزارش‌های معتبر سنتز فاز جامد پپتیدهای کوتاه و حلقوی مطابقت دارد و از نظر جلوگیری از راسمیک‌شدن^{۳۴}، کاهش واکنش‌های جانبی و افزایش بازده کوپلینگ بهینه ارزیابی شد.

کنترل کیفیت مراحل کوپلینگ

در طی مراحل مقدماتی توسعه روش، کوپلینگ اسیدهای آمینه در چند اجرای آزمایشی به‌صورت پیوسته با آزمون‌های رنگ‌سنجی کایزر و نینهیدرین پایش شد. در برخی مراحل ابتدایی، تغییرات خفیف در شدت رنگ آزمون‌ها مشاهده شد که نشان‌دهنده کوپلینگ ناکامل و ضرورت اصلاح شرایط واکنش بود. برهمین اساس، نسبت فعال‌ساز به باز، زمان کوپلینگ و شدت

واکنش، با دی‌متیل‌فرم‌آمید شست‌وشو گردید سپس برای انجام فرایند متورم‌سازی رزین که گامی ضروری برای افزایش نفوذپذیری و فراهم شدن دسترسی گروه‌های عاملی است، رزین با دی‌کلرومتان تیمار شد. این مرحله امکان انبساط ماتریکس پلیمری رزین و فراهم‌سازی شرایط مناسب برای آغاز واکنش‌های کوپلینگ را ایجاد کرد.

محافظت زدایی گروه آمینی^{۲۸}

برای فعال‌سازی گروه‌های آمینی رزین و آماده‌سازی آن جهت ورود نخستین اسیدآمینه، حذف گروه محافظ اِف‌موک با استفاده از محلول ۲۵ درصد پایپریدین در دی‌متیل‌فرم‌آمید استفاده گردید. پس از هر مرحله، رزین با دی‌کلرومتان شست‌وشو گردید تا بقایای واکنش حذف شود. مبنای این واکنش، شکست پیوند اورتان و آزادسازی گروه آمینی انتهایی پپتید است؛ مکانیسمی که در سنتز فاز جامد پپتید به‌عنوان مسیر استاندارد شناخته می‌شود [۱۱]. تکمیل محافظت زدایی با آزمون رنگ‌سنجی کایزر تأیید شد. لذا مشاهده رنگ آبی نشان‌دهنده آزاد شدن گروه آمینی و موفقیت فرایند بود [۱۵].

کوپلینگ نخستین اسید آمینه

پس از آزادسازی کامل گروه آمینی رزین، فرایند اتصال نخستین اسیدآمینه یعنی گلیسین آغاز شد. برای این منظور، مشتق محافظت‌شده اِف‌موک-گلیسین^{۲۹} در حلال دی‌متیل‌فرم‌آمید حل گردید و سامانه فعال‌ساز شامل HATU و باز آلی دی‌ایزوپروپیل‌اتیل‌آمین با نسبت بهینه (۲/۵ : ۲/۵ : ۴) تهیه شد [۱۰]. این ترکیب یکی از کارآمدترین سامانه‌های فعال‌سازی در سنتز فاز جامد بوده و موجب افزایش سرعت اتصال، کاهش واکنش‌های جانبی و جلوگیری از تشکیل توالی‌های ناقص می‌شود [۲۱، ۱۳]. پس از فعال‌سازی کامل اسیدآمینه و تشکیل حدواسط واکنش‌پذیر، محلول حاصل به رزین متورم‌شده افزوده شد و فرایند کوپلینگ به مدت ۹۰ دقیقه در دمای محیط ادامه یافت. در پایان واکنش، آزمون کایزر مجدداً انجام شد تا آزاد نبودن گروه آمینی و تکمیل واکنش اتصال تأیید گردد.

³² Coupling

³³ Capping

³⁴ Racemization

²⁸ Deprotection

²⁹ Fmoc-Gly-OH

³⁰ (OAT-ester)

³¹ Chloranil

رسوب‌دهی

فیلترات تغلیظ‌شده، تحت خلأ کاهش‌یافته و در حضور اتر سرد (با نسبت ۸:۱) رسوب‌دهی شد. رسوب تشکیل‌شده پس از دو بار شست‌وشو با اتر سرد، در خلأ خشک گردید و پتید خام با رنگ سفید مایل به کرم به‌دست آمد. این روش یکی از استاندارترین مراحل حذف ناخالصی‌های محلول در تریفلوئوراستیک‌اسید و جداسازی اولیه پتید است [۲۱].

خالص‌سازی نهایی

پتید خام پس از تشکیل پیوند دی‌سولفیدی، توسط کروماتوگرافی فاز معکوس در مقیاس پرپراتیو^{۳۹} خالص‌سازی شد. جداسازی بر اساس اختلاف قطبیت زنجیره پتیدی و زمان‌های بازداری میان ترکیبات انجام گرفت. فراکشن‌های حاوی پیک اصلی^{۴۰} جمع‌آوری، تغلیظ و سپس در فریزدرایر خشک شدند. این مرحله موجب حذف مؤثر ناخالصی‌های فرایندی، غیرکامل‌های کوپلینگ و محصولات جانبی اکسیداسیون شد و پتید خالص اولیه با بازده قابل‌قبول حاصل گردید می‌شود [۱۱، ۱۰].

