تعیین سطح پلاسمایی تیامین در بیماران همودیالیزی: یک روش دقیق کروماتوگرافی با کارکرد عالی

*دکتر منیژه متولیانI

دکتر عفت سوریII

دکتر نیوشا تفرشیIII

دکتر حسن جلالی‌زادهIV

دکتر مسعود محمودیانV

چکیده

زمینه و هدف: درمان‌های جایگزین کلیه، اغلب با تغییرات عناصر کمیاب و متابولیسم ویتامین‌ها همراه است. تجویز مولتی‌ویتامین‌ها به بیماران دیالیزی به صورت روتین در مراکز دیالیز صورت می‌گیرد. غلظت پلاسمایی تیامین، نشانگر خوبی برای وضعیت تغذیه‌ای بیمار است. در این مطالعه یک روش دقیق کروماتوگرافی با کارکرد عالی برای تعیین غلظت پلاسمایی تیامین در انسان راه‌اندازی شده و غلظت پلاسمایی تیامین در گروهی از بیماران همودیالیزی بررسی شده است. هدف از انجام این پژوهش، اندازه‌گیری میزان تیامین در خون بیماران همودیالیزی مزمن به منظور ارزیابی نیاز یا عدم نیاز این بیماران به مکمل‌های حاوی تیامین است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پلاسمای ۹ نفر بیمار همودیالیزی ایرانی برای تعیین میزان تیامین آن آنالیز شده و با یک گروه داوطلب سالم ایرانی مقایسه شد. طریقه عمل بر اساس اکسیداسیون تیامین قبل از ورود به ستون و تبدیل آن به تیوکروم و سپس ردیابی توسط ردیاب فلورسنت بود. ۱ میلی‌لیتر از پلاسما توسط تری‌کلرواستیک اسید دی پروتئینه شده و تیامین توسط دی‌اتیل اتر استخراج شد. سپس سیانوژن بروماید (۰/۳ میلی‌لیتر) اضافه شد تا تیامین را به تیوکروم تبدیل کند. نمونه‌ها (۲۵ میکرولیتر) به یک ستون (۲۵۰ × ٤/٦ mm) Novapak C_8, ٤ µm تزریق شد. فاز متحرک شامل متانول: بافر فسفات (۳۰ میلی‌مولار) با نسبت ٥٥:٤٥ و ۰/۰۵ ٪ سدیم لوریل سولفات بود. نتایج به دست آمده با استفاده از Student t-test و ANOVA یک طرفه آنالیز شد. آنالیز اطلاعات با استفاده از برنامه SPSS V. 13 صورت گرفته است.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که روش استفاده شده برای تعیین مقدار تیامین در پلاسما، روشی بسیار دقیق و تکرارپذیر است. حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری تیامین ۰/۲ نانو گرم در میلی‌لیتر و درصد بازیافت حدود ۸۵٪ بوده است. ضرائب تغییرات بین روزی و درون روزی برای ۳ غلظت اختیاری تیامین در پلاسما در محدوده ٤/۹٤-۲/۲۲٪ بود. میانگین غلظت پلاسمایی تیامین در ۱۰ نفر داوطلب سالم ۰/۹۵± ۳/۰۷ نانوگرم در میلی‌لیتر و در بیماران ٤/۷۲±۱/۱۲ نانوگرم در میلی‌لیتر قبل از همودیالیز و ٤/۲۹±۰/٦۷ نانوگرم در میلی‌لیتر بعد از همودیالیز بود. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میانگین غلظت پلاسمایی تیامین در بیماران همودیالیزی ایرانی تفاوت معنی‌داری با داوطلبین سالم ایرانی ندارد و همچنین قبل و بعد از دیالیز نیز تغییر چندانی نمی کند.

نتیجه‌گیری: روش استفاده شده برای اندازه‌گیری تیامین در پلاسما روشی حساس، دقیق و تکرارپذیر است و برای مطالعات کینتیکی تیامین مناسب است. بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گرفت که بیمارانی که به صورت مزمن تحت همودیالیز قرار می‌گیرند، تفاوت معنی‌داری در مورد غلظت تیامین با افراد سالم ندارند و میزان ویتامین موجود در رژیم غذایی این افراد برای رفع نیاز بدن کافی به نظر می‌رسد و دریافت ویتامین اضافی توسط این بیماران ضروری نیست.

کلیدواژه‌ها: ۱- تیامین ۲- کروماتوگرافی با کارکرد عالی ۳- غلظت پلاسمایی ٤- همودیالیز

مقدمه

نارسائی حاد کلیه، یکی از مشکلات جدی است که افرادی که به سختی بیمارند در معرض آن می‌باشند و گاهی نیاز به روش‌های جایگزینی کلیه پیدا می‌کنند که عناصر کمیاب و متابولیسم ویتامین‌ها را تغییر می‌دهد[۱]. بیمارانی که به‌طور مزمن تحت دیالیز هستند، مستعد آنسفالوپاتی با علت ناشناخته می‌باشند[۱-۳]. در بیماران کلیوی تحت دیالیز، احتمال کمبود تیامین وجود دارد

این مقاله تحت حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران (طرح شماره ۸۵/مت) انجام شده است. همچنین این تحقیق در سال ۱۳۸۵ در کنگره بین‌المللی فیزیولوژی و فارماکولوژی (IUPHAR) در کشور چین، پکن ارائه شده است.

I) استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (*مولف مسؤول)

II) دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

III) دکترای عمومی داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

IV) استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران، تهران، ایران

V) استاد گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

که علائم شبیه آنسفالوپاتی ایجاد می‌کند[۱-۳]. مطالعات نشان داده است که تجویز تیامین نشانه‌های آنسفالوپاتی‌ورنیکه را به طور کامل از بین می‌برد[۴و۵]. به منظور ارزیابی ضرورت تجویز تیامین به بیماران همودیالیزی، اندازه‌گیری غلظت پلاسمایی تیامین در ۹ بیمار همودیالیزی انجام گرفته و با افراد سالم، که فرآورده‌های دارویی حاوی ویتامین دریافت نمی‌کنند، مقایسه شد. تعیین غلظت تیامین توسط روش‌های متعدد آنزیمی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی صورت می‌گیرد[۶-۱۱] ولی به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری مستقیم با کروماتوگرافی با کارکرد عالی (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) مناسب‌تر باشد[۱۲و۱۳]. هدف از انجام این پژوهش ابتدا راه‌اندازی یک روش دقیق و حساس برای اندازه‌گیری تیامین با HPLC و سپس ارزیابی این روش با اندازه‌گیری سطح پلاسمایی تیامین در بیماران همودیالیزی و مقایسه آن با داوطلبین سالم ایرانی در جهت تعیین نیاز یا عدم نیاز این بیماران به مکمل‌های حاوی تیامین است.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از طریق اکسیداسیون تیامین قبل از ورود به ستون و تبدیل آن به تیوکروم و سپس ردیابی آن توسط ردیاب فلورسنت، شناسایی صورت گرفت.

تهیه محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد تیامین هیدروکلراید در آب مقطر با غلظت ۱میلی گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و به صورت سریال رقیق شده تا غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به دست آید. غلظت اصلی در یخچال با $4\ ^{o}C$ نگهداری شد.

روش استخراج تیامین

به یک میلی‌لیتر پلاسما، تری کلرواستیک اسید (۴۰٪، ۱۲۵ میکرولیتر) اضافه شده و برای ۲۰ ثانیه ورتکس شد. مخلوط ۳۰ دقیقه در یخچال نگهداری شده و سپس با دور ۴۵۰۰rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی، ۳ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر اضافه شده و ۳۰ ثانیه ورتکس شده و سپس با دور ۴۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. لایه دی‌اتیل اتر دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر از لایه زیرین به لوله جدیدی منتقل شد و سیانوژن بروماید (۰/۳ مولار، ۲۰ میکرولیتر) اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق گذاشته شد تا تیامین را به تیوکروم تبدیل کند. سود ۱ مولار (۲۰ میکرولیتر) اضافه و برای ۱ دقیقه ورتکس شد و ۲۵ میکرولیتر از آن به ستون HPLC تزریق گردید.

شرایط کروماتوگرافی

آنالیز تیامین با یک روش فاز معکوس شامل پمپ Waters مدل ۵۱۰ با کنترل‌کننده، تزریق‌کننده اتوماتیک Waters مدل ۷۱۷ و ردیاب فلورسنت Waters مدل ۴۷۴ صورت گرفت. ستون Novapak C_8 با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ میلی‌متر استفاده شد و فاز متحرک شامل متانول: بافر فسفات (۳۰ میلی‌مولار، pH=۶/۹) با نسبت ۵۵:۴۵ و ۰/۰۵٪ سدیم لوریل سولفات بود. قبل از مصرف فاز متحرک با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد و در تمام طول کار گاز هلیم درآن دمیده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۲۵ میکرولیتر بود. طول موج ردیاب فلورسنت برای تحریک ۳۶۵ نانومتر و برای صدور ۴۳۵ نانومتر بود. تمام تزریق‌ها در درجه حرارت آزمایشگاه صورت گرفت.

بازیافت

مقادیر معلومی از تیامین هیدروکلراید به پلاسمای عاری ازداروی (بلانک) انسان اضافه شد تا غلظت‌های ۱۰،۲ و ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه شود. سپس فرآیند استخراج صورت گرفت و حجم‌های لازم به ستون HPLC تزریق شد. سطح زیر منحنی حجم‌های برابر از غلظت‌های استخراج شده و استخراج نشده با هم مقایسه گردید. برای هر غلظت استخراج شده و استخراج نشده ۳ نوبت محلول تهیه گردید.

کالیبراسیون، دقت و صحت آزمایش

منحنی کالیبراسیون حاوی تیامین هیدروکلراید در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

محدوده ۱۵-۱ نانوگرم در میلی‌لیتر در پلاسما رسم شد. استانداردهای کالیبراسیون با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد تیامین هیدروکلراید به ۱ میلی‌لیتر پلاسمای بلانک انسان برای به دست آوردن غلظت‌های نهایی ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس فرایند استخراج انجام شد. سطح زیر منحنی تیامین هیدروکلراید در غلظت‌های مختلف برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. دقت و صحت درون روزی با استفاده از سه غلظت مختلف در پلاسمای بلانک انسان (۱، ۵ و ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر) تعیین شد و هر غلظت سه بار تکرار شد. همین عمل سه بار با فاصله چند روز برای محاسبه ضرائب تغییرات بین روزی تکرار گردید.

