بکارگیری کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) همراه با شناسایی توسط دتکتور فلوریمتری برای اندازه گیری میزان رتینول شیر مادر

حمیدرضا فلاحت پیشه، کارشناس ارشد بیوشیمی و مسئول آزمایشگاه HPCL
اعظم غروی نوری، کارشناس شیمی و کارشناس آزمایشگاه

Application Of Hight Performance Liquid Chromatography With Spectrofluorimetric Detection For Determination Of Human Milk Retinol

ABSTRACT

World health organization has introduced Concentration of vitamin A in Breast milk as a proper indicator for characterization of vitamin A deficiency in lactating mothers and their infants (<6 mo).

A normal phase high performance liquid chromatography with spectrofluorometric detection as a specific and sensitive detector was used for characterization of all-trans retinol from 13-Cis retinol.

The method was sensitive (0.009 ppm) and accurate (1±0.054 μ mol/l) and had a good recovery percentage (99.36%). This method was more better than before methods and was compatible with the other useful methods. Effect of freezing and defreezing on all-trans retinol content of milk sample was investigated. The result was interesting, whatever all-trans retinol content was bigger, it's destroying was bigger too. Because of that reseon, day today reproducibility wasn't good. Standard of retinol was 95% all-trans and pure so we should use this method because two retinol isomers wasn't separated from each other by reversed phase chromatography and UV detection.

***Key words:* Determination, all-trans retinol, HPLC, Specrofluoromemetric detection.**

چکیده

سازمان جهانی بهداشت برای تشخیص کمبود ویتامین A در مادران شیرده و کودکان شیرخوار (زیر ۶ ماهه)، اندازه گیری ویتامین A در شیر مادر را به عنوان یک شناساگر مناسب در کنار سایر شناساگرها معرفی نموده است.

در روش ارائه شده که مبتنی بر کروماتوگرافی مایعی با کارکرد بالا می باشد سعی شد روشی دقیق، حساس تر و مناسب تر از نظر انجام اندازه گیریهای کمی ویتامین A بکار برده شود بنابراین روش شناسایی اسپکتروفلوریمتریک به جای روش UV-Vis بکار برده شد. همچنین برای شناسایی و جداسازی دوایزومر ۱۳-سیس و all-trans رتینول از ستون با فاز نرمال استفاده شده است.

روش فوق دقیق و تکرارپذیر بود (۱±۰/۰۵۴ µmol/l) دارای حساسیت یا حد شناسایی بسیار عالی (۰/۰۰۹ ppm) بوده و درصد بازیافت نیز در حد ۹۹/۳۶ درصد بود که در مقایسه با روشهای قبلی بسیار کارآمدتر و در مقایسه با روشهای مشابه دیگر کاملاً قابل مقایسه و رقابت نشان می داد. همچنین اثر فریز و دفریز کردن متوالی نمونه های شیر بر روی میزان رتینول all-trans بررسی گردید که مشاهده شد هرچه میزان رتینول all-trans در نمونه شیر بیشتر باشد بیشتر در اثر این پدیده تخریب و یا به ایزومر ۱۳ سیسی رتینول تبدیل می شود و همین مشکل باعث کاهش تکرارپذیری روز به روز اندازه گیری ویتامین A می شد.

به هر حال بکارگیری این روش با توجه با اینکه استاندارد رتینول خالص استفاده شده تقریباً ۹۵ درصد all-trans بود ضروری به نظر می رسید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-03]

مقدمه

نزدیک به سه دهه از شناخته شدن کمبود ویتامین A به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی مهم جوامع می گذرد (١). سازمان جهانی بهداشت، میزان رتینول شیر مادر را به عنوان یکی از شناساگرهای بررسی وضعیت تغذیه ای ویتامین A در مادران شیرده و نوزادان شیرخوار (کمتر از ۶ ماهه) مطرح کرده است (٢).