آنالیز و ارزیابی کیفیت محصول

نتایج تعیین خلوص نهایی

برای ارزیابی خلوص نهایی و تأیید ساختار پتید سنتز شده، بخشی از نمونه لیوفیلیزه‌شده جهت آنالیز کروماتوگرافی آماده گردید و آزمون روی دستگاه کروماتوگرافی تحلیلی مدل دیتاپکس^{۴۱} انجام گرفت. جداسازی کروماتوگرافیک با استفاده از ستون فاز معکوس C۱۸ (۵ میکرومتر، ۲۵۰ میلی متر، ۴/۶) و فازهای متحرک شامل ۰/۱ درصد تریفلوئوراستیک‌اسید در آب فاز (الف) و ۰/۱ درصد تریفلوئوراستیک‌اسید در استونیتریل فاز (ب) صورت گرفت. برنامه گرادیانی فاز (ب) از ۲۵ تا ۴۵ درصد طی ۲۰ دقیقه، با نرخ جریان ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه و آشکارسازی در طول موج ۲۲۰ نانومتر اعمال شد (نمودارهای ۴-۱). خلوص نهایی نمونه از طریق نرمال‌سازی سطح پیک‌ها ۹۹/۶ درصد تعیین شد که بیانگر کیفیت دارویی محصول است می‌شود [۲۳، ۲۲].

شست‌وشوی رزین به‌صورت مرحله‌ای تنظیم شد. نسخه نهایی پروتکل، حاصل این اصلاحات تدریجی بوده و همان نسخه‌ای است که در سنتز نهایی و تنها سنتزی که برای ارزیابی‌های کروماتوگرافی و طیف‌سنجی استفاده شد به‌کار گرفته شد.

شست و شوی نهایی رزین

پس از حذف آخرین گروه محافظ اف‌موک، رزین به‌طور کامل با دی‌متیل‌فرم‌آمید و دی‌کلرومتان طی دو چرخه متوالی شسته شد تا آثار باز آلی و محصولات جانبی مرحله دپروتکشن حذف گردد. سپس شست‌وشوی تکمیلی با متانول انجام شد و رزین تحت خلأ ملایم خشک گردید. رزین خشک‌شده بدون باقی‌مانده حلال، آماده ورود به مرحله برش^{۳۵} و محافظت زدایی نهایی شد [۱۱].

برش پتید از رزین و حذف گروه‌های محافظ

برای جداسازی پتید از رزین، مخلوط (تریفلوئوراستیک‌اسید/تری‌اتیل‌سیلان/آب/متانول)^{۳۶} استفاده شد. مخلوط برای ۶۰ دقیقه روی یخ و سپس ۶۰ دقیقه در دمای محیط با رزین تماس داده شد تا هم جداسازی پیوند آمیدی و هم حذف کامل محافظ‌های جانبی انجام گیرد. پس از پایان واکنش، محلول از طریق فیلتراسیون جدا شد و محلول حاوی پتید خام جمع‌آوری گردید [۱۲، ۱۰].

تشکیل پیوند دی‌سولفیدی

پتید خام پس از تبخیر تریفلوئوراستیک‌اسید، در آب دی‌یونیزه حل شد و pH سامانه با آمونیاک^{۳۷} تا حدود ۸ تنظیم گردید. محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد تا اکسیداسیون ملایم باقی‌مانده‌های سیستئینی و تشکیل پیوند دی‌سولفیدی به‌طور کامل انجام شود. واکنش اکسیداسیون در شرایط قلیایی کنترل‌شده به‌عنوان یکی از معتبرترین روش‌ها جهت جلوگیری از اکسیداسیون بیش از حد یا تشکیل ایزومرهای نادرست گزارش شده است [۲۱، ۲۰، ۱۰، ۴]. پس از تکمیل فرایند، محلول یا تحت خلأ تغلیظ شد یا با روش فریزدرایینگ^{۳۸} خشک و پودر نهایی جمع‌آوری گردید.

³⁹ RP-HPLC

⁴⁰ major peak

⁴¹ Analytical-HPLC (Date Apex)

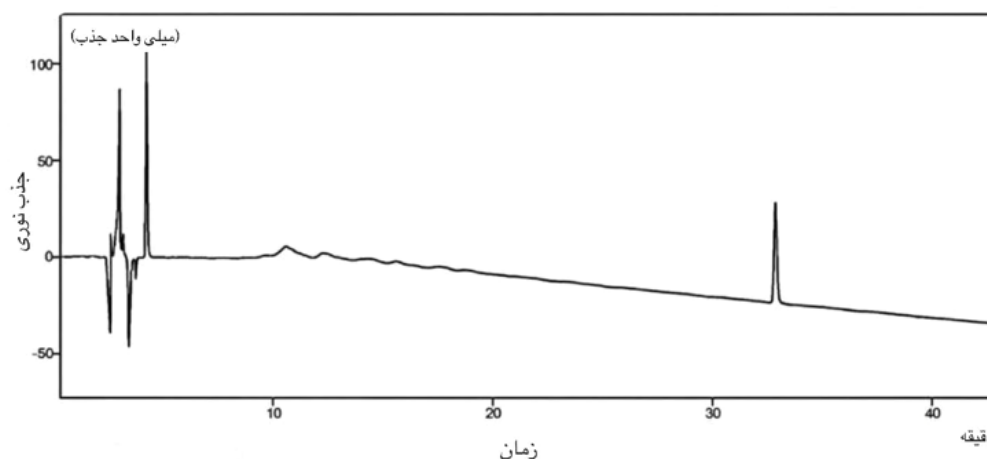
⁴² (4/6 × 250 mm, 5 μm)

³⁵ Cutting or cleavage stage

³⁶ TFA/TES/H₂O/MeOH

³⁷ Ammonia solution (NH₄OH)

³⁸ Freeze-drying, Lyophilization



نمودار ۱- کروماتوگرام حاصل از آنالیز معکوس، مربوط به نمونه اکسی‌توسین سنتز شده. نبود پیک‌های جانبی قابل‌ملاحظه و سطح بالای تفکیک کروماتوگرافی نشان‌دهنده خلوص بسیار مطلوب نمونه و کارایی مناسب مراحل سنتز، حلقه‌سازی دی‌سولفیدی و خالص‌سازی نهایی می‌باشد.