دقت روش با ضریب تغییرات (Coefficient of Variation - CV) سنجیده شد که به شکل زیر محاسبه گردید:

$$\%CV = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean measured concentration}} \times 100$$

و درصد عدم صحت (error %) نیز به روش زیر محاسبه شد:

$$\text{Mean \% error} = \frac{(\text{Measured concentration} - \text{Expected concentration})}{\text{Expected concentration}} \times 100$$

آماده‌سازی نمونه‌های انسانی

به منظور آزمودن روش کروماتوگرافی تهیه شده در اندازه‌گیری تیامین در پلاسما، نمونه‌های خونی از ۹ بیمار همودیالیزی مزمن (۷ مرد و ۲ زن)، با میانگین سنی ۰/۲۸±۲۲ سال، قبل و بعد از همودیالیز و همچنین از ۱۰ داوطلب سالم مرد (با سن ۳۰-۲۰ سال)، که هیچ فرآورده دارویی حاوی ویتامین مصرف نمی‌کردند، گرفته شد. پروتکول آزمایش توسط کمیته اخلاقی مرکز تحقیقات دارویی رازی تایید شده و تمامی داوطلبین رضایت‌نامه کتبی حاکی از رضایت برای شرکت در این تحقیق امضا کردند. نمونه‌های خونی بلافاصله سانتریفوژ شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

آنالیز اطلاعات با استفاده از برنامه SPSS (version ۱۳) و با استفاده از میانگین و خطای معیارصورت گرفته است. در آنالیز تحلیلی نتایج به دست آمده از داوطلبین سالم و بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز از طریق آزمون Student t-test و آنالیز واریانس یک طرفه مورد آزمون قرار گرفته و $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شده است.

یافته‌ها

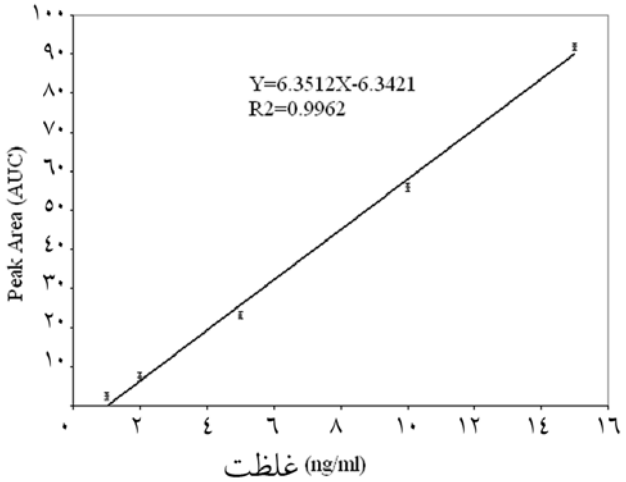
غلظت‌های سرمی تیامین پس از مشتق‌سازی توسط سیانوژن بروماید، که تیامین را به تیوکروم تبدیل کرد[۱۴و۱۵]، با استفاده از روش کروماتوگرافی ذکر شده، اندازه‌گیری شد.

در طیف غلظت ۱ تا ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر بر اساس ۵ نقطه اندازه‌گیری شده، منحنی استاندارد خطی بوده و از ضریب رگرسیون بالایی برخوردار است(r^2=۰/۹۹۶) (شکل شماره ۱). زمان باز داری تیامین در ستون حدود ٤/۷ دقیقه بود (اشکال شماره ۵-۲). شکل شماره ۲، کروماتوگرام حاصل از تزریق پلاسمای بلانک انسان با ۱۰ نانوگرم تیامین اضافه شده در آن را نشان می‌دهد. اشکال شماره ۳ و ٤، یک نمونه از کروماتوگرام حاصل از تزریق پلاسمای بیماران قبل و بعد از همودیالیز را نشان می‌دهد. شکل شماره ۵ کروماتوگرام حاصل از تزریق پلاسمای یکی از داوطلبین سالم را نشان می‌دهد. ارزیابی روش حاصل نشان می‌دهد که روش حاضر از دقت کافی با ضریب تغییرات درون روزی و بین روزی بین ۲/۹٤-۰/۸۵٪ برای سه بار تکرار در محدوده غلظت ۱۵-۱ نانوگرم در میلی‌لیتر برخوردار است (جداول شماره ۱ و ۲). میانگین بازیافت تیامین در این روش در سه غلظت مختلف ۳/٤±۸۵٪ بوده است. حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری ۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر است.

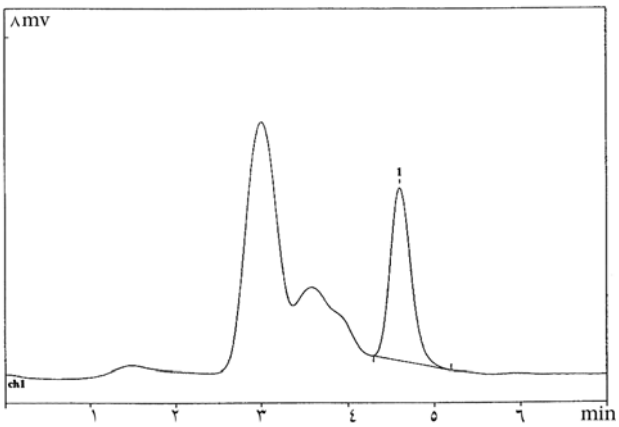
میانگین مقادیر تیامین در پلاسمای بیماران بعد از همودیالیز (۰/٦۷±٤/۲۹) در مقایسه با قبل از همودیالیز (۱/۱۲±٤/۷۲) کمتر بود؛ اما تفاوت معنی‌داری با افراد سالم (۰/٦۸±۳/۷) نداشت ($p<0/05$). اشکال شماره ٦ و ۷

