

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
تیمبک‌داری

۱۳۸۰ / ۹ / ۳۰



دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
دانشکده داروسازی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه دکتری داروسازی

موضوع:

بررسی پایداری ویتامین E در نمونه های پلاسمایی
به کمک HPLC

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر محمدرضا اویسی

اساتید مشاور:

سرکار خانم دکتر منان حاجی محمودی

جناب آقای دکتر عبدالعظیم بهفر

015696

۳۴۷۱۰

نگارش:

سمیرا رحیمیان

شماره پایان نامه: ۴۱۹۱

سال تحصیلی: ۱۳۷۹-۸۰

ای خدا ای فضل تو مامت روا	با تو یاد هیچ کس نبود روا
اینقدر ارشاد تو بخشیده ای	تا بدین، بس عیب ما پوشیده ای
قطره ای دانش که بخشیدی زپیش	متصل گردان به دریا های فویش
قطره ای علم است الدر جان من	وار هانش از هوی و (شاک کن

و اکنون که این فصل از زندگی را نیز پشت سر می گذارم، همچون مسافری که در خم جاده برای لحظه ای درنگ کرده، به پشت سر می نگرد، در این مجال کوتاه فصول گذشته زندگی را به سرعت مرور می کنم و به تماشای «نیستی خود» در برابر شکوه و عظمت الطاف بی پایان تو می ایستم. تو که در هر لحظه ای از زندگی به صورتی تازه بر من تجلی می کنی، به صورت فرشته ای در قالب انسانی و با دستان لطیف و مهربانت مرا به سویی که خود می خواهی رهنمون می سازی.

هر روز پریزادی از سوی سراپرده ما را و مریضان را در پرفخ درآورده

مرا چه جای تشکر از کسانی که همه هستی من از آنهاست؟

چه فرصت کوتاهی است برای ستودن آنان و پاس داشتن ذره ای از مهرشان و خاضعانه به پای بوس آنها رفتن.

تو را ستایش می کنم ای یگانه در چهره:

مادر و پدرم: فرشته های نگهبان من که وجودشان اصل همه محبت هاست و ذره ذره وجودم حاصل یک عمر کار سخت، فداکاری و مهربانی بی چشمداشت آنهاست. عمری است که نسیم حضور آنان هر بامداد، از سرزمین مقدس سلام و امنیت خاطر برایم آرامش به ارمغان می آورد.

و خواهرانم: که تبلور معصومیت، صفا و یکرنگی اند. فرشتگانی که شور و شوق زندگی و گرمای وجودشان برایم بشارت دهنده شادی جاودانه و حیات ابدی تو در عالم است.

و همه وابستگانم: که هر یک به رشته مهری مرا به تو پیوند می دهند و همیشه شرمسار محبت های بی دریغ آنان هستم.

و بسیار دوستانم: که اقیانوس مهر و صدق و صفایشان برایم بی انتهاست و چه بسیار هدایایی که از اعماق این اقیانوس از جانب تو دریافت کرده ام.

تو می دانی که همه آنچه دارم از تأثیر نفس معلمان و استادان بزرگواری بوده است که شراب ناب علم را جرعه جرعه به کامم ریخته اند

و هر روز که در کاری موفق شده ام از سوز سینه پیرزنانی بوده است که دعایم گفته اند

و یاری و همراهی هر کس که در هر گوشه ای از فضای مقدس این عالم گری از کارم گشوده است که:

صدها فرشته بوسه بر آن دست می زنند کز کار فلق یک گره بسته واکنند

سپاس ایشان را و تو را

خلاصه:

ویتامین E یک ویتامین محلول در چربی است که در اوایل این قرن طی مطالعات تولید مثل حیوانات کشف شد. این ویتامین به دلیل اثر آنتی اکسیدانی خود دارای نقش گسترده ای در بدن انسان و حیوانات است. در سالهای اخیر توجه به اثرات ویتامین E به ویژه نقش پیشگیری کننده آن از سرطان، افزایش یافته است. مسأله پایداری ویتامین E در نمونه های بیولوژیکی خصوصاً پلاسما که برای مدت طولانی نگهداری می شوند و گاهی سالها بعد از نظر وجود عوامل سرطانزا و یا پیشگیری کننده از سرطان مورد بررسی قرار می گیرند، حائز اهمیت است. برای بررسی پایداری ویتامین E نیاز به تعیین مقدار کمی آن در نمونه های پلاسمایی وجود دارد. یکی از روشهای متداول و بسیار مناسب برای آنالیز ویتامین E، HPLC است.

