

Humán Szérum Tokoferol- és Ubikinonszintek Bioanalitikai Vizsgálata

Bajtai Attila^{1*}, Veres Gábor^{1,3}, Szpisjak László¹, Ilisz István², Klivényi Péter¹, Vécsei László^{1,3}, Zádori Dénes^{1‡}

¹Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Neurológiai Klinika, Semmelweis u. 6, 6725 Szeged

²Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Dóm tér 7, 6720 Szeged

³MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoport, Semmelweis u. 6, 6725 Szeged

Abstract

The vitamin E group of compounds and ubiquinone are widely known substances with antioxidant properties. However, the setup of high-performance liquid chromatography (HPLC) methods for the detection of these molecules in human serum are often difficult. We report here a reversed-phase HPLC method using diode array detection and a single C18 column separation kept at 25 °C with an isocratic system of acetonitrile, tetrahydrofuran, methanol, ammonium acetate and water at a flow-rate of 2.1 mL/min. This method resolves 3 tocopherols (α , γ , δ) and ubiquinone from human serum within 17 minutes with the application of tocol as an internal standard. We conclude that our procedure provides an adequate sample preparation and separation of the 3 examined tocopherols (α , γ , δ). Although the developed method has been proven to be efficient, accurate and inexpensive, further improvements in the quantitative assessment of ubiquinone are necessary.

Bevezetés

A tokoferolok (E-vitamin) antioxidáns sajátása jól ismert és ennek köszönhetően hatásos védelmet nyújtanak az oxidatív stressz ellen többek között az artériák, kapillárisok, vérben található lipidek és az idegszövet esetén [1]. Az ubikinon, más néven koenzim Q10, minden sejtben és membránban megtalálható molekula. A légzési lánc egyetlen olyan elektron átvivője, amely nem kötődik kovalens kötéssel fehérjéhez, ezért a mitokondrium belső membránjában viszonylag szabadon mozoghat. A légzési láncban betöltött szerepe mellett zsírban oldódó antioxidánsként nélkülözhetetlen a jelenléte főként a lipidek védelméhez a szervezetben kialakuló oxidatív stressz ellen [2].

Számos neurológiai kórkép kialakulásában, lefolyásában az antioxidáns rendszer nem megfelelő működése kóros szereppel bírhat. Erre példa az ataxia izolált E-vitamin hiánnyal (ataxia with vitamin E deficiency, AVED), mely esetén az α -tokoferol transzport zavart a májsejtekben [3], így a szervezetben kialakuló alacsony koncentrációja miatt nem képes a megfelelő antioxidáns védelem biztosítására. Ezért e kórképek esetén a vérben található tokoferolok pontos mennyiségének ismerete az egyéb felszívódási zavarok kizárása esetén, például AVED vonatkozásában diagnosztikus szereppel bírhat.

Célunk egy olyan bioanalitikai metodika kidolgozása és validálása volt, mellyel tokoferolok (α -, γ -, δ -tokoferol) és az ubikinon mennyiségét gyorsan és megbízhatóan mérhetjük humán szérum mintákban.

Metodika

A humán szérum minták sárga kupakos vérvételi csőben kerültek levételre, melyek szeparáló gélt tartalmaznak, amely centrifugálást követően stabil határt képez a szérum és a vérszövetek között. Fél óra véralvadást követően 10 percig 3500 fordulat/perc sebességgel 4 °C-