با توجه به مزایای نسبی این نشانگر نسبت به سایر شناساگرها (میزان رتینول سرم، CIC, MRDR, RDR) این سازمان توصیه نموده است که چنانچه امکانات لازم وجود دارد پژوهشگران تعیین میزان رتینول شیر مادر را در مناطقی که احتمال کمبود در آنها بیشتر است در برنامه کاری خود قرار بدهند (١، ٣، ۴). عمده ترین روش تعیین ویتامین A تا سال ١٩٧٠ روش کالریمتریک کاپراس بود که توسط AOAC برای تعیین ویتامین A در غذاها توصیه شده است. اساس این روش مبتنی بر تشکیل یک کمپلکس آبی رنگ بین رتینول و آنتیموان تری کلراید یا تری فلوئورواستیک اسید در کلروفورم و سپس اندازه گیری در ۶٢٠ نانومتر می باشد (۵). روش فوق چندان اختصاصی و دقیق نبوده و بسیار زمان بر می باشد و علاوه بر آن معرفهای شیمیایی آن خطرناک و سرطانزا می باشند بنابراین امروزه دیگر چندان مورد توجه قرار نمی گیرد. بهترین راه تعیین رتینول امروزه استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا است و با وجودی که روشهای گوناگونی مبتنی بر این تکنیک ارائه شده اما تقریباً همگی آنها در اصول مشترک هستند (١). در مواردی که جداسازی ایزومرهای رتینول چندان مهم نیست ستون کروماتوگرافی با فاز معکوس برای جداسازی رتینول مورد استفاده عبارت است از رتینول all-trans با خلوص ۹۵ درصد، بنابراین هدف ما تعیین ایزومر all-trans رتینول در شیر مادر بود و روش فوق برای دستیابی به این هدف طراحی شده است.

مواد و روشها

مطالعه انجام شده از نوع بررسی آزمایشگاهی بوده که در زمستان سال ١٣٧٨ و در محل آزمایشگاهی بیوشیمی تغذیه انستیتو تحقیقاتی تغذیه و صنایع غذایی کشور انجام شده است. ابزار استفاده شده عبارتند از:

١- دستگاه HPCL (ساخت شرکت واترز آمریکا- مدل ۵١٠) انژکتور دستی (مدل U6K ساخت واترز آمریکا)، انتگراتور (مدل ٧۴۶ ساخت واترز آمریکا) و ستون با فاز نرمال ساخت شرکت واترز آمریکا (3.9 159 mmk, Resolve Silica, 5m)

٢- اسپکتوفتومتر UV-Vis (مدل ۶٣۵ ساخت شرکت واریان)

٣- سرنگ هامیلتون با حجم نهایی ٢۵ میکرولیتر). حلالها دارای درجه خلوص بسیار بالا (HPLC grade) بوده و مواد جامد همگی ساخت شرکت مرک آلمان و با درجه خلوص بالا بودند. استاندارد رتینول مورد استفاده عبارت بود از رتینول all-trans با خلوص ۹۵ درصد ساخت فلوکا.

جمع آوری نمونه ها

نمونه شیر مادران به مقدار تقریبی ۵cc به ظروف شیشه ای منتقل و بمنظور کاهش تخریب رتینول توسط عوامل محیطی (هوا و نور و حرارت) بلافاصله در بندی و با پوشش کاغذ آلومینیومی به یخدانهای صحرایی و سپس به فریزر $-٢٠^{0}c$ انتقال می یافت. قبل از شروع آزمایش نمونه های شیر به دمای آزمایشگاه انتقال و کاملاً همگن می شد (فاز آب و چربی کاملاً مخلوط می شد).

مراحل استخراج ویتامین A از نمونه های شیر

الف)صابونی کردن

٠/۵Cc از نمونه شیر همگن شده توسط ٣cc محلول اتانولی حاوی ١٠ درصد هیدروکسیدپتاسیم و ٢ درصد پیروگالل در دمای $٧٠^{0}c$ برای ٣٠ دقیقه صابونی شد در طی این مدت هر چند دقیقه این مخلوط هم زده می شد تا عمل صابونی شدن کامل شود. سپس لوله ها با جریان آب خنک و برای حدود ١۵ دقیقه در فریزر $-٢٠^{0}c$ نگهداری شد.

ب) استخراج مایع-مایع

پس مخلوط صابونی شده به نسبت ١ به ١ با آب مقطر حل و رقیق شد و خوب همزده می شد سپس ۵ml از این مخلوط دوبار توسط ۵ml هگزان نرمال حاوی ٠/١ درصد BHT استخراج می گردید. دو بار ٢/۵ میلی لیتر از محلول حاوی رتینول از فاز رویی جدا و در آخر توسط روتاری اواپوراتور در $۴٠^{0}c$ تحت خلاء تبخیر گردید باقی مانده در ٢ml از هگزان حل و سپس ٢٠ میکرولیتر به ستون تزریق می گشت.