در این پایان نامه سعی شده است که پایداری ویتامین E در نمونه های پلاسمایی به کمک دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گیرد. به این منظور ابتدا به وسیله هشت رقت متفاوت از ویتامین E در آلبومین، منحنی کالیبراسیون رسم گردید. سپس محلول ویتامین E در چهار غلظت متفاوت در آلبومین تهیه گردید. این محلول ها به دو قسمت تقسیم شدند. یک قسمت در دمای 0°C و قسمت دیگر در دمای 4°C قرار داده شد. به فواصل زمانی دو هفته از نمونه های مربوط به هر دو دما برداشته می شد و استخراج و آنالیز کمی توسط HPLC انجام می گردید. پس از آن شش نمونه پلاسما از افراد سالم نرمال تهیه گردید و در دمای 0°C قرار داده شد. به فواصل زمانی دو هفته، این نمونه ها استخراج گردیدند و غلظت ویتامین E آنها با توجه به سطح زیر منحنی مورد بررسی قرار گرفت.

در پایان مشخص شد که ویتامین E در نمونه های آلبومین و پلاسما که در شرایط فوق قرار داشتند، حداقل به مدت 4 ماه پایدار است.

Abstract:

Vitamin E is a fat soluble vitamin. It was discovered through reproductive studies with animals in the early part of this century. It has a wide role in human and animals because of its antioxidant effect. In recent years, attention to vitamin E effects has been enhanced specially for its role in preventing cancers.

Stability of vitamin E is important in long-term stored plasma samples which may be used after several years for searching carcinogen or cancer-preventing factors. Vitamin E assay and determination in plasma samples is needed for determining its stability. HPLC is one of the suitable current methods for analysis of vitamin E.

Here, we tried to determine the stability of vitamin E in plasma with HPLC. For this purpose, first the calibration curve was obtained, using eight different concentrations of vitamin E in albumin. Then, four different concentrations of vitamin E in albumin were made. These solutions were divided to two portions. One portion was stored in 0°C and the other in 4°C. Each two weeks, all of the four solutions from both temperatures were extracted and analyzed by HPLC. Then six plasma samples were obtained from six normal healthy persons and were placed in 0°C. Each two weeks, these samples were extracted and analyzed by HPLC.

The study showed that vitamin E is stable in albumin and plasma samples which were stored at mentioned conditions, for at least 4 months.

فصل اول

۲	۱-۱) مقدمه
۳	۲-۱) ساختمان شیمیایی و اسامی
۵	۳-۱) خصوصیات فیزیکی شیمیایی
۵	۱-۳-۱) خصوصیات ظاهری و حالیت
۶	۲-۳-۱) خصوصیات نوری
۷	۴-۱) اعمال بیولوژیکی
۹	۵-۱) فعالیت بیولوژیکی
۱۱	۶-۱) منابع غذایی
۱۳	۷-۱) زیست دستیابی ویتامین E
۱۳	۱-۷-۱) جذب روده ای
۱۴	۲-۷-۱) انتقال پلاسمائی
۱۶	۳-۷-۱) توزیع
۱۸	۴-۷-۱) متابولیسم و دفع
۱۸	۸-۱) کمبود ویتامین E
۱۸	۱-۸-۱) سندرم های کمبود در حیوانات
۱۹	۱) جذب مجدد جنینی
۲۰	۲) همولیز اریتروسیت
۲۰	۳) انسفالومالاسیا
۲۱	۴) Exudative diathesis
۲۱	۵) نکروز کبد
۲۲	۶) آتروفی بیضه
۲۲	۷) Necrotizing myopathy