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

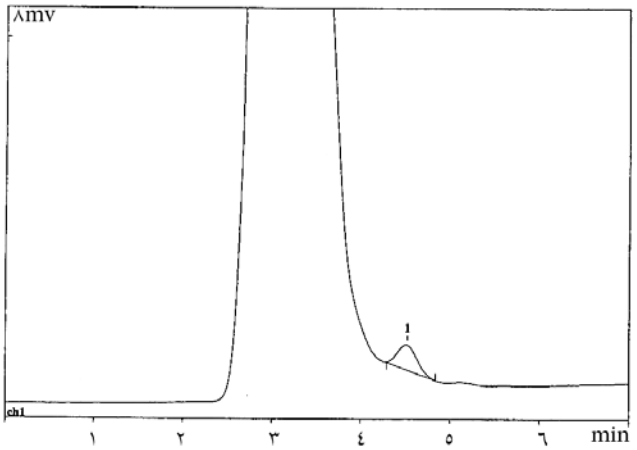
یافته‌های مربوط به بیماران و افراد سالم و چگونگی توزیع آن را نشان می‌دهد.



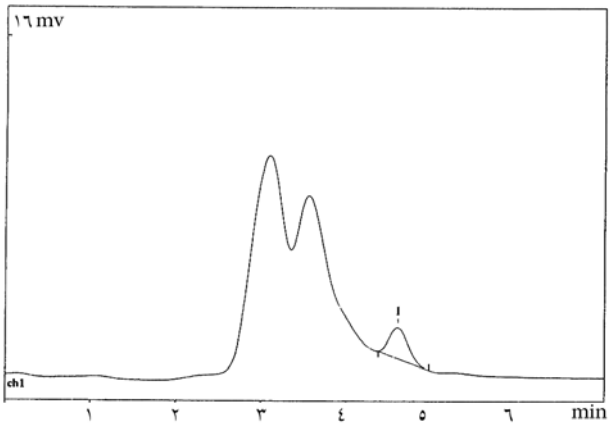
شکل شماره ۱- منحنی استاندارد تیامین هیدروکلراید در پلاسما (n=۹)



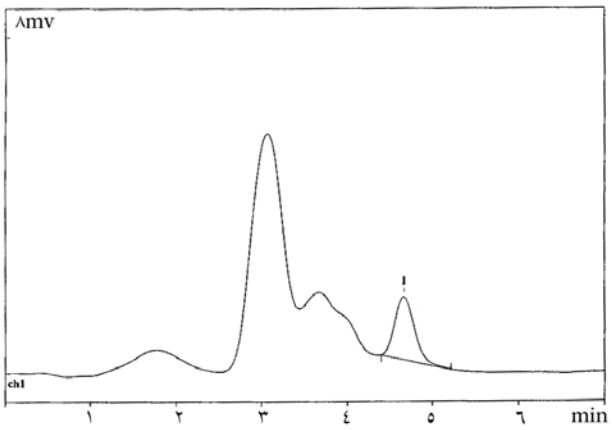
شکل شماره ۲- کروماتوگرام پلاسمای بلانک انسان با ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تیامین افزوده شده (۱- تیامین).



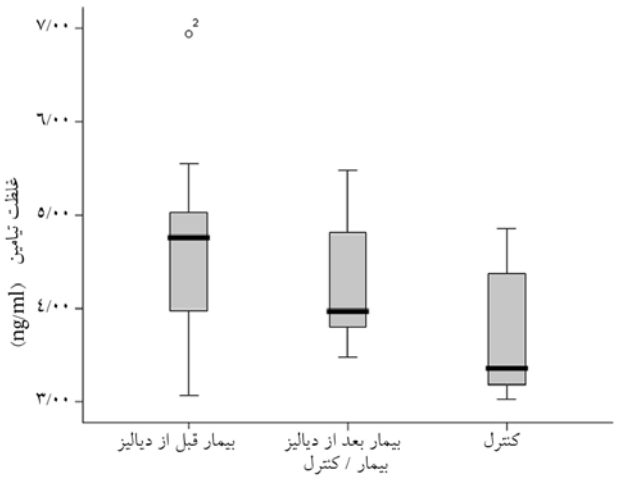
شکل شماره ۳- نمونه کروماتوگرام پلاسمای بیمار قبل از همودیالیز (۱- تیامین)



شکل شماره ۴- نمونه کروماتوگرام پلاسمای بیمار بعد از همودیالیز (۱-تیامین)

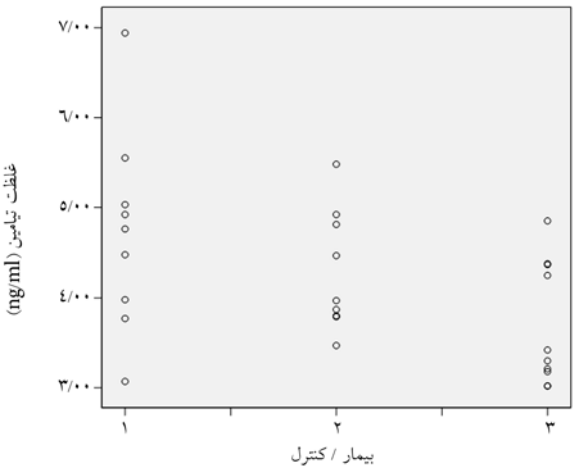


شکل شماره ۵- نمونه کروماتوگرام پلاسمای یکی از داوطلبین سالم (۱- تیامین)



