اندازه‌گیری فنیل‌آلانین پلاسما به روش کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا با کاربرد در بیماران فنیل‌کتونوری

احمد رضا بندگی [۱*](M.Sc)، محمود دوستی [۲](Ph.D)

۱ - دانشگاه علوم پزشکی سمنان - دانشکده پزشکی -گروه بیوشیمی

۲ - دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده پزشکی - گروه بیوشیمی

خلاصه

سابقه و هدف: اندازه‌گیری فنیل‌آلانین (Phe) پلاسما یا سرم، برای تشخیص و درمان بیماری فنیل کتونوری (Phenylketonuria, PKU) مورد نیاز است. هدف از این مطالعه، به کارگیری یک روش ساده و سریع جهت تشخیص و درمان این بیماران می باشد.

مواد و روشها: Phe با روش ایزوکراتیک کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (High performance liquid chromatography ,HPLC) و با استفاده از آشکارساز UV-VIS در طول موج ۲۱۰nm، ستون اکتادسیل‌سیلان (Octadecylsilane ,ODS) و فاز متحرک دارای استونیتریل و آب اندازه‌گیری شد. برای این اندازه‌گیری، ۱۵ میکرولیتر پلاسما استفاده گردید و آنالیز کامل در کمتر از ۱۲ دقیقه از زمان تزریق انجام شد.

یافته ها: ضریب تغییرات (CV٪) برای نمونه‌های پلاسمای انسان (Phe ۶۰ تا ۱۲۱۰میکرومول در لیتر) بین ۲/۸ تا ۳/۳ درصد بود. این روش دارای دامنه خطی وسیعی (۱۰۰ تا ۳۰۰۰ میکرومول) می باشد.

نتیجه گیری: در این روش آماده سازی نمونه بسیار ساده و سریع می باشد و یافته‌های فوق نشان داد که این روش جهت اندازه‌گیری Phe درافراد طبیعی و بیماران مبتلا به فنیل کتونوری از کارآئی بالایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: بیماری فنیل کتونوری؛ فنیل‌آلانین؛ پلاسما؛ کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا

مقدمه

فنیل کتونوری (Phenylketonuria, PKU) کلاسیک یا هیپرفنیل‌آلانینمی نوع I، بیماری اتوزومال مغلوبی است که مهم‌ترین علامت کلینیکی آن عقب ماندگی ذهنی است [۳]. بچه‌های مبتلا به PKU معمولاً در موقع تولد علایم خاص بیماری را ندارند و در اولین هفته‌های زندگی مشکلات تغذیه و استفراغ دیده می شود. در نوع شدید PKU بچه هایی که تشخیص داده نشده و درمان نشوند، ممکن است تا سن ۶ ماهگی ناشناخته باقی بمانند، تا اینکه علایم عقب ماندگی در آنها مشاهده شود[۷]. نقص اساسی در PKU، فقدان آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز است. لذا فنیل‌آلانین(Phe) به تیروزین تبدیل نمی‌شود و غلظت آن در پلاسما افزایش می‌یابد. در نتیجه، مسیرهای دیگر متابولیسم Phe فعال