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۲۴	(۲-۸-۱) دلایل کمبود در انسانها
۲۴	(۱-۲-۸-۱) کمبود ویتامین E به دلیل نقایص ژنتیکی در پروتئین ناقل آلفا-توکوفرول (α -TTP)
۲۵	(۲-۲-۸-۱) کمبود ویتامین E به دلیل نقایص ژنتیکی در سنتز لیپوپروتئین
۲۵	(۳-۲-۸-۱) کمبود ویتامین E در نتیجه سندرم های سوء جذب
۲۷	(۴-۲-۸-۱) کمبود ویتامین E در بیمارانی که TPN (Total Parenteral Nutrition) دریافت می کنند
۲۸	(۹-۱) رژیم های کم چربی
۲۹	(۱۰-۱) اختلالاتی که در آنها مکمل ویتامین E می تواند مفید باشد
۲۹	(۱۱-۱) کفایت مقادیر مصرفی ویتامین E
۳۰	(۱۲-۱) اثرات مصرف بالا
۳۱	(۱۳-۱) آنالیز
۳۱	(۱-۱۳-۱) سنجش های بیولوژیکی (Bioassays)
۳۲	(۱-۱-۱۳-۱) سنجش جذب مجدد - بارداری (Resorption-gestation assay)
۳۳	(۲-۱-۱۳-۱) تست همولیز اریتروسیت
۳۴	(۳-۱-۱۳-۱) سنجش نگهداری کبد (Liver - Storage assay)
۳۵	(۲-۱۳-۱) کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC)
۳۶	(۱-۲-۱۳-۱) تکنیک های استخراج ویتامین E برای آنالیز HPLC
۳۷	الف) صابونی کردن
۳۷	ب) استخراج مستقیم با حلال
۴۲	(۱۴-۱) مختصری درباره پایداری ویتامین E

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل دوم
۴۶	۱-۲) کروماتوگرافی
۴۶	۲-۲) HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا)
۴۷	۳-۲) قسمت های مختلف دستگاه HPLC
۴۸	۱-۳-۲) فاز متحرک و مخزن آن
۴۹	۲-۳-۲) سیستم پمپ
۵۰	۳-۳-۲) سیستم تزریق نمونه (Injector)
۵۱	۴-۳-۲) ستون کروماتوگرافی (Column)
۵۱	۵-۳-۲) ردیاب (Detector)
۵۲	۱-۵-۳-۲) ردیاب جذب ماوراء بنفش - مرئی
۵۵	۶-۳-۲) دستگاه ثبت کننده (Recorder)
۵۶	۴-۲) تشخیص و محاسبه مقدار و غلظت ماده مورد نظر

فصل سوم

۵۹	۱-۳) مواد و دستگاه ها
۵۹	الف) مواد بکار رفته
۵۹	ب) دستگاه ها
۶۰	۲-۳) انتخاب شرایط دستگاه
۶۰	الف) فاز ساکن
۶۱	ب) فاز متحرک
۶۱	ج) سرعت عبور حلال
۶۱	د) استاندارد داخلی
۶۲	هـ) آشکارساز
۶۲	۳-۳) شرایط استخراج ویتامین E از پلاسما

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۶۲	۴-۳) تهیه محلول های استاندارد
۶۲	۱-۴-۳) تهیه محلول استاندارد اولیه (استوک) ویتامین E
۶۳	۲-۴-۳) تهیه محلول استاندارد داخلی
۶۳	۳-۴-۳) تهیه محلول سدیم تانژستات و منیزیم کلراید
۶۳	۵-۳) کالیبراسیون
۶۳	۱-۵-۳) تهیه رقت های استاندارد مورد نیاز جهت کالیبراسیون
۶۴	۲-۵-۳) استخراج و انجام کالیبراسیون
۶۷	۳-۵-۳) محاسبات مربوط به کالیبراسیون
۶۸	۴-۵-۳) تعیین راندمان استخراج
۶۸	۶-۳) بررسی پایداری ویتامین E
	۱-۶-۳) بررسی پایداری ویتامین E در نمونه های استاندارد آلبومین
۶۸	در دمای صفر و ۴°C
۸۶	۲-۶-۳) بررسی پایداری نمونه های پلاسمایی
۱۰۱	بحث و نتیجه گیری
۱۰۲	منابع