شکل شماره ۶- غلظت‌های تیامین (بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر) در پلاسمای گروه‌های بیماران و کنترل

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره ۷- چگونگی توزیع غلظت‌های تیامین (برحسب نانوگرم در میلی‌لیتر پلاسما) در گروه بیماران و کنترل (۱- قبل از همودیالیز، ۲- بعد از همودیالیز و ۳- افراد سالم)

جدول شماره ۱- ضرایب تغییرات بین روزی در اندازه‌گیری تیامین

	تیامین هیدروکلراید			غلظت
درصد عدم صحت	ضریب تغییرات٪	غلظت اندازه‌گیری شده (میانگین ± خطای استاندارد) ng/ml	دفعات تکرار	افزوده‌شده (نانوگرم در میلی‌لیتر) ng/ml
				۱
۲	۲/۹٤	۱/۰۲±۰/۰۳	۳	روز اول
۵	۲/۸٦	۱/۰۵±۰/۰۳	۳	روز دوم
۵	۱/۹۰	۱/۰۵±۰/۰۲	۳	روز سوم
				۵
-٦/۸	۱/۰۷	٤/٦٦±۰/۰۵	۳	روز اول
-۱۰/۸	۰/۲۲	٤/٤٦±۰/۰۱	۳	روز دوم
-۵/۸	۱/۷۰	٤/۷۱±۰/۰۸	۳	روز سوم
				۱۵
۲	۱/۲٤	۱۵/۳۰±۰/۱۵	۳	روز اول
۲/۵	۰/۳۹	۱۵/۳۷±۰/۰٦	۳	روز دوم
۲/۱	۰/۹۱	۱۵/۳۱±۰/۱٤	۳	روز سوم

جدول شماره ۲- ضرایب تغییرات درون روزی در اندازه‌گیری تیامین

	تیامین هیدروکلراید			غلظت
درصد عدم صحت	ضریب تغییرات٪	غلظت اندازه‌گیری شده (میانگین ± خطای استاندارد) ng/ml	دفعات تکرار	افزوده‌شده (نانوگرم در میلی‌لیتر)
٤	۲/۸۸	۱/۰٤±۰/۰۳	۳	۱
-۷/۸	۲/٦۰	٤/٦۱±۰/۱۲	۳	۵
۲/۲	۰/۸۵	۱۵/۳۳±۰/۱۷	۳	۱۵

بحث

فعالیت آنزیم ترانس کیتولاز در اریتروسیت‌ها هنوز به عنوان نشانگر میزان تیامین بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد[۱٦]. به طور کلی، فعالیت پایین‌تر از نرمال آنزیم و افزایش این فعالیت با تجویز مقادیر زیاد تیامین دی فسفات نشان‌دهنده کمبود تیامین است (این پدیده به اثر تیامین دی فسفات مشهور است). آزمون ترانس کیتولاز که یک نشانگر غیرمستقیم میزان تیامین بدن است، با محدودیت‌هایی همراه است. استاندارد کردن آن مشکل است[۱۷]، بیماری کبد می‌تواند تولید آپو آنزیم و فسفریلاسیون آن را مختل کند[۱۸]. برخی واریاسیون‌های آپو آنزیم نشان داده شده است که تمایل کمتری برای تیامین دارند و بنابراین اثرات تیامین دی فسفات کمتر مشاهده می‌شود[۱۹]. کمبود طولانی مدت تیامین ممکن است منجر به کاهش تولید آپو آنزیم شده و اثر تیامین دی فسفات را کاهش دهد[۲۰]، به صورتی که مقادیر کم به طور دقیق منعکس‌کننده غلظت تیامین نیست بلکه سطح پایین آپو آنزیم را نشان می‌دهد[۲۱]. این مشکلات در تفسیر نتایج می‌تواند منجر به انحراف در تخمین مقادیر تیامین شود. به علت غیر دقیق بودن این روش‌ها، روش‌های کروماتوگرافی برای اندازه‌گیری تیامین مطرح شد که در نهایت اندازه‌گیری مستقیم تیامین در گلبول‌های قرمز را توسط کروماتوگرافی با کارکرد عالی مقدور ساخت[۱۸]. جداسازی تیامین با کروماتوگرافی پدیده تازه‌ای نیست. لوین و وای در ۱۹٦٦ با کروماتوگرافی کاغذ، استرهای تیامین را جدا کردند[۲۲]. بعدها روش کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع نیز برای جداسازی تیامین مورد استفاده قرار گرفت[۲۵-۲۳]. اکسیداسیون قلیایی تیامین که باعث ایجاد تیوکروم که شدیداً فلورسنت است می‌شود، اولین بار توسط برگر و همکاران در ۱۹۳۵ بیان شد[۲٦]. واکنش اکسیداسیون تحت شرایط خاصی سریع است و در کمتر از ۱۵ ثانیه کامل می‌شود[۲۷]. این واکنش پایه روش شیمیایی اندازه‌گیری تیامین می‌باشد[۲۸و۲۹]. تعدادی معرف برای اکسیداسیون تیامین به تیوکروم استفاده