شرایط انجام کروماتوگرافی با کارکرد بالا

برای اندازه گیری رتینول شیر مادر از شستشوی ایزوکراتیک با فاز متحرک مخلوط ایزواکتان و ایزوپروپانل با نسبت ٩٩/۵ به ٠/۵

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-03]

استفاده شد. سرعت جریان حلال ml/min ١ بود. طول موج تحریک ٣٢٥ نانومتر و طول موج نشری دتکتور ۴٨٠ نانومتر بود. ضمن آنکه حساسیت انتگراتور (Attenuotion) معادل ٣٢ و فاکتور حساسیت دتکتور (Gain) معادل ١٠٠ بود.

محلول استاندارد

برای تهیه محلول استاندارد به شکل زیر عمل شد:

ابتدا یک محلول با حدود غلظت µgr/ml ١ از رتینول all-trans در اتانل خالص تهیه شد سپس برای تعیین دقیق غلظت رتینول مؤثر با توجه به ضریب E_{1cm} که معادل ٠/١٨٥٠ بود جذب این محلول در ٣٢٥ نانومتر خوانده و غلظت دقیق آن ٠/٨١µgr/ml معادل ٢/٨٣µmol/l رتینول all-trans تعیین گردید تمامی مراحل استخراج در مورد استاندارد هم مثل نمونه انجام می شود.

چگونگی محاسبه غلظت رتینول شیر مادر

برای محاسبه میزان رتینول all-trans در شیر مادر بر حسب میکرومول بر لیتر از روش استاندارد خارجی و با استفاده از فقط یک محلول استاندارد (ژ ٢/٨٣) عمل شد. بعد از تزریق نمونه ها به ستون سطح زیر پیک مربوط به نمونه ثبت و از طریق رابطه زیر غلظت رتینول محاسبه می شد.

$$RF = \frac{\text{غلظت استاندارد بر حسب µmol/l}}{\text{سطح زیر پیک استاندارد}}$$

سطح زیر پیک نمونه مجهول × RF= غلظت نمونه مجهول

نتایج

١-محاسبه درصد بازیافت (%Recacry)

برای این منظور از یک نمونه شیر اولیه و ۶ نمونه شیر بازیافت استفاده کردیم. نمونه های بازیافت هر یک دارای مقادیر مشخصی بر حسب میکروگرم از استاندارد رتینول بودند سپس مراحل استخراج و اندازه گیری هم بر روی نمونه اولیه و هم بر روی بازیافت انجام شد و درصد بازیافت از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

مقادیر درصد بازیافت در طی شش بار اندازه گیری آن بطور متوسط معادل ٩٩/٣۶ درصد تعیین گردید (جدول ١)

جدول شماره ١- نتایج حاصل از ۵ بار آزمایش درصد بازیافت رتینول all-trans

درصد بازیافت	مقدار بازیافت (µgr)شده	مقدار اضافه شده (µgr)	غلظت اولیه µgr/ml
٨٧/٣	٠/٠١٣	٠/٠١۵	٠/٣۵
٩٩/۵	٠/٠٢٩	٠/٠٣	٠/٣۵
١٠١	٠/٠۶	٠/٠۶	٠/٣۵
١٠٢	٠/٠۶	٠/٠۶	٠/٣۵
١٠٧	٠/٠۶	٠/٠۶	٠/٣۵

٢- حساسیت روش- با استفاده از روش رقیق سازی متوالی اقدام به تهیه نمونه های جدید از یک نمونه اولیه نمودیم و سپس با اجرای مراحل اندازه گیری بر روی تمامی آنها آخرین حد قابل شناسایی معادل µmol/l ٠/٠٣ و یا ٠/٠٠٩ ppm تعیین گردید.

٣- تکرارپذیری و دقت روش:

الف) تکرارپذیری در عرض یک روز: برای این منظور از یک نمونه شیر ٧ بار در طول یک روز آزمایش بعمل آمد غلظت رتینول شیر در آن بصورت µmol/l ١±٠/٠۵۴ بود (جدول ٢).