فصل اول

کلیاتی دربارهٔ ویتامین E

۱-۱) مقدمه

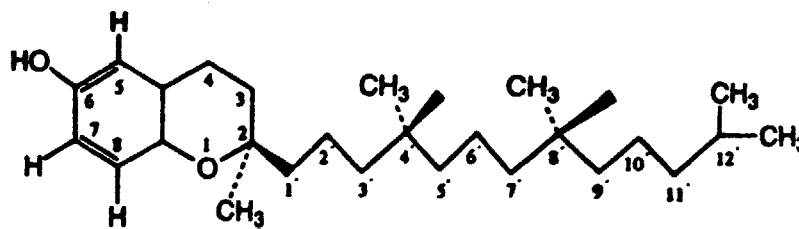
ویتامین E یک ویتامین محلول در چربی است که به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و عملکردهای اختصاصی خود، دارای نقش منحصر به فردی در تغذیه انسان می باشد (۱). این ویتامین در سالهای اخیر، بخصوص به دلیل نقش پیشگیری کننده اش در بروز سرطان، بیماریهای قلبی - عروقی، کاتاراکت و تعدادی دیگر از اختلالات، بسیار مورد توجه بوده است (۲).

وجود ویتامین E در سال ۱۹۲۲ طی مطالعات تولید مثل حیوانات، توسط Evans و Bishop از دانشگاه کالیفرنیا کشف شد. آنها دریافتند که وجود ترکیبی که تا آن زمان ناشناخته بود، برای جلوگیری از مرگ و جذب مجدد جنینی در rat های حامله ضروری است. در ۱۹۲۴ این ترکیب ناشناخته توسط Sure با نام ویتامین E معرفی شد. در ۱۹۳۶ ترکیبی با فعالیت بیولوژیکی ویتامین E به وسیله گروه تحقیقاتی Evans از روغن جوانه گندم جدا شد (۳). آنها این ترکیب را آلفا-توکوفرول نامیدند که از کلمات یونانی tokos (به معنی فرزندی) و Pherein (به معنی زاییدن) گرفته شده است (۱). ساختمان ویتامین E در سال ۱۹۳۷ توسط Fernholz مشخص شد و سنتز آن توسط Karrer در سال بعد انجام گرفت (۴).

ویتامین E به وسیله خانواده ای از ترکیباتی که از لحاظ ساختمانی به هم مرتبط هستند (ویتامرها)، نمایش داده می شود که دارای فعالیت بیولوژیکی متفاوتی می باشند (۱).

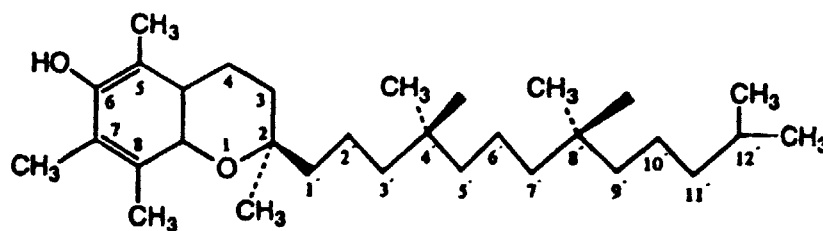
۲-۱) ساختمان شیمیایی و اسامی

ویتامین E نامی عمومی برای ترکیباتی است که فعالیت بیولوژیکی آلفا-توکوفرول را از خود نشان می دهند. ویتامین E به طور طبیعی دارای هشت فرم متفاوت است که چهار فرم آن به صورت توکوفرول و چهار فرم به صورت توکوتری انول می باشد (۱). همگی این ترکیبات دارای ساختمان ۶-هیدروکسی کرومانول هستند. توکوفرول ها دارای زنجیره جانبی اشباع شده و توکوتری انول ها دارای زنجیره جانبی اشباع نشده می باشند. تفاوت فرم های مختلف، در تعداد و محل قرارگیری گروههای متیل بر روی حلقه کرومانول است: تری متیل (آلفا)، دی متیل (بتا) یا گاما) و منومتیل (دلتا) (۲).