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

می‌شود؛ پتاسیم فری سیانید ($K_3Fe(CN)_6$) که مشهورترین آن‌هاست، سیانوژن بروماید (BrCN) که کار با آن می‌تواند خطرناک باشد و مرکوریک کلراید ($HgCl_2$) که شدت فلورسانس بیشتری تولید می‌کند ولی به اندازه پتاسیم فری سیانید پایدار نیست. اکسیداسیون قلیایی پتاسیم فری سیانید باعث تشکیل هیدروکسی اتیل تیامین می‌شود که اکسیداسیون با سیانوژن بروماید چنین مشتقی را ایجاد نمی‌کند[۱۳] که این تفاوت در اندازه‌گیری تیامین حائز اهمیت است. انتخاب روش تشکیل تیوکروم قبل از ستون به این دلیل است که در مقایسه با بعد از ستون، پیک‌های تمیزتری با کیفیت بهتر به دست می‌آید و در عین حال نیاز به وسایل اضافی ندارد[۱۲]. اگرچه در اکسیداسیون بعد از ستون این امتیاز وجود دارد که چون pH مورد نیاز برای اکسیداسیون تیامین بالای ۸ است و این pH به ستون HPLC صدمه می‌زند، با اکسیداسیون بعد از ستونی، عمر ستون با فاز متحرک قلیایی طولانی‌تر خواهد بود. در روش‌های مدرن کروماتوگرافی با کارکرد عالی برای اندازه‌گیری تیامین اولین بار در ۱۹۷۸، روزر و همکاران در فاز نرمال تیامین را اندازه‌گیری کردند[۳۰]. از اکسیداسیون قبل از ستون و با استفاده از پتاسیم فری‌سیانید و ردیابی با دتکتور فلورسنت، جداسازی صورت گرفت. دقت جداسازی ۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، که درمقایسه با روش به کار گرفته شده در مطالعه حاضر، از ۱۵۰ برابر دقت کمتر برخوردار است (حد غلظت قابل اندازه‌گیری در مطالعه حاضر ۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر است). در ۱۹۸٤ بونتمپت با یک تکنیک، فاز معکوس تیامین را شناسایی کرد[۳۱]. تحت شرایط مورد استفاده، پتاسیم فری سیانید و NaOH تاثیر زیادی بر سطح زیر منحنی و زمان بازداری تیامین دارند. در ۱۹۸۵ وبر و کویتز با روش فاز نرمال، تیامین موجود در پلاسما را اندازه گرفتند[۳۲] و بتندورف و همکاران با استفاده از روش فاز معکوس ایزوکراتیک اندازه‌گیری کردند[۳۳]. زمان بازداری تیامین طولانی بود. امتیاز این روش استفاده از ستون PRP-1 بود که نسبت به تغییرات pH از ۱ تا ۱۳، بسیار پایدار است و خرابی سریع ستون که با pH بالا در ستون‌های silica based دیده می‌شود، در این ستون دیده نمی‌شود[۳۳]. روش‌های متعدد کروماتوگرافی با کارکرد عالی، اجازه آنالیز سریع و اختصاصی تیامین در مایعات بیولوژیک را داده‌اند. علی‌رغم روش‌های متعددی که استفاده شده است، انتخاب روشی برای آنالیز تیامین در پلاسما برای مقادیر بسیار کم (در حدود ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر) بسیار مشکل بود. استفاده از اکسیداسیون قلیایی برای تشکیل تیوکروم برای تعیین مقدار کمی تیامین بسیار حائز اهمیت است، که در این تحقیق برای اکسیداسیون از پتاسیم فری سیانید قلیایی و سیانوژن بروماید قلیایی هر دو استفاده گردید و از آنجایی که نتایج به دست آمده با سیانوژن بروماید از دقت بیشتری برخوردار بود، از سیانوژن بروماید در محیط قلیایی برای اکسیداسیون تیامین به تیوکروم استفاده گردید.

روش به دست آمده، روشی حساس و دقیق برای اندازه‌گیری تیامین در پلاسمای انسان است. انتخابی بودن، دقت و صحت روش (جداول شماره ۱ و ۲) و توانایی آن درسنجش غلظت‌های مورد انتظار در خون انسان (حد غلظت قابل اندازه‌گیری ۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر) به علاوه زمان بازداری کوتاه آن در ستون، این روش را روشی مناسب جهت پایش سطح تیامین در بیماران مزمن کلیوی می‌سازد.

تجویز مولتی‌ویتامین‌ها برای بیماران دیالیزی در مراکز دیالیز به صورت روتین انجام می‌شود. غلظت پلاسمایی تیامین، نشانگری مناسب برای ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای بیماران است. سطح پلاسمایی تیامین در گروهی از بیماران با استفاده از روش فوق تعیین گردید. از محدودیت‌های این پژوهش، مشکل بودن تعیین غلظت تیامین در پلاسما بود که به دلیل کمبود امکانات با صرف وقت زیاد صورت گرفت. این مطالعه نشان می‌دهد که سطح میانگین تیامین در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

بیماران ایرانی همودیالیزی به صورت معنی‌دار با داوطلبین سالم ایرانی تفاوتی ندارد و سطح تیامین خون نیز بعد از همودیالیز تغییر چندانی نداشته است. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که تجویز ویتامین به این بیماران ضروری نیست و فقط زمانی که میزان ویتامین‌های محلول در آب در این بیماران کاهش یافته باشد، در حد دوز روزانه مورد نیاز و مقدار توصیه شده روزانه (Recommended Dietary Intake - RDI) تجویز شود.

