اندازه گیری همزمان ویتامین A و E به روشReversed Phase HPLC

محمدحسین اعرابی[۱]، دکتر محمود جلالی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به نقش آنتی اکسیدانی و خواص حفاظتی ویتامین‌های A و E در مقابل سرطان ارزیابی آنها از اهمیت بالایی برخوردار است. اندازه‌گیری این ویتامین‌ها نیاز به روش‌های دقیق و قابل اعتمادی دارد، لذا به منظور اندازه‌گیری دقیق همزمان ویتامین A و E با دستگاه HPLC، این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش Exploratory survey انجام گرفت. پس از استخراج و آماده سازی نمونه سرمی، ۵۰ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه HPLC تزریق شد. روش اندازه‌گیری به روش کروماتوگرافی فاز معکوس با آشکار ساز (دتکتور) UV و ستون Super Pacpep-S با سرعت جریان (Flow rate) ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه و فاز متحرک متانول ۹۵ درصد و مدت زمان آزمایش ۱۵ دقیقه بود. زمان بازداری، درصد تغییرپذیری، تکرارپذیری، تاثیر زمان و نیز میزان بازیافت ویتامین ها اندازه گیری شد.

یافته‌ها: ویتامین A، رتینیل استات (استاندارد داخلی) و ویتامین E به ترتیب در محدوده زمانی ۳/٤، ٤/۷ و ۱۱/۵ دقیقه از ستون خارج شدند. حد تشخیص دستگاه برای ویتامین A حدود ۲۵ng/ml و برای ویتامین E حدود ۱µg/ml بود. بازیافت ویتامین A و E به ترتیب ۷۸/۲ و ۹۰/۸ درصد بود.

نتیجه‌گیری: اندازه‌گیری ویتامین A و E به روش HPLC همراه با تغییراتی در روش‌های قبلی، روشی عملی در بالا بردن کیفیت اندازه‌گیری آنها به ویژه قسمت بازیافت ویتامین‌ها است. انجام پژوهش‌های دیگر برای بالا بردن کیفیت اندازه‌گیری ویتامین‌های A و E توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: اندازه‌گیری، ویتامین A، ویتامین E، HPLC

۱- گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]

مقدمه

ویتامین‌های A و E اثرات بیولوژیک متعددی دارند و اهمیت آنها روز به روز آشکارتر می‌گردد (۱). از جمله نقش‌های این دو ویتامین که در سلامت بدن حیاتی است عمل حفاظتی در مقابل رادیکال‌های آزاد یا به عبارت دیگر نقش آنتی‌اکسیدانی این دو ویتامین است (۳ و ۲) به طوری که کمبود این ویتامین‌ها احتمال بروز اختلالاتی مثل سرطان، بیماری‌های قلب و عروق و عفونت‌ها را بیشتر می‌کند و میزان این ویتامین‌ها در بیماری‌های متعدد دستخوش تغییر می‌گردد (٦ و ٥ و ٤ و ٢)، لذا اندازه گیری همزمان این دو ویتامین بیش از پیش اهمیت پیدا کرده است.

در این راستا روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری غلظت ویتامین A و E در سرم و سایر مایعات بیولوژیک ابداع شده است که از آن جمله می‌توان روش رنگ سنجی و فلوری‌متری نام برد (۸ و ۷). این روش‌ها معمولاً وقت‌گیر هستند و از حساسیت و دقت کمی برخوردار هستند. با ابداع روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی HPLC اندازه‌گیری این ویتامین‌ها دقیق‌تر و حساس‌تر شده است (۱۰ و ۹). با توجه به اینکه این ویتامین مورد توجه خاص پژوهش‌گران و متخصصان بالینی است، اهمیت راه‌اندازی روشی آسان و دقیق در اندازه‌گیری آنها دو چندان می‌شود، لذا به منظور راه‌اندازی روش اندازه‌گیری دقیق و همزمان ویتامین A و E با تغییرات در روش‌های قبلی روش جدیدی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش Exploratory survey انجام گرفت. پژوهش حاضر به روش تجربی بر روی نمونه خون افراد مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون تهران انجام شد.