2-methyl-2-(4', 8', 12'-trimethyltridecyl) chroman-6-ol

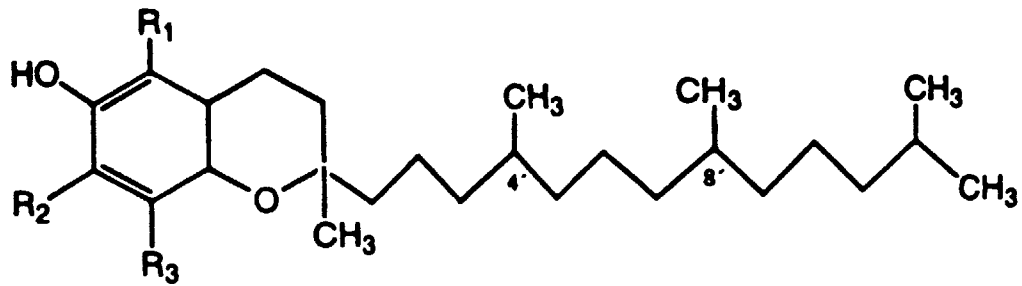
Tocol



2R, 4'R, 8'R - α-tocopherol

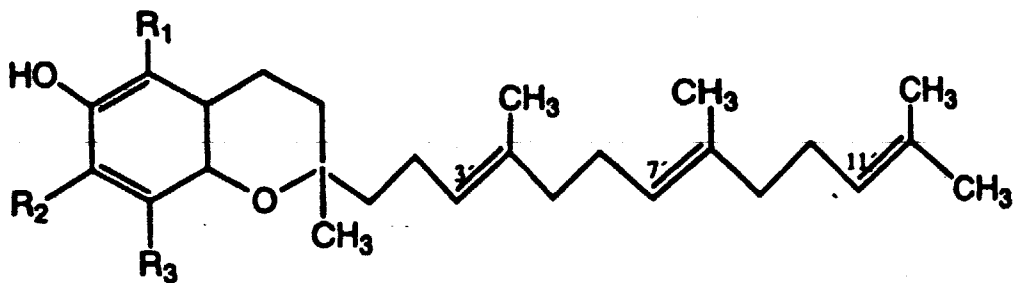
RRR-α-tocopherol

ساختمان Tocol و RRR-α-tocopherol (۲)



Tocopherols

Trivial Name	Chemical Name	Abbreviation	Ring Position		
			R ₁	R ₂	R ₃
Tocol	-	-	H	H	H
α-Tocopherol	5,7,8-Trimethyltolcol	α-T	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-Tocopherol	5,8-Dimethyltolcol	β-T	CH ₃	H	CH ₃
γ-Tocopherol	7,8-Dimethyltolcol	γ-T	H	CH ₃	CH ₃
δ-Tocopherol	8-Methyltolcol	δ-T	H	H	CH ₃



Tocotrienols

Trivial Name	Chemical Name	Abbreviation	Ring Position		
			R ₁	R ₂	R ₃
Tocotrienol	-	-	H	H	H
α-Tocopherol	5,7,8-Trimethyltocotrienol	α-T3	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-Tocopherol	5,8-Dimethyltocotrienol	β-T3	CH ₃	H	CH ₃
γ-Tocopherol	7,8-Dimethyltocotrienol	γ-T3	H	CH ₃	CH ₃
δ-Tocopherol	8-Methyltocotrienol	δ-T3	H	H	CH ₃

ساختمان های توکوفرول ها و توکوتری انول ها (۲)