نتیجه‌گیری

روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری تیامین در مایعات بیولوژیک با استفاده از کروماتوگرافی با کارکرد عالی گزارش شده است. روش حاضر در مقایسه با روش‌های موجود، از حساسیت و دقت بیشتر و زمان بازداری کوتاه‌تر تیامین در ستون برخوردار است و برای پایش روتین تیامین در بیماران کلیوی مناسب به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر نشانگر این مطلب است که تجویز تیامین به همه بیماران همودیالیزی ضرورت ندارد و فقط زمانی که میزان ویتامین‌های محلول در آب در این بیماران کاهش یافته باشد، در حد دوز روزانه مورد نیاز توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه تحت حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران (طرح شماره ۸۵/ م ت) انجام شده است. نویسندگان وظیفه خود می‌دانند که از معاونت محترم پژوهشی در این خصوص صمیمانه تشکر نمایند.

این تحقیق در سال ۱۳۸۵ در کنگره بین‌المللی فیزیولوژی و فارماکولوژی (IUPHAR) در کشور چین، پکن ارائه شده است.

فهرست منابع

1- Hung SC, Hung SH, Tarng DC, Yang WC, Chen TW, Huang TP. Thiamin deficiency and unexplained encephalopathy in hemodialysis and peritoneal dialysis patient. Am J Kidney Dis 2001; 38(5): 941-7.

2- Ihara M, Ito T, Yanagihara C Nishimura Y. Wernicke's encephalopathy associated with hemodialysis: report of two cases and review of the literature. Clin Neurol Neurosurg 1999; 101: 118-21.

3- Ueda K, Takada D, Mii A, Tsuzuku Y, Saito SK, Kaneko T, et al. Severe thiamin deficiency resulted in Wernicke's encephalopathy in a chronic dialysis patient. Clin Exp Nephrol 2006; 10(4):290-3.

4- Allman MA, Truswell AS, Tiller DJ, Stewart PM, Yau DF, Horvath JS, et al. Vitamin supplementation of patients receiving hemodialysis. Med J Aust 1989; 150(3): 130-3.

5- Boeschoten EW, Schrijver J, Krediet RT, Schreurs WH, Arisz L. Deficiencies of vitamins in CAPD patients: the effects of supplementation. Nephrol Dial Transplant 1988; 3(2): 187-93.

6- Esi Y, Koyaman S, Shikata H, Kawasaki K. Content of thiamin phosphate esters in mammalian tissues – an extremely high concentration of thiamin triphosphate in pig skeletal muscle. Biochem Int 1986; 12: 385-390.

7- Miyoshi K, Esi Y, Shioda T, Kawasaki T. Evidence for in vivo synthesis of thiamin triphosphate by cytosolic adenylate kinase in chicken skeletal muscle. J Biochem 1990; 108: 267-270.

8- Bettendorf L, Peeters M, Win P, Schoffeniels E. Metabolism of thiamin triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. J Neurochem 1993; 193: 423-434.

9- Bettendorf L, Hennuy B, DeClarck A, Wins P. Chloride permeability of rat brain membrane vesicles correlates with thiamin triphosphate content. Brain Res 1994; 652: 157-160.

10- Shikata H, Esi Y, Koyama S, Yamada K, Kawasaki T. Properties of the thiamin triphosphate–synthesizing activity catalyzed by adenylate kinase (isoenzyme 1). Biochem Int 1989; 8: 943-949.

11- Esi Y, Koyama S, Shioda T, Yamada K, Kawasaki T. Identification, purification and reconstitution of thiamin metabolizing enzymes in human red blood cell. Biochem Biophys Acta 1992; 1160: 171-178.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

12- Ishii K, Sarai K, Sanemori H, Kawasaki T. Analysis of thiamin and its phosphate esters by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1979; 97: 191-195.

13- Morita M, Kanaya T, Minesita T. Simultaneous determination of thiamin and 2- (1-hydroxy ethyl) thiamin in biological materials. J Vitaminol 1969; 15: 116-125.

14- Wyatt DT, Lee M, Hillman RE. Factors affecting a cynogen bromide-based assay of thiamin. Clin Chem 1989; 35: 2173-2178.

15- Sanemori H, Kawasaki T. Purification and properties of thiamin pyrophosphokinase in paracoccus denitrificans. J Biochem 1980;88:223-230.

16- Gibson S Thiamin. Gibson S, editor. Principles of Nutritional Assessment. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1990, p.424.

17- Baines M, Davies G. Standards of thiamin diphosphate effect. Ann Clin Biochem 1988; 25:698.

18- Fennelly J, Frank O, Baker H, Leevy C. Metabolism of thiamin triphosphate. Am J Clin Nutr 1967;20:946.

19- Kaczmarek MJ, Nixon PF. Properties of the thiamin triphosphate–synthesizing activity of adenylate kinase. Clin Chem Acta 1983;130:349.

20- Bailey AL, Finglas PM, Wright AJA, Southon S. Vitamin supplementation Br J Nutr 1994;72:111.

21- Kjosen B, Seim SH. Thiamin in methods of vitamin Assay. Am J Clin Nutr 1977;30:1591.

22- Levin LM, Wei R. High performance liquid chromatographic analysis of thiamine & riboflavin in dietetic foods. Anal Biochem 1966;16:29.