چون ویتامین های A و E در مایعات بیولوژیک به ویژه در تماس با نور و هوا ناپایدار هستند، (۱۱) بنابراین تمام نمونه‌های سرم در لوله‌های سرپوشیده و با پوشش تیره نگهداری شد. فضای خالی لوله به وسیله جریان گاز نیتروژن پر شد، و نمونه‌ها تا هنگام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲۰۰ میکرولیتر سرم به یک لوله پلی پروپیلینی ۲ میلی‌لیتری درب‌دار ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر استاندارد داخلی (رتینیل استات)، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول و ۲۰۰میکرولیتر متانول به سرم اضافه شد. پس از ۱۰ ثانیه ورتکس، ۵۰۰ میکرولیتر هگزان به آن اضافه شد و مجدداً به مدت ٦٠ ثانیه ورتکس شد. سپس مخلوط در زمان ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. در مرحله بعد فاز رویی کنار گذاشته شد. مجدداً ۵۰۰ میکرولیتر هگزان به مخلوط اضافه شد و به مدت ٦٠ ثانیه ورتکس شد و مشابه مرحله قبل فاز رویی جدا شد، آنگاه مجموع فازهای رویی در دمای ٤٥ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد تحت گاز نیتروژن تبخیر شد تا فاز هگزنی کاملا خشک شود. به قسمت خشک شده ۲۰۰ میکرولیتر متانول اضافه و حل شد و ۵۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد.

متد HPLC

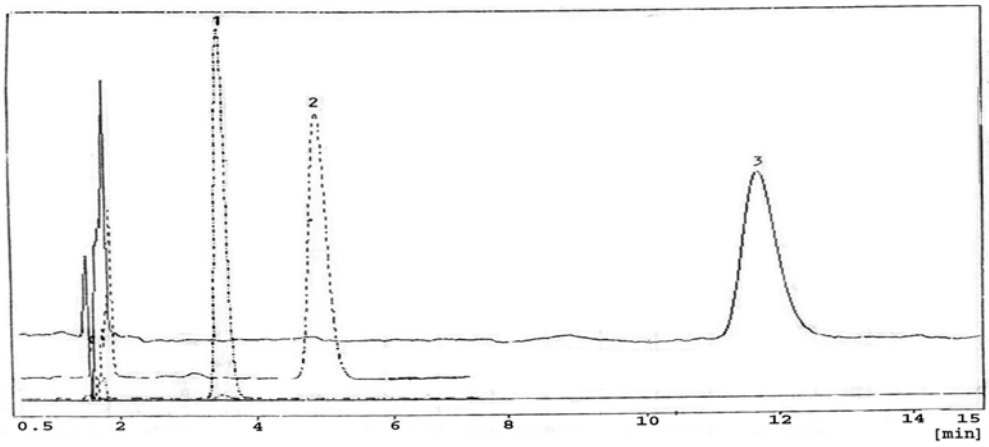
این روش بر اساس کروماتوگرافی با فاز معکوس است. مواد مورد نیاز شامل Retinol all trans، α توکوفرول، ترانس رتینیل استات، متانول، اتانول و n هگزان مخصوص HPLC بود. سیستم HPLC مورد استفاده از نوع Pharmacia, LKB با آشکار ساز مدل ۲۲٤۱ از نوع multi wave length, UV

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]

و ستون به کار رفته از نوع Super pac pep-s با سرعت زمان آزمایش (RUN) ۱۵ دقیقه و میزان تزریق ۵۰ میکرولیتر بود. طول موج انتخابی از شروع آزمایش تا ۷دقیقه ۳۲۵ نانومتر و از ۷ تا ۱۵۰ دقیقه ۲۹۲ نانومتر بود. پس از پایان جداسازی ویتامین‌ها و ترسیم کروماتوگرام توسط نرم‌افزارهای HPLC manager و Nelson به محاسبات و تفسیر منحنی اقدام گردید. زمان بازداری (Retention time)، درصد تغییرپذیری [ضریب تغییرات (Coeffieient of Variation) با ۱۰ تکرار] میزان جذب، تکرارپذیری(Reliability) در یک روز و ٤ روز متوالی و تأثیر زمان روی تغییر غلظت ویتامین‌ها تعیین گردید.