* نویسندهٔ مسئول. تلفن: ۳-۳۱۵۵۲؛ فاکس: ۳۱۵۵۱

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

گردیده و متابولیت‌های آن، از جمله فنیل‌پیرویک اسید در پلاسما افزایش یافته و از طریق ادرار دفع می شود. اندازه گیری Phe در پلاسما برای تشخیص و درمان PKU ضروری است [۳]. روشهای مهار باکتریایی برای تعیین Phe خون به علت تداخل سایر اسیدهای آمینه دقیق نیست و همچنین نتایج آن نیمه کمی است[۱۱]. اسپکتروفلورومتری Phe نیز به طور وسیعی استفاده می‌شود[۸]، چنین روشی به حدود ۱ تا ۳ ساعت زمان نیاز دارد و همچنین حضور مواد تغییر دهنده فلورسانس، اندازه‌گیری آن را تحت تأثیر قرار می دهند[۱]. هنگامیکه فقط اندازه‌گیری Phe مورد نیاز است، تعیین هم زمان سایر اسیدهای آمینه توسط کروماتوگرافی مایع [۱۰] و یا کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (High performance liquid chromatography HPLC) [۱۳] ضروری به نظر نمی‌رسد. چندین روش HPLC برای تعیین غلظت Phe پلاسما و ادرار گزارش شده است، ولی به دلایل مختلف از جمله پیچیدگی مراحل آماده کردن نمونه [۴ و ۱۲]، نیاز به حجم بالای نمونه، [۶] نیاز به سیستم‌های آشکارساز ویژه مانند مشتق سازی بعد از ستون و استفاده از آشکارساز فلورسانس با فاز معکوس[۹] یا آشکارساز الکتروشیمیایی [۵] مناسب نمی‌باشند. در این مطالعه جهت اندازگیری Phe پلاسما از روش ایزوکراتیک HPLC استفاده شد که اساس آن، روش به کار گرفته شده توسط Atherthon [۲]، با کمی تغییرات می‌باشد. در این روش از آشکارساز UV-VIS استفاده گردید و مراحل آماده‌سازی نمونه ساده و سریع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دستگاه‌ها. دستگاه‌هایی که در این پژوهش استفاده شدند عبارتند از: دستگاه HPLC (Waters Company) با مشخصات؛ پمپ مدل ۵۱۰، انجکتور مدل UK6 ، آشکارساز UV-VIS مدل ۴۸۱، ستون کروماتوگرافی از نوع μBondapak-C_{18} (Octadecylsilanc,ODS) با ابعاد ۱۵۰×۳/۹mm و ذرات ۱۰ میکرومتری، دستگاه ثبات مدل ۷۴۵، pH متر مدل Corning، سیستم فیلتر کننده Millipore ، پمپ خلاء مدل Buchi، دستگاه اولتراسوند مدل Kerry و سانتریفوژ مدل Desaspeed NH-2K.

معرف ها و استانداردها. استونیتریل‌ویژه HPLC ،اسید پرکلریک غلیظ (۷۰٪)، L-فنیل آلانین، L-تیروزین و L-تریپتوفان از شرکت Merck و آلفا- متیل فنیل آلانین که از شرکت Sigma خریداری شدند.

محلول‌های استاندارد ذخیره فنیل آلانین، تیروزین، تریپتوفان و استاندارد داخلی را با غلظت ۵ میلی مول در لیتر و محلول اسید پرکلریک ۵۹٪ مولار تهیه گردید. تمام محلول‌های استاندارد ذخیره در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ماه پایدار است. جهت تهیه محلول استاندارد فنیل آلانین نهایی، ۰/۵ ml از استاندارد ذخیره Phe و ۴ ml از استاندارد داخلی ذخیره در یک بالن ژوژه ۱۰۰ ml ریخته و توسط آب دو بار تقطیر دیونیزه، به حجم رسید. غلظت Phe در این محلول برابر ۰/۰۰۴۱۳mg/ml (۲۵ میکرومول) است. جهت تهیه محلول استاندارد داخلی نهایی، ۱/۶ میلی‌لیتر از استاندارد داخلی ذخیره با آب دو بار تقطیر دیونیزه به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. غلظت آلفا- متیل فنیل آلانین در این محلول برابر ۰/۱۴۳۳ mg/ml است.

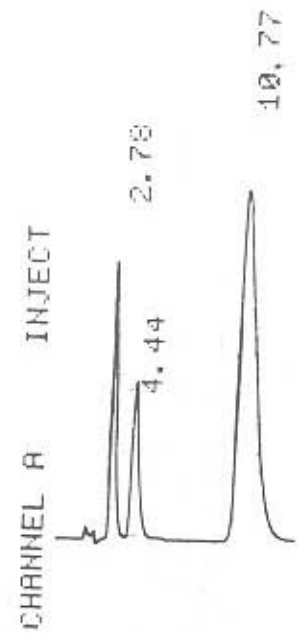
فاز متحرک و شرایط کروماتوگرافی. چون ماده پر کننده ستون C_{18} می‌باشد پس کروماتوگرافی از نوع فاز معکوس می باشد؛ یعنی، فاز ثابت دارای قطبیت اندک ولی فاز متحرک قطبی است و ابتدا موادی که قطبیت بالا دارند از ستون شسته می‌شوند. جهت انتخاب بهترین فاز متحرک، ابتدا استونیتریل ۱۰۰ ml/L در آب دوبار تقطیر دیونیزه استفاده گردید، که با کاهش درصد استونیتریل قدرت جداکردن اسیدهای آمینه از فاز ثابت کاهش یافت (افزایش زمان بازداری) تا اینکه بهترین نسبت فوق ۳۰ml/L (۳٪) استونیتریل در آب دو بار تقطیر دیونیزه بدست آمد.