23- Waring PP, Goad WC, Ziporin ZZ. Modified thiochrome procedure for the determination of urinary thiamin. Anal Biochem 1968;24:185.

24- Schlemmer W, Kammerl E. Vitamin analysis for the health & food sciences. J Chrom 1973;82:142.

25- Van De Weerdhof T, Wiersum ML, Reissenweber H. Content of Thiamin Phosphate esters in mammalian tissues. J Chrom 1973;83:455.

26- Berger G, Bergel F, Todd AR. Evidence for in vivo synthesis of thiamin triphosphate by cytosolic adenylate kinase in skeletal muscle. Nature 1935;136:259.

27- Wielders JPM, Mink CYK. Chemical derivitization of thiamine. J Chrom 1983;277:145.

28- Defibaugh PW, Smith JS, Week CM. Simultaneous determination of thiamin and its metabolite in biological fluids. J AOAC JNT 1977;60:522.

29- Sebecic B, Vedrina-Dragojevic J Oxidative derivitization of thiamin. Nahrung 1989;30:527.

30- Roser RL, Andrist AH, Harrington WH, Nation HK, Lonsdale D. A new method for detection of thiamin in plasma. J Chrom 1978;146:43.

31- Bontemps J, Philippe P, Bettendorff L, Lombet J, Dandrifosse G, Schoffeniels E. Reverse phase chromatography of thiamin esters. J Chrom 1984;307:283.

32- Weber W, Kewitz H. Analysis of thiamin with normal phase by high-performance liquid chromatography. Eur J Clin Phamacol 1985;28:213.

33- Bettendorff L, Grandfils C, De Rycker C, Schoffeniels E. Analysis of thiamin with reverse phase chromatography. J Chrom 1982;382:297.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

Determination of Thiamin Level by a Sensitive HPLC Method in Plasma of Chronic Hemodialysis Patients

***M. Motevalian, PhD[I] E. Souri, PhD[II] N. Tafreshi, PharmD[III]**
H. Jalalizadeh, PhD[IV] M. Mahmoudian, PhD[V]

Abstract

Background and Aim: Renal replacement therapies are usually associated with changes in trace elements and metabolism of vitamins. Multivitamins are administered routinely to dialysis patients in dialysis centers. Thiamin plasma level is a good indicator of nutritional state of the patient. In this study, a sensitive high-performance liquid chromatography HPLC method for determination of the concentration of thiamin in human plasma has developed by which thiamin level is detected in plasma of hemodialysis patients. The aim of the study was determination of thiamin blood levels in chronic hemodylysis patients in order to evaluate their need for thiamin supplements.

Materials and Methods: In this experimental study, the plasma of nine Iranian patients on hemodialysis were analyzed for their thiamin levels and compared to the thiamin levels in a group of healthy Iranian subjects. The procedure was based on pre-column oxidation of thiamin to thiochrome followed by fluorescence detection. Plasma (1ml) was deproteinized with trichloroacetic acid and thiamin was extracted with diethyl ether. Then, cyanogens bromide (0.3 M) was added to convert thiamin to thiochrome. Samples (25µl) were applied to a Novapak C_8, 4µm (4.6 × 250 mm) column. The mobile phase consisted of methanol: phosphate buffer (30mM) in the ratio of 45:55 and 0.05% sodium lauryl sulfate. Data were analyzed using SPSS V13. Statistical analysis was done by t-test and One- way Anova test.

Results: A precise and reproducible HPLC method was developed for determination of thiamin in plasma. The minimum detection limit was 0.2 ng/ml and percentage recovery was 85%. Inter and Intra day assay variabilities were determined for 1,5 and 15 ng/ml thiamin spikes in plasma and coefficient of variations were in the range 0.2-2.94%. The average plasma thiamin level in 10 healthy Iranian subjects was 3.07±0.95 ng/ml and in Iranian patients was 4.72±1.12 ng/ml and 4.29±0.67 ng/ml before and after hemodialysis, respectively. Our study has shown that the mean plasma thiamin level in Iranian patients on hemodialysis has no significant difference with its level in healthy Iranian subjects. The thiamin level also remained unchanged before and after the hemodialysis.

Conclusion: The HPLC method used for determination of thiamin in plasma was sensitive, accurate, reproducible and suitable for kinetic studies of thiamin. According to our findings the thiamin level in patients undergoing hemodialysis has no significant difference with healthy subjects and it seems that dietary vitamin is sufficient for the normal functions of the body, and taking viamin supplementation is not necessary for these patients.

Key words: 1) Thiamin 2) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 3) Plasma Level 4) Hemodialysis

This study has been conducted under the financial support of the undersecretary of Research of Iran University of Medical Sciences and Health services and Razi Research Institute for Pharmaceutical Science. It has also been presented in the International Congress of Physiology and Pharmacology (IUPHAR) held in Beijing – China in 2006.

I) *Assistant Professor of Pharmacology, Faculty of Medicine, Crossing of Hemmat and Chamran Expressways, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran (*Corresponding Author)*
II) *Associate Professor of Pharmacy, School of Pharmacy and Research Institute for Pharmaceutical Science, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*
III) *Pharmacist, Azad Islamic University, Tehran, Iran*
IV) *Assistant Professor of Pharmacy, School of Pharmacy and Research Institute for Pharmaceutical Science,Tehran Universtiy of Medical Sciences and Health services, Tehran, Iran*
V) *Professor of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]