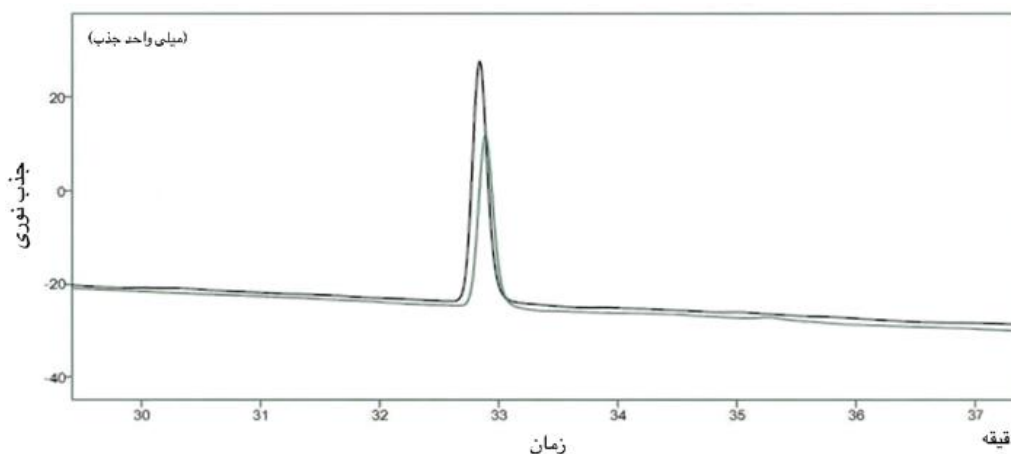
نتایج تعیین طیف‌سنجی جرمی

به‌منظور تأیید هویت مولکول و صحت تشکیل ساختار حلقوی و پیوند دی‌سولفیدی، آزمون طیف‌سنجی جرمی با یونش الکترواسپری در حالت مثبت انجام شد (نمودار ۴).

نتایج آزمون اندوتوکسین

برای بررسی ایمنی میکروبیولوژیک و عدم آلودگی محصول

به اندوتوکسین‌های باکتریایی، آزمون LAL^{43} به روش ژل کلات انجام شد. نمونه بدون رقت و رقت ۱:۱۰۰ همراه با کنترل مثبت و منفی انکوبه گردید. مطابق (شکل ۱) عدم تشکیل ژل پایدار در هر دو رقت، بیانگر منفی بودن آزمون اندوتوکسین بود. مقدار اندوتوکسین به‌صورت کیفی (کمتر از ۰/۲۵ واحد اندوتوکسین در هر میلی‌لیتر) برآورد شد که کمتر از حد مجاز دارویی برای اکسی‌توسین^{۴۴} است [۱۷، ۱۸].



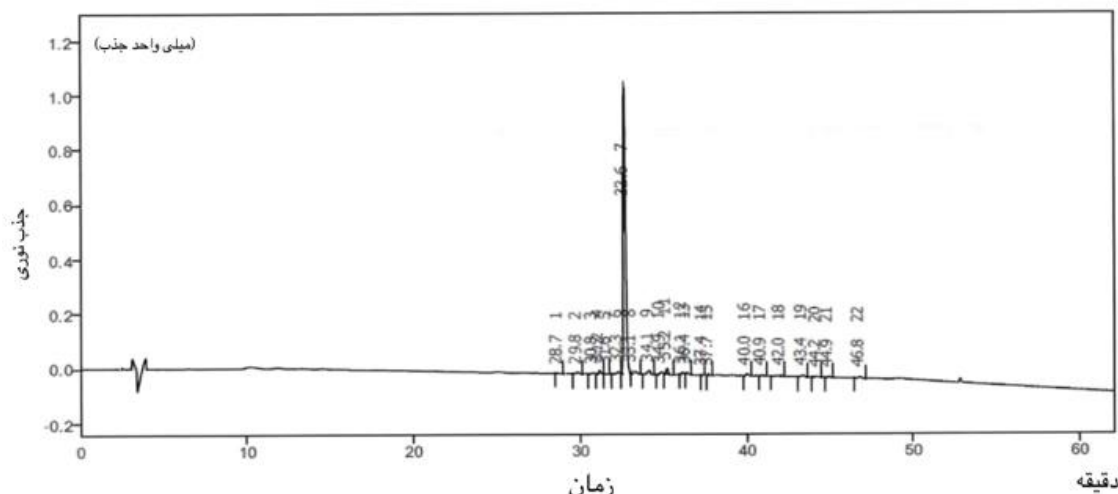
نمودار ۲- مقایسه‌ی کروماتوگرام نمونه سنتز شده اکسی‌توسین با استاندارد دارویی. پیک مشاهده‌شده در زمان بازدارداری حدود ۳۳ دقیقه، مربوط به اکسی‌توسین است و به‌طور هم‌پوشان^{۴۵} بین نمونه سنتز شده و استاندارد نشان داده شده است. انطباق پروفایل‌های کروماتوگرافی، مشابهت هندسه پیک، و هم‌زمانی دقیق^{۴۶} بیانگر یگانگی ساختاری و عدم حضور ناخالصی‌های قابل تشخیص در محدوده روش تحلیلی است. پیک مربوط به نمونه سنتزی در هنگام عبور از دکتور جمع‌آوری شد تا برای آنالیزهای تکمیلی طیف سنجی جرمی مورد استفاده قرار گیرد. اختلاف ناچیز در شدت جذب ناشی از تفاوت غلظتی و شرایط تزریق بوده و تأثیری بر تأیید ماهیت و خلوص ندارد.