یافته‌ها

پس از تزریق استانداردهای ویتامن A ، رتینیل استات و α توکوفرول به طور جداگانه، زمان بازداری (Retention time) هرکدام در کروماتوگرام شماره ۱ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که به ترتیب در محدوده ۳/٤، ٤/۷، ۱۱/۵ دقیقه است.



کروماتوگرام ۱

منحنی های مربوط به تزریق، استانداردهای خالص ویتامین A (۱) رتینول استات (۲) ویتامین E (۳)

شرایط: ستون C2/C18 - سرعت عبور فاز متحرک m1/min ۱/۵

میزان تزریق U1 ۵ آشکارساز UV-Visible ، طول موج برای ویتامین A رتینول استات، ۳۲۵نانومتر و برای ویتامین E ۲۹۲ نانومتر

درصد تغییرپذیری پس از تزریق مکرر هرکدام از ویتامین ها، در جدول ۱ ارایه گردیده است و نشان می‌دهد که تکرارپذیری رتینول و ترینیل استات بیشتر از α توکوفرول است

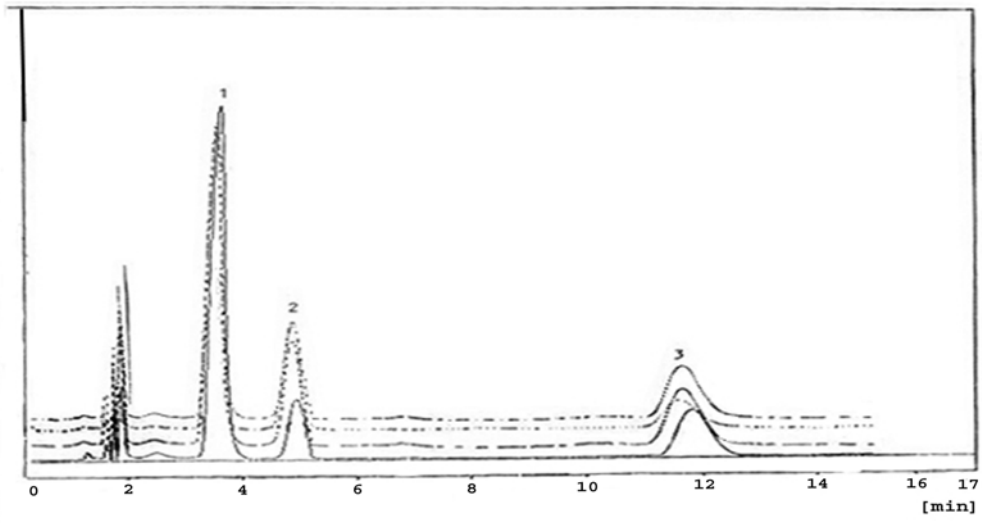
جدول ۱- تکرارپذیری زمان بازداری ویتامین A ، رتینیل استات، ویتامین E

زمان بازداری / نمونه ها	زمان (± انحراف معیار) (دقیقه)	دامنه تغییرات (دقیقه)	درصد* CV
ویتامین A	۳/٤۷ ± ٪۳۵	۳/٤۳ – ۳/۵۲	۱
رتینیل استات	٤/۸٦ ± ٪۵۳	٤/۸۲ –٤/۹۹	۱/۱
ویتامین E	۱۱/۹۵ ± ٪۲۷	۱۱/٦۵ –۱۲/۷	۲/۲٦

* ضریب تغییرات (coefficient of variation)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]

پس از تزریق سرم آماده‌سازی شده به دستگاه مشاهده شد که منحنی‌هایی در محدوده زمان بازداری (RT) استانداردها ایجاد می‌شود (کروماتوگرام شماره ۲).