برخلاف اکثر ویتامین های دیگر، آلفا - توکوفرول حاصل از سنتز شیمیایی با فرم موجود در طبیعت آن یکسان نیست. آلفا - توکوفرول سنتز شده به وسیله تراکم تری متیل هیدروکینون با ایزوفیتول راسمیک، شامل مقادیر مساوی از هشت استرئوایزومر است که با توجه به سه مرکز کایرال در موقعیت ۲ حلقه کرومان و کربن های ۴' و ۸' زنجیره جانبی، ایجاد می شوند. آلفا - توکوفرول صنعتی، all-rac- α -tocopherol نامیده می شود (قبلاً 1- α -tocopherol ، d نامیده می شد). تنها RRR- α -tocopherol (یکی از هشت استرئوایزومر موجود در فرم صنعتی)، در طبیعت یافت می شود. RRR- α -tocopherol که قبلاً d- α -tocopherol نامیده می شد، فعال ترین فرم بیولوژیکی ویتامین E است. سایر استرئوایزومرها فعالیت بیولوژیکی پایین تری از RRR- α -tocopherol دارند. فرم های ۲S عموماً فعالیت پایین تری از فرم های ۲R دارند (۱).

مکمل های ویتامین E موجود در بازار، اغلب استرهای آلفا - توکوفرول هستند. مانند آلفا-توکوفریل استات، سوکسینات و نیکوتینات. فرم استر از اکسیداسیون ویتامین E جلوگیری می کند و عمر قفسه ای آن را افزایش می دهد. این استرها در دستگاه گوارش به سرعت هیدرولیز می شوند و جذب می گردند (۴).

۱-۳) خصوصیات فیزیکی شیمیایی

۱-۳-۱) خصوصیات ظاهری و حلالیت

توکوفرول ها و توکوتری انول ها در حالت خالص، روغن های شفاف ویسکوز تقریباً بدون بو و به رنگ زرد کم رنگ هستند که در معرض اکسیژن تیره می شوند.

آلفا-توکوفریل استات نیز ظاهر مشابهی دارد. استرهدروژن سوکسینات یک پودر سفید گرانولی تقریباً بی بو است.

توکوفرول ها و توکوتری انول های غیر استریفیه، در آب غیر قابل حل هستند. اما در الکل و دیگر حلال های آلی (شامل استن، کلروفرم و اتر) و روغن های نباتی به سرعت حل می شوند. استات های ویتامین E نسبت به ویتامرهاى غیر استریفیه با سرعت کمتری در اتانل حل می شوند (۲).

۱-۳-۲) خصوصیات نوری

شدت جذب UV در مورد توکوفرول ها و توکوتری انول ها نسبتاً پایین است. طیف UV توکوفرول ها و استرهای آنها در متانل، حداکثر جذب را بین ۲۸۰ و ۳۰۰ نانومتر با حداقل جذب بین ۲۵۰ و ۲۶۰ نانومتر نشان می دهد. استری کردن گروه هیدروکسیل کربن ۶ حلقه کرومان، جذب ماکزیمم را به ۲۸۶-۲۸۴ نانومتر جابه جا می کند. توکوتری انول ها خصوصیات جذب UV مشابهی دارند (۲).

توکوفرولها و توکوتری انول های غیر استریفیه فلورسانس طبیعی شدیدی را نشان می دهند. حداکثر تحریک و نشر آلفا-توکوفرول به ترتیب ۲۹۵ و ۳۳۰ نانومتر است و حداکثر فلورسانس سایر توکوفرول ها در طول موج های کمی بالاتر است. شدت فلورسانس ویتامرهاى E با یکدیگر متفاوت است و به میزان زیادی به حلال بستگی دارد. حلال های قطبی مانند دی اتیل اتر و الکل ها شدت های بیشتری را در مقایسه با هگزان ایجاد می کنند. وقتی ایزومرهاى ویتامین E در هیدروکربن های کلرینه شده حل شوند، فلورسانس ناچیز است. آلفا-توکوفریل استات در گذشته غیر فلورسانت تصور می شد ولی به کمک یک اسپکتروفلوریمتر مناسب می توان یک فلورسانس ضعیف اما قابل اندازه گیری از آن به دست آورد (۳).