⁴⁵ overlay

⁴⁶ retention time

⁴³ *Limulus polyphemus*

⁴⁴ (NMT 10 EU/mg)



نمودار ۳- داده‌های حاصل نشان داد که پپتید سنتز شده دارای یک پیک غالب با زمان بازداری ۳۲/۶ دقیقه است که تطابق کامل با استاندارد مرجع اکسی‌توسین (۳۲/۵۹ دقیقه) دارد و نبود پیک‌های فرعی با شدت قابل توجه مؤید آن است که مسیر بهینه‌شده سنتز قادر بوده ناخالصی‌های معمول از جمله محصولات ناکامل جفت‌سازی، حذف ناقص گروه‌های محافظ، و محصولات فرعی اکسیداسیون یا دامیداسیون را به‌طور کامل حذف کند. این نتایج به‌طور قطعی کارایی شرایط بهینه‌سازی شده را در دستیابی به اکسی‌توسین با خلوص بالا تأیید می‌کند.

نتایج آزمون کایزر و کلرانیل

به‌منظور ارزیابی کامل بودن مراحل جفت کردن و دپروتکشن در فرآیند سنتز پپتیدی به روش فاز جامد، آزمون‌های کیفی نین‌هیدرین و کلرانیل به‌عنوان دو شاخص معتبر پایش واکنش مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون کایزر، مبتنی بر واکنش نین‌هیدرین با آمین‌های آزاد، در تمامی سیکل‌های رشد زنجیره هیچ‌گونه رنگ‌زایی بنفش/آبی نشان نداد و الگوی رنگ زرد پایدار بیانگر تکمیل کامل مراحل جفت کردن بود. به‌صورت مکمل، آزمون کلرانیل نیز بدون ایجاد هرگونه تغییر رنگ انجام شد که نشان‌دهنده حذف کامل گروه اف موک و عدم حضور آمین‌های ثانویه واکنش نداده بود [۲۱-۱۹]. هم‌گرایی نتایج این دو آزمون، صحت کامل واکنش‌های کوپلینگ و دپروتکشن و نبود هرگونه زنجیره ناقص را تأیید کرد.

نتایج بررسی ظاهر فیزیکی و انحلال پذیری

محصول لیوفیلیزه شده به‌صورت پودر یکنواخت سفید مایل به کرم با ویژگی‌های کاملاً منطبق مشاهده شد. عدم تجمع و رطوبت سطحی بیانگر حذف کامل حلال‌ها و تشکیل فاز آمورف پایدار است. نمونه در ویال‌های محافظ نور و دمای ۲-۸ درجه

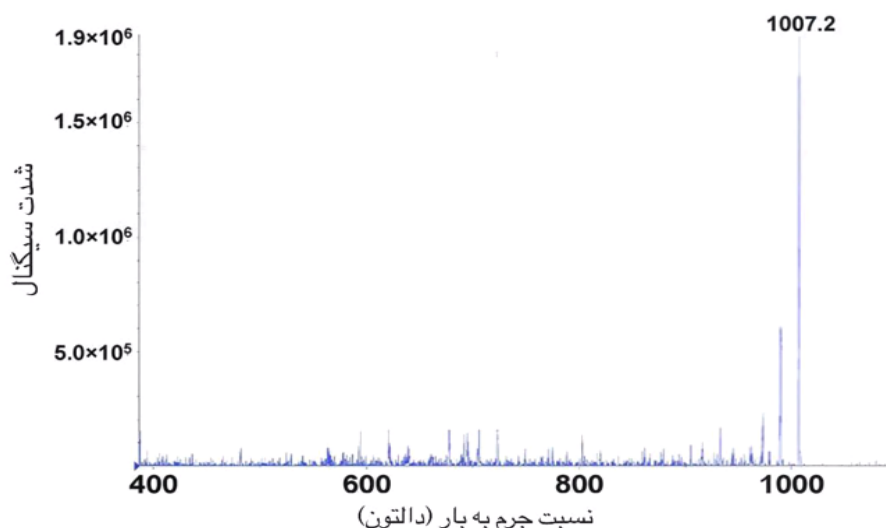
سانتی‌گراد نگهداری شد همچنین پپتید در آب و بافر فسفات محدوده pH ۷/۴ طی کمتر از یک دقیقه کاملاً حل شد، اما در متانول انحلال ناقص داشت. انحلال‌پذیری بالا در محیط‌های آبی مؤید خلوص مناسب، عدم تجمع پپتیدی و حفظ ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی اکسی‌توسین است [۲۴].