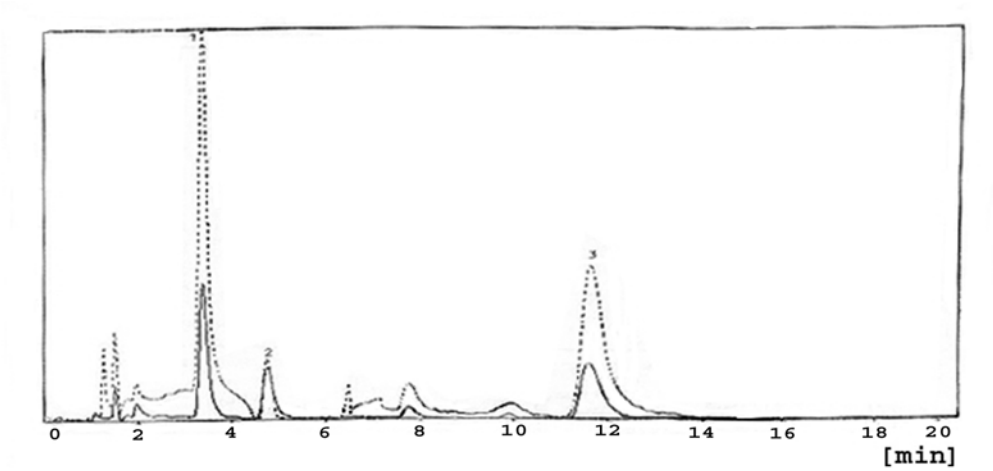
کروماتوگرام۲

منحنی های استاندارد مخلوط حاصل از ۴ تزریق مکرر منحنی ها ۱ـ ویتامین A ۲ـ رتینول استات ۳ـ ویتامین E

شرایط: ستون C2/C18 ـ سرعت عبور فاز متحرک ml/min ۱/۵

میزان تزریق Ul. ۵ ـ آشکارساز UV-Visible ، طول موج ۷ دقیقه اول ۳۲۵ نانومتر و از دقیقه ۷ به بعد ۲۹۲ نانومتر

برای اطمینان از این تناسب استاندارد ویتامین A و E به نمونه سرم اضافه شد و منحنی آن با حالت قبل مقایسه شد که در کروماتوگرام شماره ۳ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که میزان جذب ویتامین A و E افزایش چشمگیری داشته است.



کروماتوگرام ۳ـ مقایسه منحنی های حاصل از تزریق سرم و استاندارد مخلوط افزوده شده به سرم منحنی

(۱) ویتامین A ، (۲) رتینول استات (۳) ویتامین E خط ممتد: سرم

خط منقطع: سرم + استاندارد مخلوط شرایط: ستون = C2/C18 سرعت عبور فاز متحرک ml/min ۱/۵ـ میزان تزریق ۵۰ Ul

آشکارساز: UV-Visible طول موج تا ۷ دقیقه، ۳۲۵نانومتر، بعد از ۷ دقیقه ۲۹۲ نانومتر

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]

در تعیین حداقل حساسیت (Limit-Detection) دستگاه برای ویتامین A و E مشخص شد که آخرین حد آشکارسازی برای ویتامین A حدود ۲۵ng/ml و برای ویتامین E حدود ۱ug/ml است. پس از بررسی تمام شرایط، عمل کالیبراسیون برای هر کدام در غلظت های مختلف استاندارد در محیط سرمی انجام شد. تکرارپذیری غلظت ویتامین A و E در سرم طی یک روز و ٤روز متوالی در جدول شماره ۲ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که غلظت ویتامین‌ها در طی زمان‌ها و تکرارها قابل قبول بوده است و اختلاف آنها به لحاظ آماری معنی‌دار نیست.

جدول ۲- دقت و تکرارپذیری غلظت ویتامین های A و E به تفکیک یک روز و چهار رو

ویتامین ها / زمان های بررسی / تکرارپذیری		میزان	دامنه تغییرات	ضریب تغییرات (درصد)
A	یک روز (N=٥)	٦٩/٧٦ ±٠/٩٤(μg/dl)	٦٨/٢٥-٧١/٠٧ (μg/dl)	١/٣
	چهار روز (N=٤)	٦٩/٨±١/٣١(μg/dl)	٦٨/٧-٧١/٨٢ (μg/dl)	١/٩
E	یک روز (N=٥)	١٠/٢±٠/٧١(μg/dl)	٩/٣٥ -١١/٣ (μg/dl)	٦/٩
	چهار روز (N=٤)	٩/٧١±٠/٩٢(μg/dl)	٨/٦٥-١١/١(μg/dl)	٩/٤

تأثیر مدت زمان روی تغییرات غلظت ویتامین در جدول شماره ۳ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که غلظت ویتامین A تا ٦٠ دقیقه تغییر محسوسی ندارد اما ویتامین E در این مدت کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد .

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]

جدول ۳ـ تغییرات غلظت ویتامین‌های A و E در طی زمان

زمان (دقیقه)	غلظت ویتامین A (μg/dl)	غلظت ویتامین E (μg/dl)
۰	۰/٤٥۰	۷/۱۵
۲۰	۰/٤٤۷	٦/۲۱
٦۰	۰/٤٤۱	۵/٦۹
	*۰/٤٤٦±۰/۰۰٤٦ ۱= درصد CV **	*٦/۳۵±۰/۷٤ CV =۱۱/٦ درصد

* میانگین ± انحراف معیار ** ضریب تغییرات

میزان بازیافت به سرمی که غلظت ویتامین A و E آن دقیقاً مشخص شده بود مقداری معین ویتامین A و رتینیل استات و ویتامین E اضافه شد. پس از مراحل استخراج و آماده‌سازی نمونه به دستگاه تزریق شد. این عمل چندین بار تکرار شد. نتایج در جدول شماره ٤ ارائه گردید و نشان می‌دهد که میزان بازیافت ویتامین A برابر ۷/۸ ± ۷۸/۲ و میزان بازیافت ویتامین E برابر ۱۱/۳ ± ۹۰/۷۷ بود.

جدول ٤ ـ میزان بازیافت و درصد خطاهای ویتامین های A و E

شماره تزریق	ویتامین E (ug/ml)			ویتامین A (ug/dl)		
	مقدار مشاهده شده	درصد خطا	درصد بازیافت	مقدار مشاهده شده	درصد خطا	درصد بازیافت
۱	۸/۰۱	-۰/۲	۱۰۰/۲	۲٦/۳	۲۰/۸	۷۹/۲۲
۲	٦/۲۳	۵/٦	۹٤/٤	۲۸/۲۲	۱٤/٤۹	۸۵/۵۱
۳	۵/۱۳	۲۲/۳	۷۷/۷	۲۳/۱	۳۰/۱	٦۹/۹
جمع (میانگین ± انحراف معیار)	۹۰/۷۷±۱۱/۳			۷۸/۲۱ ±۷/۸		

بحث

تحقیق نشان داد که راه‌اندازی و اندازه‌گیری هم‌زمان ویتامین A و E به روش Reverse phase HPLC مقدور است. تاکنون انواع روش‌های مختلف HPLC برای اندازه‌گیری ویتامین A و E به صورت منفرد و یا هم‌زمان ابداع شده است (۱۵ و ۱٤ و ۱۳ و ۱۲ و ۹) در بررسی و مطالعه روش‌های مختلف روش Cuesta Sanz (۹) به دلیل سادگی و کارآیی نسبتاً مناسب به عنوان اساس روش اندازه‌گیری انتخاب شد. اما تغییراتی در آن روش نیز انجام شد که شامل:

الف) ستون: **ستون مورد استفاده دارای ماتریکس C2/C18 بود که برای اولین بار از این ستون جهت اندازه گیری ویتامین A و E استفاده شد. از مزایای این ستون جداسازی بسیار عالی و عدم تداخل مواد با یکدیگر و هم‌چنین تکرارپذیری عالی آن است.**

ب) تغییر طول موج: **طول موج انتخابی برای رتینول و رتینیل استات ۳٤۰ نانومتر و برای α توکوفرول ۲۸۰ نانومتر بود. اما پس از بررسی λmax در طول موج‌های مختلف، در سیستم دتکتور ما مشخص شد که رتینول در طول موج ۳۲۵ نانومتر و α توکوفرول در ۲۹۲ نانومتر بیشترین جذب را دارد.**

ج) تغییر در روش استخراج : **در روش قبلی (۹) عمل استخراج یک بار و با افزودن ۱ میلی لیتر هگزان انجام شد اما با توجه به اینکه هرچه مرحله استخراج بیشتر شود مقدار بازیافت ویتامین ها بیشتر است (۱٦) ما در دو مرحله استخراج، ۱ میلی لیتر هگزان اضافه نمودیم که مقدار بازیافت به طور قابل توجهی افزایش یافت.**