علاوه بر قطبیت فاز متحرک، pH محیط نیز در حلالیت اسیدهای آمینه نقش به سزائی دارد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مناسب‌ترین pH به دست آمده برابر ۳/۱ بود. که با افزودن اسید پرکلریک (۷۰٪) pH فوق تنظیم گردید. با کاهش بیشتر pH، زمان نگهداری پیک‌ها افزایش می‌یابد. طول موج به کار گرفته شده در آشکارساز UV-VIS ۲۱۰ نانومتر بود و کلیه مراحل آنالیز در دمای آزمایشگاه (تقریباً ۲۲ درجه سانتیگراد) انجام گردید.

تعیین زمان بازداری. جهت تعیین زمان بازداری اسیدهای آمینه آروماتیک و آلفا-متیل‌فنیل‌آلانین، ابتدا محلول هر کدام از ترکیبات فوق به تنهایی تزریق گردید. پس از اطمینان از تکرار پذیری آنها، مخلوطی از اسیدهای آمینه فوق تزریق گردید(شکل ۱).



شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به مخلوط استاندارد اسیدهای آمینه. زمانهای بازداری ۲/۸۷، ۴/۴۴ و ۱۰/۷۷ به ترتیب مربوط به Phe،Tyr و Trp است.

نمونه گیری. نمونه گیری از ۲۰ نفر انجام شد که ۱۰ نفر مرد سالم با دامنه سنی ۲۵ تا ۳۵ سال و ۱۰ نفر بچه ۱ تا ۹ ساله مبتلا به PKU (مراجعه کننده به بخش تحقیقات و مشاوره ژنتیک انسانی بیمارستان شهید اکبر آبادی تهران) بودند.از ۱۰ نفر بیمار، ۸ نفر تحت درمان با رژیم غذایی بودند. خون گیری با استفاده از لانست و لوله‌های هماتوکریت هپارینه و از نوک انگشت صورت گرفت و پس از سانتریفوژ، پلاسمای آن توسط سرنگ هامیلتون جدا شد و تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

آماده کردن نمونه جهت تزریق. ۱۵ میکرولیتر از پلاسما را در یک لوله سانتریفوژ ریخته و هم حجم آن، استاندارد داخلی اضافه گردید (البته می توان از حجم ۱۰ میکرولیتر نیز استفاده کرد). بعد ۳۰ میکرولیتر اسید پرکلریک ۰/۵۹ مولار (جهت دپروتئینه کردن) به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه توسط شیکر مخلوط و سپس به مدت ۱۵ دقیقه به حالت ثابت قرار داده شد. بعد به مدت ۲ دقیقه در ۵۵۰۰×g سانتریفوژ گردید که از مایع رویی به میزان ۱۰ میکرولیتر، جهت تزریق استفاده شد.

تعیین غلظت Phe پلاسما. جهت تعیین غلظت Phe پلاسما، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محلول استاندارد Phe نهایی که حاوی استاندارد داخلی نیز می‌باشد به HPLC تزریق و سطوح زیر منحنی Phe و استاندارد داخلی بدست آمد. سپس ۱۰ میکرولیتر پلاسمای آماده شده را تزریق و سطوح زیر منحنی Phe و استاندارد داخلی نیز بدست آمد. با استفاده از رابطه زیر، غلظت Phe پلاسما را به دست آورده شد.

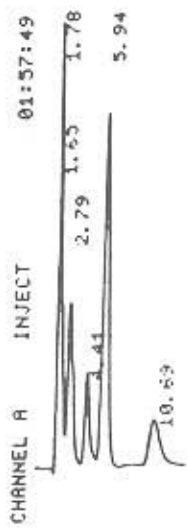
$$\frac{\text{سطح زیر منحنی استاندارد داخلی پلاسما}}{\text{سطح زیر منحنی استاندارد داخلی محلول استاندارد Phe}} \times \frac{\text{سطح زیر منحنی Phe محلول استاندارد}}{\text{سطح زیر منحنی Phe پلاسما}} = \frac{\text{غلظت Phe در محلول استاندارد نهایی (mg/ml)}}{\text{غلظت Phe در پلاسما (mg/ml)}}$$

چون پلاسما در هنگام آماده سازی به مقدار ۴ برابر رقیق شده است، نتیجه حاصل از رابطه فوق در عدد ۴ضرب گردید.