یافته‌ها

سنتز اکسی‌توسین به روش فاز جامد بر روی رزین رینک امید با کارایی کامل انجام شد و محصول خام فاقد هرگونه شواهد مربوط به ناقص ماندن مراحل کوپلینگ یا دپروتکسیون بود. اکسیداسیون کنترل شده در pH حدود ۸ منجر به تشکیل صحیح پیوند دی‌سولفیدی^{۴۷} شد و هیچ‌گونه محصول جانبی ناشی از اکسیداسیون بیش از حد^{۴۸} یا جفت شدن‌های نادرست مشاهده نگردید. ارزیابی کروماتوگرافیک تحلیلی، حضور یک پیک منفرد با زمان بازداری ۳۲/۶ دقیقه و خلوص ۹۹/۶ درصد را نشان داد که با استاندارد مرجع دارویی کاملاً مطابقت داشت. طیف‌سنجی جرمی نیز پیک غالب ۱۰۰۷/۲ را ثبت کرد که برابر با جرم مولکولی تئوریک اکسی‌توسین بوده و صحت تشکیل ساختار حلقوی و نبود توالی‌های حذف شده را تأیید کرد. اندازه‌گیری

^{۴۷} Cys^۱-Cys^۶

^{۴۸} over-oxidation



نمودار ۴- آنالیز جرمی با استفاده از دستگاه بروکر^{۴۹} در مد یونش مثبت انجام شد و داده‌ها در بازه فوق جمع‌آوری گردید. جرم مولکولی تتوریک اکسی‌توسین بر اساس فرمول مولکولی^{۵۰} برابر با (۱۰۰۷/۱۹ دالتون) محاسبه شد و طیف به‌دست‌آمده با این مقدار مورد مقایسه قرار گرفت. در طیف ثبت‌شده، پیک غالب در (۱۰۰۷/۲ دالتون) مشاهده گردید که تطابق کامل با جرم مولکولی تتوریک دارد. این انطباق دقیق نشان‌دهنده تشکیل صحیح مولکول هدف بوده و بیان می‌کند که در طول مراحل سنتز، کلوژ، اکسیداسیون و خالص‌سازی، هیچ حذف اسیدآمینه، شکست پیوند یا باقی‌مانده محافظتی رخ نداده است. حضور تنها یک سیگنال قوی مربوط به یون تک‌باری +۱ و عدم مشاهده یون‌های چندبارباری در محدوده ۵۰۰-۷۰۰ (نسبت جرم به حجم) نیز سازگاری ساختاری و پایداری مولکول در شرایط یونش را تأیید می‌کند. شدت بالای سیگنال اصلی ($10^6 \times 1/9$) در مقایسه با نویز زمینه و نبود پیک‌های فرعی قابل‌توجه، نشان‌دهنده خلوص جرمی بالا و نبود گونه‌های جانبی نظیر پپتیدهای ناقص یا فرم‌های احیاشده می‌باشد. به‌ویژه، فقدان پیک‌های متناظر با فرم‌های غیراکسیدشده یا نیمه‌اکسیدشده سیستمین (جرم‌های کمتر از ۱۰۰۷ دالتون) بیان می‌کند که فرآیند اکسیداسیون کنترل‌شده موجب تشکیل کامل و پایدار پیوند دی‌سولفیدی شده است. طیف جرمی به‌دست‌آمده با گزارش‌های معتبر پیشین نیز سازگاری کامل دارد. پهنای محدود پیک و نسبت بالای سیگنال به نویز نیز مؤید یکنواختی جرمی و کیفیت مناسب محصول نهایی است [۱۶].

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که اجرای پروتکل اصلاح‌شده سنتز فاز جامد با راهبرد محافظتی اف‌موک قادر است هورمون اکسی‌توسین را با خلوص دارویی و یکنواختی ساختاری بسیار بالا تولید کند. دستیابی به خلوص ۹۹/۶ درصد در کروماتوگرافی فاز معکوس همراه با ظهور یک پیک منفرد و نبود هرگونه پیک فرعی، و همچنین انطباق دقیق جرم مشاهده‌شده در طیف‌سنجی جرمی (۱۰۰۷/۲ واحد جرم بر بار) با جرم مولکولی تتوریک (۱۰۰۷/۱۹ دالتون)، نشان می‌دهد که مراحل کلیدی شامل کوپلینگ‌های متوالی، حذف محافظ اف‌موک و تشکیل پیوند دی‌سولفیدی با کارایی بالا و بدون ایجاد توالی‌های ناقص یا فرآورده‌های اکسید شده بیش از حد انجام شده‌اند. چنین الگوی