هم‌چنین دور سانتریفوژ ۱۰۰۰ دور در دقیقه پیشنهاد شده بود که بنا به تجربه مشاهده شد که در دور

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]

۱۵۰۰ جدا شدن فازها از همه بهتر و آسانتر است. درصد بازیافت ما در مقایسه با روش cuesta sanz کمی اختلاف دارد، به طوری که درصد بازیافت ویتامین A کمتر از روش فوق (۷۲/۲۸ درصد در مقابل ۱۰۳/۱ درصد) ولی در مورد ویتامین E درصد بازیافت کمی بیشتر (۹۰/۸ درصد در مقابل ۹۰/۲ درصد) بود.

تکرارپذیری ما نیز با روش آنها تفاوت اندکی داشت، به طوری که درصد تغییرپذیری ویتامین A در یک روز در روش ما بهتر بود (۱/۳٤ در مقابل ۱/۸۵) ولی در مورد ویتامین E تکرارپذیری ما کمتر از روش قبل بود (۲/۸٤ در مقابل پپ۶/۹) که شاید مهم‌ترین دلیل آن طولانی بودن زمان جداسازی ویتامین E باشد.

در یک جمع‌بندی به نظر می رسد که سنجش هم‌زمان ویتامین A و E عملی است و از نظر کیفیت اندازه‌گیری به ویژه در زمینه بازیافت نسبت به روش‌های متعارف قابل قبول می‌باشد. انجام پژوهش‌های دیگر برای استخراج و اندازه‌گیری ویتامین A و E در مایعات بیولوژیک دیگر و هم‌چنین ارتقاء کیفیت آزمایش توصیه می‌شود.

References:

1- Eitenmiller R-R. Vitamins in human health and Disease. Trends in food science & technology 1997; 8 (6): 317.
2- Meagher Emma A. Antioxidant vitamin and atherosclerotic vascular Disease. ACC Current Journal . 1999; 8 (5): 22.
3- Fang YZ, Yang SWu G. Free radicals, antioxidant and nutrition 2002, 18(10): 872-9
4- Dutta A, Dutta S K. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosisand Carcinogensis: 2003; 22(4): 528-68.
5- Kimminck GG, Bell Ra, Bosick RM. Vitamin E and breast cancer. Nutr Cancer 1997; 27(2): 109-17.
6- Stephensen CB. Vitamin A infection and immune function. Annu Rev Nutr. 2001; 21: 167-192.
7- Henry JR, In clinical chemistry principles and techniques. Harper and Row publisher 1964
8- McCromick DB, Wright Lemvel D. Vitamin and Coenzyme: methods in enzymology. 1980 Vol 67 part F.
9- Cuesta Sanz D, Santa Gruz M.C: Simultaneous measurement of retinonl and α tocopherol in human serum by high performance liquid chromatography with ultraviolet Detection, J. chromatog 1986: 380, 140-4,
10- Calias S. Ruberto Bonia F: Determination of vitamin A vitamin E and their esters. J Pharm Sci Apr1995; 84(4).
11- Packer L. Retinoids molecular and metabolic aspects. methods in enzymology. 1990 Vol 98 part A
12- Browne RW, Armstrong D. Simultaneous determination of serum retinol, tocopherols, and carotenoids by HPLC. Methods Mol Biol. 1998; 108: 269-75
13- Abahusain MA, Wright J, Dickerson JW, de Vol EB. Retinol , alpha-tocopherol and carotenoids in diabetes. Eur J Clin Nutr. 1999 Aug ; 53(8): 630-5.
14- Lee BL, New AL, Ong CN. Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinal, and major carotenoids in human plasma. Clin Chem. 2003 49(12): 2056-66
15- Weinmann AR, Oliveira MS, Jorge SM, Martins AR. Simultaneous high- performance liquid chromatographic determination of retinol by fluorometry and of tocopherol by ultraviolet absorbance in the serum of newborns. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. Jun 1999; 729 (1-2): 231-6
16- Zamman Z, Filden P & Frost P.G. Simultaneous determination of vitamin A and E and carotenoids in plasma by Reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects, Clin Chem, 1993; 39,10,2229-34.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04]