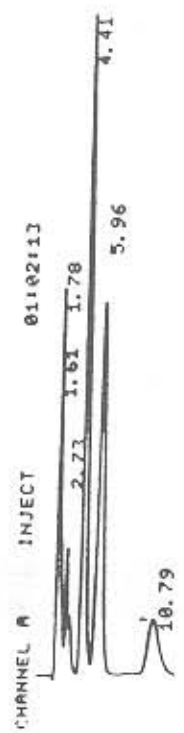
نتایج

شکلهای ۲، ۳ و ۴ به ترتیب کروماتوگرام های تیپیک مربوط به اندازه گیری غلظت Phe در افراد طبیعی، بیماران فنیل کتونوری تحت درمان با رژیم غذایی و بیماران فنیل کتونوری که هنوز تحت درمان قرارنگرفته بودند را نشان می دهد.

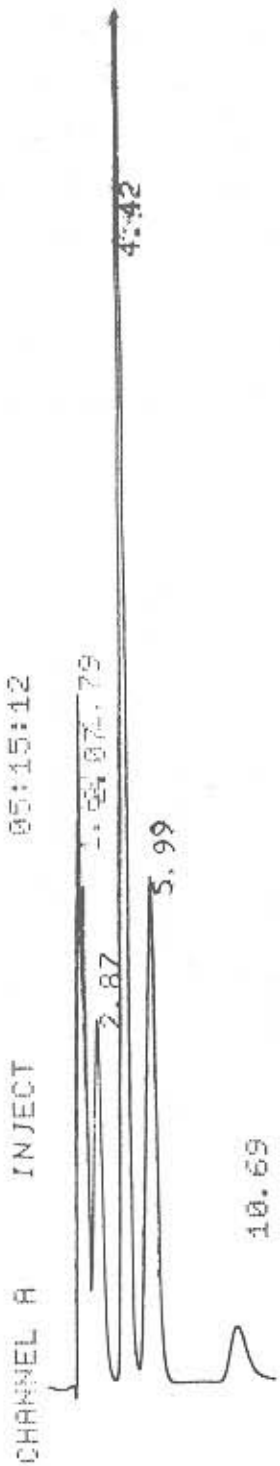
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل ۲. کروماتوگرام یک فرد طبیعی با غلظت Phe ۱۵۵µmol/L. زمانهای بازداری ۲/۷۹، ۴/۴۱، ۵/۹۴ و ۱۰/۶۱به ترتیب مربوط به Phe ، Tyr، استاندارد داخلی و Trp است.



شکل ۳. کروماتوگرام یک بیمار PKU تحت درمان با غلظت Phe ۹۶۰µmol/L. زمانهای بازداری ۲/۷۳، ۴/۴۱، ۵/۹۶، ۱۰/۷۹،به ترتیب مربوط به Phe،Tyr، استاندارد داخلی وTrp است