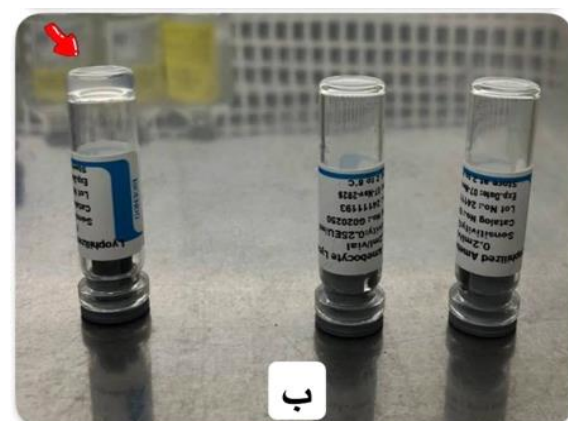
pH محلول آبی ۱ (میلی گرم بر میلی لیتر مقدار $5/2 \pm 0/1$) را در محدوده مورد پذیرش فارماکوپه نشان داد. آزمون اندوتوکسین به روش ژل کلات مقدار کمتر از ۰/۲۵ واحد لندوتوکسین در هر میلی‌لیتر را ثبت کرد. در مجموع، یافته‌ها نشان می‌دهد که فرآیند سنتز، برش، اکسیداسیون و خالص‌سازی تحت شرایط کاملاً کنترل‌شده و بدون آلودگی میکروبی یا لیپولی‌ساکاریدی انجام شده و اکسی‌توسین تولیدشده از نظر خلوص، یکنواختی ساختاری و کیفیت فارماکوپه‌ای قابل اعتماد است. مقایسه نتایج نشان می‌دهد که محصول سنتز شده، در سطح برابر یا حتی بالاتر از نمونه‌های صنعتی و تحقیقاتی گزارش‌شده قرار دارد و پتانسیل استفاده در مطالعات فیزیولوژیک، نورولندوکرین و ارزیابی‌های مرتبط با ژن گیرنده اکسی‌توسین^{۵۱} را دارا است.

⁴⁹ Bruker Daltonics

⁵⁰ $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$

⁵¹ OXTR

مطالعه، خلوص نهایی در پژوهش حاضر بالاتر بوده و هیچ‌یک از پیک‌های فرعی متناظر با فرم‌های نیمه‌اکسیدشده یا بدون حلقه مشاهده نگردید. این تفاوت نشان می‌دهد که تنظیم دقیق زمان کوپلینگ، نسبت فعال‌سازی و روش کنترل‌شده اکسیداسیون، اثر عملی و قابل اندازه‌گیری بر کاهش فرآورده‌های ناخواسته داشته است. از دیدگاه فارماکولوژیک، دستیابی به اکسی‌توسین با خلوص بالا پیش‌نیاز اساسی برای مطالعات گیرنده‌ای، بررسی پاسخ‌های نورواندوکرین و آزمون‌های وابسته به مسیرهای پیام‌رسانی است. وجود ناخالصی‌ها در مقادیر کمتر از دو درصد می‌تواند با اختلال در اتصال به گیرنده، ایجاد پاسخ‌های کاذب یا کاهش پایداری مولکول همراه باشد [۳]. مقدار pH نهایی (۵/۲) که در محدوده دارونامه‌ای قرار دارد، نشان‌دهنده حذف مؤثر باقی‌مانده‌های اسیدی و پایداری ساختاری مولکول در محیط آبی است. نتیجه منفی آزمون اندوتوکسین (کمتر از ۰/۲۵ واحد اندوتوکسین در هر میلی‌لیتر) نیز ثابت می‌کند که محصول فاقد آلودگی‌های لیپوپلی‌ساکاریدی بوده و پتانسیل استفاده در مطالعات سلولی و جانوری را دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اصلاح زمان واکنش‌ها، بهینه‌سازی نسبت فعال‌ساز و باز و تنظیم شرایط اکسیداسیون، بهبود قابل‌توجهی در فرآیند ایجاد کرده و نشانه‌ای از بهینه‌سازی موفق در سطح فرایندی است. هرچند تنها یک سری سنتز جهت ارزیابی نهایی انجام شد، اما تطابق کامل داده‌ها با استانداردهای داروسازی و نمونه‌های مرجع نشان می‌دهد که این روش از قابلیت بازتولید و انتقال به مقیاس بزرگ‌تر برخوردار است. انجام سنتز در چند دسته مستقل می‌تواند گام بعدی برای تثبیت این مسیر در تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی پپتیدهای حلقوی و گونه‌های پایدارتر مانند کاربتوسین باشد. لازم به ذکر است که نسخه نهایی پروتکل ارائه‌شده در این پژوهش حاصل مجموعه‌ای از اصلاحات مرحله‌ای است که بر اساس آزمون‌های کیفی رنگ‌سنجی، ارزیابی کارایی کوپلینگ و بازیابی مراحل محافظت‌زدایی در چندین اجرای مقدماتی انجام شد. در این مراحل اولیه، بروز نشانه‌هایی از کوپلینگ ناکامل در آزمون‌های کایزر و کلرانیل مشاهده شد که نشان‌دهنده ضرورت اصلاح نسبت فعال‌ساز به باز، زمان کوپلینگ و شرایط شست‌وشو بود. اعمال این اصلاحات به‌صورت تدریجی و مبتنی بر داده‌های تجربی، منجر به حذف کامل اشکال واکنش‌نداده، افزایش بازده کوپلینگ و دستیابی به خلوص بالا در سنتز نهایی گردید. این



شکل ۱- نتایج آزمون اندوتوکسین به روش ژل کلات. (الف) نمای ویال‌ها پس از انکوباسیون شامل: ویال ۱، کنترل مثبت (تشکیل ژل پایدار)، ویال ۲، کنترل منفی (فاقد ژل)، ویال ۳، نمونه بدون رقت (فاقد ژل)، ویال ۴، نمونه با رقت ۱:۱۰۰ (فاقد ژل). عدم تشکیل ژل پایدار در نمونه بدون رقت و نمونه رقیق شده بیانگر منفی بودن آزمون اندوتوکسین است. (ب) نمای بزرگ شده از ویال‌ها پس از آزمون وارونه‌سازی که تشکیل ژل پایدار و عدم جریان پذیری محتویات در ویال کنترل مثبت (مشخص شده با پیکان قرمز) را نشان می‌دهد و صحت عملکرد آزمون را تأیید می‌کند.