ب) تکرار پذیری روز به روز: برای این منظور در طی ۶ روز متوالی از یک نمونه معین شیر آزمایش بعمل می آمد غلظت رتینول شیر در طی این مدت بصورت µmol/l ٠/٩٣±٠/٢٨ بود (جدول ٢).

جدول شماره ٢- مقایسه تکرارپذیری در طول یک روز و تکرار پذیری روز به روز

	N	X(µmol/l)	SD	RSD%
در طول روز	٧	١	٠/٠٢٧	٢/٧٨
روز به روز	۶	٠/٩٣	٠/١۴	١۵/٠۵

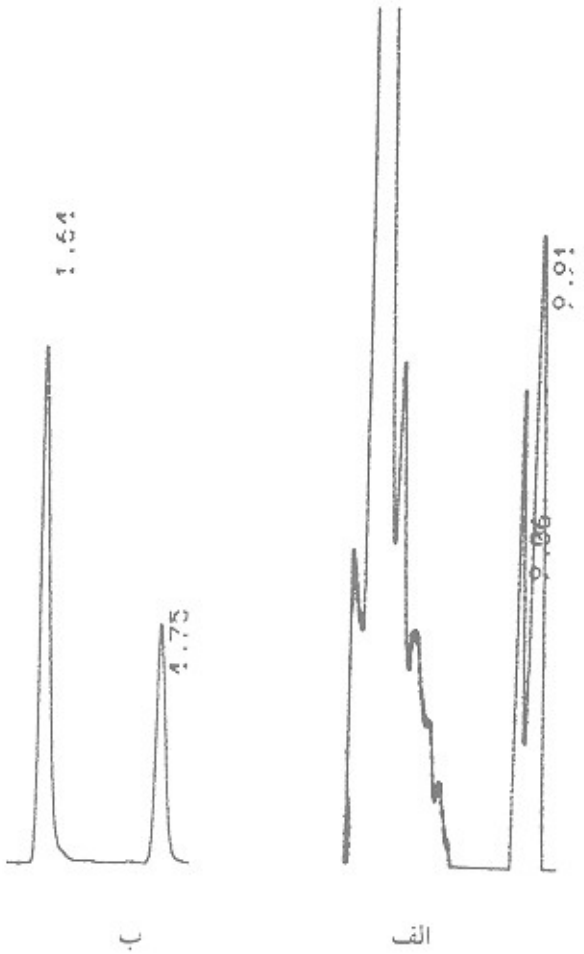
همانگونه که دیده می شود تکرارپذیری جوابها در حالت روز به روز بسیار کمتر از تکرارپذیری در عرض یک روز است.

۴- کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا

با مقایسه کروماتوگرامهای مربوط به استفاده از ستون با فاز نرمال و ستون با فاز معکوس به همراه سیستم شناسایی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-03]

اسپکتروفلوریمتری مشخص شد که پیکهای مربوط به ایزومرهای ١٣- سیس و all-trans رتینول در ستون با فاز نرمال جداشدگی کاملی از خود نشان می دهند که این حالت با استفاده از ستون با فاز معکوس مشاهده نشد (شکل ١).



الف ب

شکل ١) مقایسه کروماتوگرام های HPCL مربوط به دو حالت: الف)ستون با فاز نرمال و سیستم شناسایی اسپکترو فلوئورومتریک. رتینول all-trans (RT=۴/۷۵). ب) ستون فاز معکوس و سیستم شناسائی اسپکتروفلوئورومتریک. رتینول all-trans (RT=۹/۰۶) و رتینول ١٣ سیس (RT=۹/۹١)

همچنین در صورت بکارگیری سیستم شناسایی UV-Vis به همراه ستون با فاز معکوس فقط یک پیک منفرد برای رتینول شناسایی شد که نشان می داد این سیستم برای شناسایی دوایزومر از هم به هیچ وجه مناسب نیست (شکل ٢).