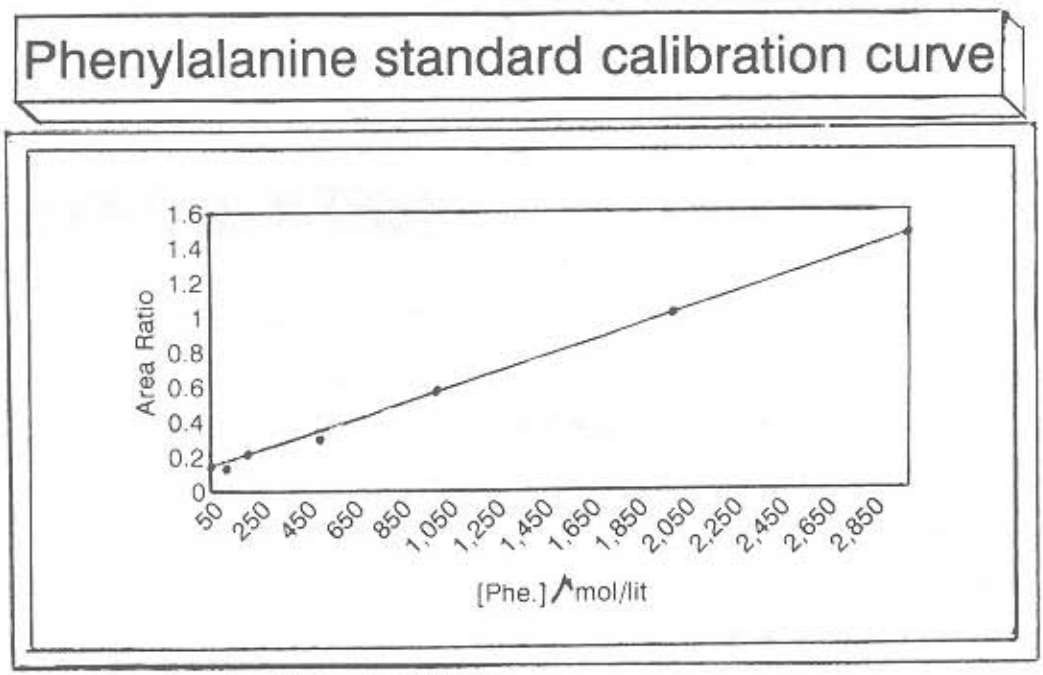


شکل ۴. کروماتوگرام یک بیمار PKU درمان نشده با غلظت Phe ۱۹۲۰ µmol/L .زمانهای بازداری ۲/۸۷، ۴/۴۲، ۵/۹۹ و ۱۰/۶۹ به ترتیب مربوط به Phe،Tyr، استاندارد داخلی و Trp است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

رسم منحنی استاندارد. برای رسم منحنی کالیبراسیون و اطمینان از خطی بودن جذب نسبت به تغییرات غلظت، رقت‌های مختلفی از محلول استاندارد Phe را به همراه غلظت ثابتی از استاندارد داخلی تهیه و تزریق گردید.

محاسبه درصد بازیافت Phe، طبق روش آماده سازی نمونه (۱۵ میکرولیتر پلاسما + ۱۵ میکرولیتر استاندارد داخلی نهایی + ۳۰ میکرولیتر اسید پرکلریک ۰/۵۹ مولار) به مقدار ۱۰ میکرولیتر تزریق گردید و همزمان ۱۵ میکرولیتر از همان نمونه را به همراه ۱۵ میکرولیتر



شکل ۵. منحنی کالیبراسیون استاندارد Phe، با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ میکرومول بر لیتر

نسبت $\frac{\text{سطح زیر منحنی استاندارد Phe}}{\text{سطح زیر منحنی استاندارد داخلی}}$ در برابر غلظت استاندارد، باید خط مستقیمی ایجاد کند که اولاً ضریب همبستگی بالا داشته باشد و در ثانی عرض از مبداء، این خط نزدیک صفر باشد. برای این منظور محلول‌هایی از استاندارد Phe با غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکرومول در لیتر تهیه گردید. غلظت استاندارد داخلی در تمام محلولها ثابت و برابر ۰/۳۵۸ mg/ml بود. خطی بودن منحنی کالیراسیون در محدوده غلظت‌های فوق از لحاظ آماری امتحان گردید که از ضریب همبستگی (r = ۰/۹۹۹۸) بسیار خوبی برخوردار بود(شکل ۵)

محاسبه درصد بازیافت (Recovery). برای استاندارد داخلی نهایی و ۳۰ میکرولیتر اسید پرکلریک ۰/۵۹ مولار دارای یک مقدار مشخص استاندارد Phe نیز آماده گردید. به طوریکه مقدار Phe افزوده شده در حجم تزریقی برابر mg ۰/۰۰۰۳۳ بود. که پس از تزریق و بررسی کروماتوگرام‌های مربوطه، مقدار درصد بازیافت Phe با استفاده از رابطه ذیل، (n =۱۰ و SD = ۴/۳) ۹۳/۸ ٪ به دست آمد.

$$\text{درصد خطا} = \frac{\text{مقدار Phe اضافه شده}}{\text{مقدار Phe مشاهده شده - مقدار Phe اضافه شده}} \times ۱۰۰$$

دقت (Precision): جهت کنترل دقت، از نمونه‌های پلاسما با غلظت‌های مختلف استفاده گردید و غلظت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Phe هر نمونه، ۱۰ مرتبه در روزهای مختلف اندازه گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱. داده‌های مربوط به کنترل دقت (n=۱۰).