جرمی تنها در شرایطی حاصل می‌شود که نسبت فعال‌ساز به باز، زمان واکنش و کیفیت شست‌وشوی رزین به‌صورت هدفمند تنظیم شده باشد؛ موضوعی که با گزارش‌های معتبر در افزایش بازده کوپلینگ توسط HATU و کاهش واکنش‌های جانبی هم‌خوانی دارد [۹، ۱۱]. کاربرد اکسیداسیون ملایم در pH حدود ۸ و اجتناب از عوامل اکسیدکننده قوی نیز موجب تشکیل انتخابی پیوند دی‌سولفیدی و حذف کامل گونه‌های ناصحیح شد؛ روندی که با گزارش (سان^{۵۲} و همکاران) درباره بهبود تاخوردگی^{۵۳} شیمیایی اکسی‌توسین مطابقت دارد [۴]. در مقایسه با همان

53 Folding

52 Sun

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری و پشتیبانی مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران در فراهم‌سازی امکانات آزمایشگاهی و همراهی فنی در مراحل انجام آزمایش‌ها قدردانی می‌شود. همچنین راهنمایی‌های علمی اساتید گرامی در طراحی، اجرای مراحل پژوهش و تفسیر نتایج نیز مورد تقدیر است.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش هیچ گونه ملاحظات اخلاقی صورت نگرفته است.

ملاحظات مالی

این پژوهش بخشی از طرح به شماره (۱۴۰۳/۵/۲۹۰/۲۵۰۲۱) انستیتو پاستور ایران و پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد آقای مهندس مجتبی بیژنی از دانشگاه علوم تحقیقات می باشد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

م.ب.: نگارش و انجام مطالعه؛ م.ب.: آنالیز داده‌ها؛ ه.ک.: ایده و طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ ح.ع.: مشاوره علمی.

اظهارنامه

در روند تهیه این مقاله، ابزارهای هوش مصنوعی تنها برای بهبود نگارش نسخه اولیه و ویرایش زبانی به‌صورت محدود به‌کار گرفته شده‌اند. هیچ‌گونه تولید داده، تحلیل علمی یا استنتاج پژوهشی توسط این ابزارها انجام نشده و تمامی مسئولیت علمی و محتوایی مقاله بر عهده نویسندگان است.

فهرست منابع

- [1] Neumann ID, Jurek B, The oxytocin receptor: from intracellular signaling to behavior. *Physiol Rev* 98 (2018) 1805-1908.

روند مرحله‌ای با گزارش‌های معتبر در زمینه بهینه‌سازی سنتز فاز جامد پپتیدهای حلقوی هم‌راستا است و تأیید می‌کند که پروتکل نهایی یک نسخه اصلاح‌شده و بهبودیافته از اجرای پایه است، نه یک سنتز منفرد بدون کنترل پارامتری.

محدودیت های پژوهش

سنتز نهایی تنها یک‌بار به‌صورت کامل و تحت شرایط بهینه انجام شد. اگرچه چندین اجرای مقدماتی برای تنظیم زمان کوپلینگ، نسبت فعال‌ساز/باز و شرایط اکسیداسیون انجام گرفت. محدودیت منابع و ماهیت فرایند مانع از انجام تکرارهای مستقل شد؛ از این‌رو ارزیابی این مطالعه در سطح بهینه‌سازی فرایندی تفسیر می‌شود و انجام سنتز در چند بچ مستقل برای بررسی تکرارپذیری و تحلیل کمی در مطالعات آینده ضروری است. با وجود این، انطباق کامل داده‌های نهایی با معیارهای فارماکوپه و نبود هرگونه محصول جانبی قابل تشخیص، مؤید کارایی اصلاحات اعمال‌شده است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که اصلاحات مرحله‌ای در سنتز فاز جامد اکسی‌توسین، موجب بهبود معنادار کارایی فرایند شد. حذف کامل سیگنال‌های کوپلینگ ناکامل، تشکیل انتخابی پیوند دی‌سولفیدی و کاهش محسوس پیک‌های فرعی در کروماتوگرافی، صحت این بهبود را تأیید کرد. محصول نهایی با خلوص ۹۹/۶ درصد، جرم کاملاً منطبق با مقدار تئوریک و بازده حدود ۶۹/۸ درصد به‌دست آمد که نسبت به گزارش‌های پیشین نشانگر کاهش واکنش‌های جانبی و افزایش کارایی است. همچنین کاهش زمان کل سنتز از حدود ۸۰ به ۶۸ ساعت، بیانگر ارتقای راندمان بدون افت کیفیت بود. مجموعه این نتایج نشان می‌دهد که پروتکل ارائه‌شده یک نسخه اصلاح‌شده که پتانسیل نیازمند مطالعه مستقل، پایدار و قابل‌اتکا برای تولید اکسی‌توسین و سایر پپتیدهای حلقوی است.

- [2] Carter CS, Oxytocin pathways and the evolution of human behavior. *Annu Rev Psychol* 65 (2014) 17-39.
- [3] Stoop R, Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76 (2012) 142-159.
- [4] Sun P, Tang W, Huang Y, Hu B-H, Improved Fmoc solid-phase peptide synthesis of oxytocin with high bioactivity.