شکل ٢) کروماتوگرام مربوط به آنالیز ویتامین A شیر توسط ستون با فاز معکوس و سیستم شناسایی UV-Vis، رتینول (RT=۴/۵۴)

۵- اثر فریز و در فریز کردن روی میزان رتینول all-trans در شیر مادر

برای این منظور دو نمونه متفاوت از شیر مادر انتخاب شد در نمونه اول غلظت رتینول بسیار زیاد بود (٨/٩۴μmol/l) و نمونه دوم که میزان رتینول آن ١/٢٢μmol/l بود. نتایج حاصله بسیار جالب بود و نشان می داد که نمونه اول که رتینول آن بسیار بیشتر می باشد نسبت به پدیده فریز و دفریز کردن عکس العمل شدیدتری نشان داد و تقریباً بعد از دو بار انجام این عمل میزان رتینول آن تا $\frac{1}{4}$ مقدار اولیه اش کاهش یافت و بعد از آن تقریباً تغییرات آن ثابت ماند اما نمونه دوم که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-03]

میزان رتینول آن بسیار کمتر بود تغییرات اندکی را در طول این مراحل نشان داد (جدول ٣).

جدول ٣- تأثیر فریز و دفریز کردن روی میزان افت رتینول all- trans

دفعات فریز و دفریز کردن	نمونه اول X(n)*	نمونه دوم X(n)
١	٨/٩۴ (١)	---
٢	٣/١٧ (۴)	١/٢٢ (٣)
٣	١/٩٣ (٣)	٠/٩١ (٣)
۴	٢/٣ (۴)	١/٠٢ (٣)
۵	١/۶٩ (٢)	١/٠٧ (٣)

* تعداد دفعات تکرار تزریق به دستگاه HPCL

بحث

صابونی کردن باعث تخریب چربی ها، کلروفیل و دیگر موادی می شود که باعث ایجاد مداخله در جداسازی های کروماتوگرافیک می گردند مرحله استخراج توسط حلال آلی بسیار حساس و مهم است. قبل از آن دقیق سازی توسط آب با محلول نمک در آب انجام می شود تا از تشکیل امولسیون جلوگیری بشود (۵) سپس افزودن حلال آلی برای استخراج بخش غیر صابونی به همراه بخش غیر صابونی نخواهد شد این بسیار مهم است چون در مرحله آخر که تبخیر حلال در اواپوراتور انجام می گیرد. از تبخیر سریع حلال جلوگیری می کند (٧). به همین دلیل اتیل اتر تنها نباید در این مرحله استفاده شود. تامسپون در تحقیقاتش به این نکته اشاره کرده است که مخلوط صابون موجود در اتانول و آب تمایل زیادی به این دارد که مشابه حلال هیدروکربنی عمل نماید که این خود باعث کاهش تمایل ویتامین های محلول در چربی به فاز آلی می شود و در نتیجه باعث کاهش درصد بازیافت خواهد شد. کروماتوگرافی با فاز نرمال یا جذبی در زمانی بکار می رود که جداسازی ایزومرهای رتینول لازم باشد. در پژوهشهای قبلی دیده شده بود که در کروماتوگرافی رتینوئیک اسیدها باید به فاز متحرک مقداری اسید استیک اضافه نمود تا جلو تمایل زیاد رتینوئیک اسید به با فاز ثابت قطبی ستون گرفته شود (۵) در آنالیز انجام گرفته در این آزمایشگاه نیز مشاهده می شد که بعد از ۴ تا ۵ تزریق خط پایه یا Base line کروماتوگرام ها شروع به حرکت صعودی (Drift) می نماید در این حالتها به جای افزودن اسید استیک به فاز متحرک اقدام به شستشوی ستون با بخش قطبی فاز متحرک یعنی ایزوپروپانل خالص برای حدود ۵ دقیقه می نمودیم و سپس دوباره ستون را با فاز متحرک اصلی به تعادل می رساندیم که اشکال برطرف می شد. در اکثر روشها برای اندازه گیری رتینول در شیر خام و یا فرمولهای شیر خشک از ستون با فاز معکوس و سیستم شناسایی UV-Vis استفاده شده است (۶، ۵، ۲). در روش مشابهی که در سال ١٣٧٧ در همین آزمایشگاه اجرا شد از ستون با فاز معکوس Nova pack C18 و دتکتور UV-Vis استفاده گردید در آن روش حساسیت یا حد شناسایی معادل ٠/١μmol/l تعیین گردید که در مقایسه حد شناسایی روش فعلی ٣٠ درصد بیشتر است که این احتمالاً مربوط به بیشتر بودن نسبت ($\frac{Signal}{noise}$) دتکتور فلوریمتری نسبت به دتکتور Uv-Vis می باشد که از این نظر با نتایج بدست آمده در آزمایشگاه پژوهشی شرکت واترز آمریکا در سال ١٩٩۴ همخوانی دارد (٨). همچنین در روش قبلی میزان RSD ۴/٣٣ درصد بوده است که در روش فعلی ٢/٧٨ درصد می باشد که نشان می دهد وضعیت تکرارپذیری آزمایشات نیز بهبود یافته است. اما درصد بازیافت در هر دو روش تقریباً یکسان بود. همچنین با مقایسه تکرارپذیری آزمایشات در طول یک روز و تکرارپذیری روز به روز مشاهده می شود که میزان انحراف از میانگین حالت روز به روز افزایش چشمگیری نسبت به حالت روزانه دارد که این می تواند مرتبط با افت ویتامین A در اثر فریز و دفریز شدن باشد و چون ما فقط از یک ویال برای فریز و دیفریز کردن نمونه استفاده کرده ایم این حالت تشدید شده و باعث کاهش تکرارپذیری در این مورد شده است. بطور کلی استفاده از این روش دارای دو مزیت مهم بود اولاً امکان جداسازی و شناسایی دو ایزومر رتینول بطور کامل فراهم شد و از طرفی چون از هگزان به عنوان حلال نهایی استفاده کرده ایم بدلیل قابل امتزاج بودن زیاد آن با فاز متحرک پیک اولیه حلال را نداریم و این باعث پایداری بالای خط پایه Base line شده و امکان تزریق مقادیر بیشتر نمونه و استفاده از حساسیت های پایین تر (AT بالاتر) را فراهم می آورد بدون آنکه دقت آنالیز دچار خدشه بشود (٨). برای اطمینان بیشتر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-03]