Phenylalanine µmol/L		
%CV	SD	Mean
۲/۸	۱/۷	۶۱
۳/۳	۱۲/۵	۳۸۲
۲/۹	۳۵/۵	۱۲۱۰

بحث

بیماریابی نوزادان برای PKU در بعضی کشورها در روزهای ششم تا دهم بعد از تولد انجام می‌شود[۲]. نمونه‌های خون مویرگی، برای تعیین غلظت تقریبی Phe توسط کروماتوگرافی کاغذی، فلوریمتری و تست مهاری گاتری آنالیز می شود. با تأیید فنیل کتونوری، رژیم غذای با Phe محدود شروع می شود و غلظت Phe پلاسما، به منظور ارزیابی تأثیر رژیم غذای، باید بطور مداوم اندازه گیری شود. یک روش دقیق اندازه گیری Phe در پلاسما، استفاده ازدستگاه HPLC می‌باشد. با توجه حساس بودن و تکرار پذیری بسیار خوب، از ستون µBondapak-C_{18} و آشکار ساز (UV-VIS) جهت اندازه گیری Phe در پلاسما استفاده شد. با مقایسه روش‌ها، روش Atherton و همکاران [۲] انتخاب گردید. در روش Atherton به pH دقیق فاز متحرک اشاره نگردیده است. لذا ما در pH=۳/۹ به یک جداسازی مطلوب دست یافتیم. همچنین در روش Atherton از حجم های ۵۰ میکرولیتری پلاسما استفاده گردیده بود. با توجه به این که در تهیه خون وریدی از اطفال محدودیت وجود دارد، روش آماده سازی نمونه طوری اصلاح گردید تا با حجم کم پلاسمای بدست آمده از خون مویرگی توسط لوله هماتوکریت، غلظت های قابل اندازه گیری به وسیله آشکارساز (UV-VIS) به دست آید. همچنین در این مطالعه، علاوه بر Phe، غلظت تیروزین (Tyr) و تریپتوفان (Trp) نیز قابل اندازه‌گیری است که دانستن همزمان غلظت Phe و Tyr پلاسما در درمان PKU حائز اهمیت می باشد. البته روش‌های دیگری نیز جهت اندازه‌گیری Phe پلاسما توسط HPLC ارائه شده است که نسبت به روش کار مطالعه کنونی، پیچیده‌تر بوده و یا از آشکارسازهای ویژه‌ای استفاده گردیده است که در دسترس اکثر آزمایشگاه‌ها نیست. برای مثال، Neckers و همکاران نیز با استفاده از آشکار ساز فلورسانس و مشتق سازی، Phe را اندازه‌گیری کردند[۹]. Hilton [۴] با استفاده از ستون ODS، آشکارساز UV در طول موج ۲۰۶ nm و فاز متحرک متانول/اسید فسفریک Phe را اندازه‌گیری کرد، ولی مراحل آماده سازی پلاسما کمی پیچیده است؛ چون در این روش با استفاده از اسید پرکلریک و هیدروکسید پتاسیم و چندین مرحله سانتریفوژ، نمونه آماده می‌شود و از طرفی زمان آنالیز حدود ۲۳ دقیقه است. Lefeng Z. و همکاران[۶] با استفاده از ستون ODS و آشکار ساز UV و فاز متحرک متانول، آب، اسید فسفریک و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، Phe را اندازه گیری کردند. در روش فوق نیاز به استخراج Phe پلاسما با استفاده از اتانل و کلروفرم است که نیاز به حجم زیادی از پلاسما می باشد. Kok و همکاران[۵] Phe را با آشکار ساز الکتروشیمیایی اندازه‌گیری کردند. Rudy [۱۱] توسط مشتق سازی Phe با فنیل ایزوتیوسیانات و به کمک یک سیستم اتوماتیک، اسیدهای آمینه آروماتیک را اندازه گیری کردند.

با توجه به مطالب فوق، مزایای روش به کار گرفته شده در این تحقیق عبارت است از:

الف ـ استفاده از آشکار ساز UV-VIS، که در دسترسترین آشکار ساز است.