- Synlett* 28 (2017) 1780-1784.
- [5] Ludwig M, Leng G, Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci* 7 (2006) 126-136.
- [6] Burbach JPH, Young LJ, Russell J, Oxytocin: synthesis, secretion, and reproductive functions. In: Neill JD, ed, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Elsevier; 2006: 3055-3128.
- [7] Neumann ID, Landgraf R, Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, stress regulation and social behavior. *Trends Neurosci* 35 (2012) 649-657.
- [8] Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M, Oxytocin and human social behavior. *Nat Neurosci* 15 (2011) 681-687.
- [9] Merrifield RB, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 85 (1963) 2149-2154.
- [10] Chan W, White P, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Oxford: **OUP**; 1999: 1-250.
- [11] Fields GB, Noble RL, Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 35 (1990) 161-214.
- [12] Albericio F, Orthogonal protecting groups for N α -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers* 55 (2000) 123-139.
- [13] Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J, Subra G, Methods and protocols of modern solid-phase peptide synthesis. *Mol Biotechnol* 33 (2006) 239-254.
- [14] Pawlas J, Billing J, Tebikachew B, Wahlström L, Haugaard-Kedström LM, A sustainable approach to ϵ -Lys branched GLP-1 analogs. *Org Process Res Dev* (2025) in press.
- [15] Suzuki R, Konno H, Stain protocol for detection of N-terminal amino groups during solid-phase peptide synthesis. *Org Lett* 22 (2020) 3309-3312.
- [16] Atouf F, USP standards for cell-based therapies. In: Galli C, et al., eds, *Cell Therapy: cGMP Facilities and Manufacturing*. Springer; 2021: 589-608.
- [17] Levin J, The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Johns Hopkins Hosp Bull* 115 (1964) 265-274.
- [18] Williams KL, Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation. *Boca Raton*: CRC Press; 2007: 1-350.
- [19] Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook P, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 34 (1970) 595-598.
- [20] Kremismayr T, Muttenthaler M, Fmoc solid-phase peptide synthesis of oxytocin and analogues. In: Ivell R, Russell J, eds, *Oxytocin: Methods and Protocols*. New York: Springer; 2021: 175-199.
- [21] Coin I, Beyermann M, Bienert M, Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat Protoc* 2 (2007) 3247-3256.
- [22] Guzmán F, Aróstica M, Román T, Beltrán D, Gauna A, Albericio F, Cárdenas C. Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electron J Biotechnol*. 2023 Jul 1;64:27-33.
- [23] Bugyi F, Tóth G, Kovács KB, Drahoš L, Turiák L. Comparison of solid-phase extraction methods for efficient purification of phosphopeptides with low sample amounts. *J Chromatogr A*. 2022 Dec 6;1685:463597.
- [24] Elder D, ICH Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products (chemical substances). In: Elder D, ed, *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*. Hoboken: Wiley, 2017: 433-466.

Research paper

Optimization of the chemical synthesis of oxytocin

Mojtaba Bijani¹, Hossein Attar¹, Hooman Kaghazian^{2*}

1. Department of Chemical Engineering–Biotechnology, Faculty of Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 23 November 2025

Accepted: 14 December 2025

Abstract

Background and Aim: Oxytocin is a cyclic nonapeptide containing a single intramolecular disulfide bond and plays a key regulatory role in physiological processes, including uterine contraction, lactation, and hypothalamic pituitary adrenal axis activity. Due to its structural sensitivity and short half-life, achieving highly pure and pharmaceutically acceptable synthetic oxytocin requires rigorous and optimized peptide synthesis strategies. The aim of this study was to optimize the solid-phase chemical synthesis of oxytocin and to evaluate the physicochemical quality attributes of the final product.

Methods: Peptide assembly was performed on Rink amide resin using HATU as the coupling reagent and N,N-diisopropylethylamine as the organic base. Following chain elongation, the peptide was cleaved from the resin using a trifluoroacetic acid/triethylsilane/water mixture. The intramolecular disulfide bond between Cys¹ and Cys⁶ was formed under controlled alkaline conditions at pH≈8. Crude material was purified by preparative reversed-phase chromatography. Final analyses included analytical RP-HPLC, electrospray ionization mass spectrometry, pH measurement, endotoxin testing, and visual inspection.

Results: The synthesized peptide exhibited a purity of 99.6%, a single sharp chromatographic peak, and a molecular mass fully consistent with the theoretical value. Mass spectrometry showed a dominant ion at m/z 1007.2 ([M+H]⁺). The measured pH of a 1 mg/mL solution was 5.2 ± 0.1. Endotoxin levels were below 0.25 EU/mL, confirming microbiological safety and the absence of pyrogenic contaminants. Collectively, these findings demonstrate that the optimized process produced oxytocin with correct disulfide cyclization, structural integrity, and pharmaceutical-grade purity.

Conclusion: Stepwise optimization of the solid-phase synthesis, specifically adjusting the activator/base ratio, extending coupling times, and employing mild controlled oxidation, resulted in high-purity oxytocin with a yield of 69.8% and accurate molecular mass. Shortening the total process time from 80 to 68 hours indicates improved efficiency without compromising quality. The final protocol represents a refined and reliable method with reproducibility and scalability suitable for research and semi-industrial peptide production.

Keywords: Optimization; Protein synthesis; Solid phase; Oxytocin hormone.

Please cite this article as follows:

Bijani M, Attar H, Kaghazian H, Optimization of the chemical synthesis of oxytocin. *Iran J Physiol Pharmacol* 9 (2025) 145-155.

*Corresponding au thors: Kaghazianh@pasteur.ac.ir (ORCID: 0000-0003-4301-3381)