این روش با روش دیگری که توسط یانسن و همکارانش در سال ۱۹۹۴ بر روی شیر تام و با استفاده از دتکتور اسپکتروفلوریمتری و ستون با فاز نرمال انجام شده است مقایسه گردید در روش اشاره شده میزان حداقل شناسایی کمتر از ۰/۰۴ppm، درصد بازیافت حدود ۹۸/۵ درصد و RSD٪ معادل ۳/۶ درصد گزارش شده است که از هر نظر با روش اجرا شده در این آزمایشگاه مطابقت دارد (۹).

نتیجه گیری:

استفاده از روش اجرا شده باعث جدا شدن هر دو ایزومر all-tras و 13-cis رتینول می شود (هر دو ایزومر در شیر مادر وجود دارد) و با توجه به اینکه استاندارد رتینول حاوی بیش از ۹۹ درصد ایزومر all-tras است نسبت به روش قبلی (متون با فاز معکوس و دتکتور w-cis) ارجحیت دارد و توصیه می شود.

منابع

1.Stoltzfus R.J, Underwood B.A, "Breast milk vitamin A as an indicator of vitamin A status of woman and infants". Buletin of WHO, 1995, 73(5): 703-711.

2. Davila M.E, et al. " Vitamin A during lactation" relationship of maternal diet to milk vitamin A status of lactation rats and pups". Joumal of Nutrition, 1985, 115: 1033-1041.

3. Stoltzfus R.J, et al. "Evaluation of indicators for use in vitamin A intervention trials targeted at woman". International Journal of Epidemiology. 1993, 1111-1118.

4. Who, "indicatiors for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programes". Micronutrient series, WHO, Geneva, WHO/Nut/96.10.1996.

5. Eitenmiller R, Landen, W.O, "Vitamin A nalysis for the Health and food sciences". Boca Raton, CRC Press, 1999, 3-66.

6. AOAC International, official Methods of Analysis, Arlington. AOAC International. 16 th ed. 1995.

7. Thompson G, Review: " official methods for measurement of vitamin A, Problems of official methods and new techniques for an analysis of foods and feeds for vitamin A". J. ASSOC. Off. Anal. Chem, 1986, 69: 727.

8. Waters Corpration, "Our investigation include comparisons of UV detection versus fluorescence, normal phase chromatography versus reverse phase. " food and beverage notes. 1994, 6(1): 6-9.

9. Jensen S.K., "Retinol determination in milk by HPLC and fluorescence detection". Journal of dairy research. 1994, 61: 233.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-10-03]