ب ـ مراحل آماده سازی نمونه ساده و سریع است.

ج ـ به مشتق سازی نیازی ندارد.

د ـ زمان آنالیز از هنگام تزریق، کمتر از ۱۲ دقیقه است.

هـ ـ به مقدار کمی پلاسما (۱۵ میکرولیتر) نیاز است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

سپاسگذاری

از جناب آقای دکتر محسن امینی و پرسنل محترم گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی، گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات و مشاوره ژنتیک انسانی بیمارستان شهید اکبرآبادی تهران تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

[1] Aambros, J.A., Analysis of the report on a coperative study of various fluorometric procedures and the Guthrie bacterial inhibition assay in the determination of hyperpheylalaninemia, Health Lab. Sci., 10 (1973) 180-187.

[2] Atherton, N.D. and Green A., HPLC measurment of phenylalanine in plasma, Clin. Chem., 34 (1988) 2241-2244.

[3] Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., Tietz textbook of clinical chemistry, Third Edition, 1999 pp. 454-457.

[4] Hilton, M.A., Liquid - chromatographic direct determination of phenylalanine and tyrosine in serum or plasma, with applications to patients with phenylketonuria, Clin. Chem., 28 (1982) 1215-8.

[5] Kok, W., Brinkman, U. and Frei, R.W., Rapid determination of phenylalanine and tyrosine in urine and serum by HPLC with electrochemical detection. J. Pharm .Biomed. Anual,1 (1983) 369-72.

[6] Lefeng Z., Yunlu Y. and Ruiyu Y., Direct determination of phenylalanine in serum extracts of phenylketonuria patients by reversed phase high performance liquid chromatography, J. Chrom., 282 (1983) 333-9.

[7] Matalon, R. and Michals K., Phenylketonuria, screening, treatment and maternal PKU, Clin. Biochem., 24 (1991) 337-342.

[8] McCamin, M.W. and Robins E., Fluorometric method for the determination of phenylalanine in sreum , J, Lab, Clin, Med., 59 (1962) 885-90.

[9] Neckers, L.M., Delisi, E. and Wyatt, R.J., Liquid-chromatographic quantitation of plasma phenylalanine, tyrosine and tryptophan, Clin. Chem., 27 (1981) 146-148.

[10] Perry, T.L. and Hansen, S., Technical pitfalls leading to errors in the quantitation of plasma amino acids, Clin. Chem., 25 (1969) 53-58.

[11] Rudy, J.L., Rutledge, J.C. and Lewis , S.I., Phenylalanine and tyrosine in serum and eluates from dried blood spots as determind by reversed-phase liquid chromatography, Clin. Chem., 33 (1987) 1152-1154 .

[12] Spierto, F.W., Whitefild, F.W., Aptz, M . and Honon, W., Liquid chromatographic measurment of phenylalanine and tyrosine in serum, Clin. Chem., 28 (1982) 2282-2286.

[13] Tarr, G. E., Rapid separation of amino acid phenylthiohydantoins by isocratic high-performance liquid chromatography, Anual Biochem., 111 (1981) 27-32.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

HPLC measurment of phenylalanine in plasma, with application to patients with phenylketonuria

A.R. Bandegi [*1] (M.Sc) , M. Doosti [2] (Ph.D),

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences.
[2] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Sciences.

Introduction. Diagnosis and treatment of phenylketonuria (PKU) requires measurment of phenylalanine (Phe) in serum or plasma. The aim of this study was to use a simple and rapid method for measurment of Phe.

Materilas and Methods. Phe is determined by isocratic high performance liquid chromatography (HPLC) method, with UV-VIS detection in 210 nm , octadecyl-silane (ODS) column and the mobile phase of acetonitril/water. For this measurment 10 microliter plasma was used and complet analysis was done at less than 12 min from injection.

Results. Coeifficients of variation (% CV) for human plasma sample (Phe, 60-1200 mmol/L) ranged between 2.8% and 3.3%. The method has wide linear range (10-3000 mmol/L).

Conclusion. In this method preparation of sample is simple and rapid. This method has an high efficiency for measurment of Phe concentration in the normal and PKU subjects.

Key words: Phenylketonuria; Phenylalanine; Measurment; Plasma; High Performance Liquid Chromatography

* Corresponding authour.Fax: 0231- 31551; Tel:0231-32080

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]