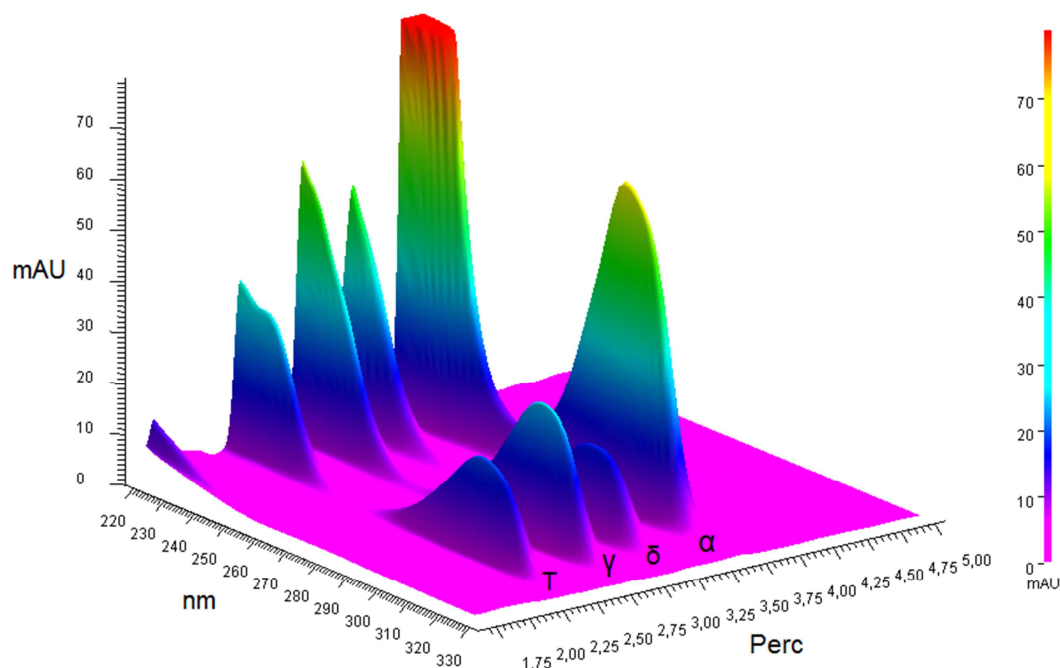
on hűtve lettek centrifugálva. A centrifugálás után a felső folyadékfázist kinyertük és azonnal stabilizáltuk 2,2 mL-es Eppendorf csövekbe 200 μ L-es részletekben szétosztva: 200 μ L 85 mM-os aszkorbinsav vizes oldat, majd 400 μ L 1,13 mM-os BHT-s etanol oldat hozzáadását követően 10 másodperc vortex kevertetéssel. Az így kapott oldatot tekintettük a továbbiakban a tényleges mintának, amely $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hónapokig változatlan állapotban tárolható.

Ezt követően a mintákhoz 600 μ L 1,13 mM koncentrációban BHT-t és rac-tocolt 10 μ M-ban tartalmazó hexán oldatot adtunk. Pontosan 1 percen keresztül kevertettük vortex segítségével az oldatokat. Ezután a hexános és etanolos fázist elválasztandó 3000 fordulat/perc-es sebességgel 5 percig centrifugáltunk. A centrifugálást követően a felső, hexános fázisból 450 μ L-t bepároltunk N_2 gázzal hozzávetőlegesen 15 perc alatt. Ezután a visszamaradt komponenseket 28,57 V/V% EtOH, 28,57 V/V% dioxán, 42,86 V/V% ACN elegyben oldottuk és 10 másodpercig vortexszel homogenizáltuk, így injektálásra és elválasztásra kész állapotba hozva a mintákat.

Az elválasztáshoz Alltech Prevail C18 (150x4,6 mm; 5 μ m) oszlopot használtunk 25 $^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten termosztálva. A kolonna védelme érdekében előtét kolonnát használtunk: Security Guard C18 (4x3 mm).

A mobilfázis összetétele: 66,54 V/V% acetonitril, 21,40 V/V% tetrahydrofuran, 6,61 V/V% metanol, 2,72 V/V% ammónium-acetát 1 vegyes százalékos oldata, 2,72 V/V% desztillált víz. A mobilfázist minden mérés előtt frissen készítettük és az elkészítését követően kerámiaszűrőn 0,45 μ m-es pórusméretű hidrofób PVDF membránszűrőn vízsugárszivattyú segítségével szűrtük. A mobilfázis áramlási sebessége 2,1 mL/perc volt. Minden mintából 50 μ L térfogatot injektáltunk a mérések során.

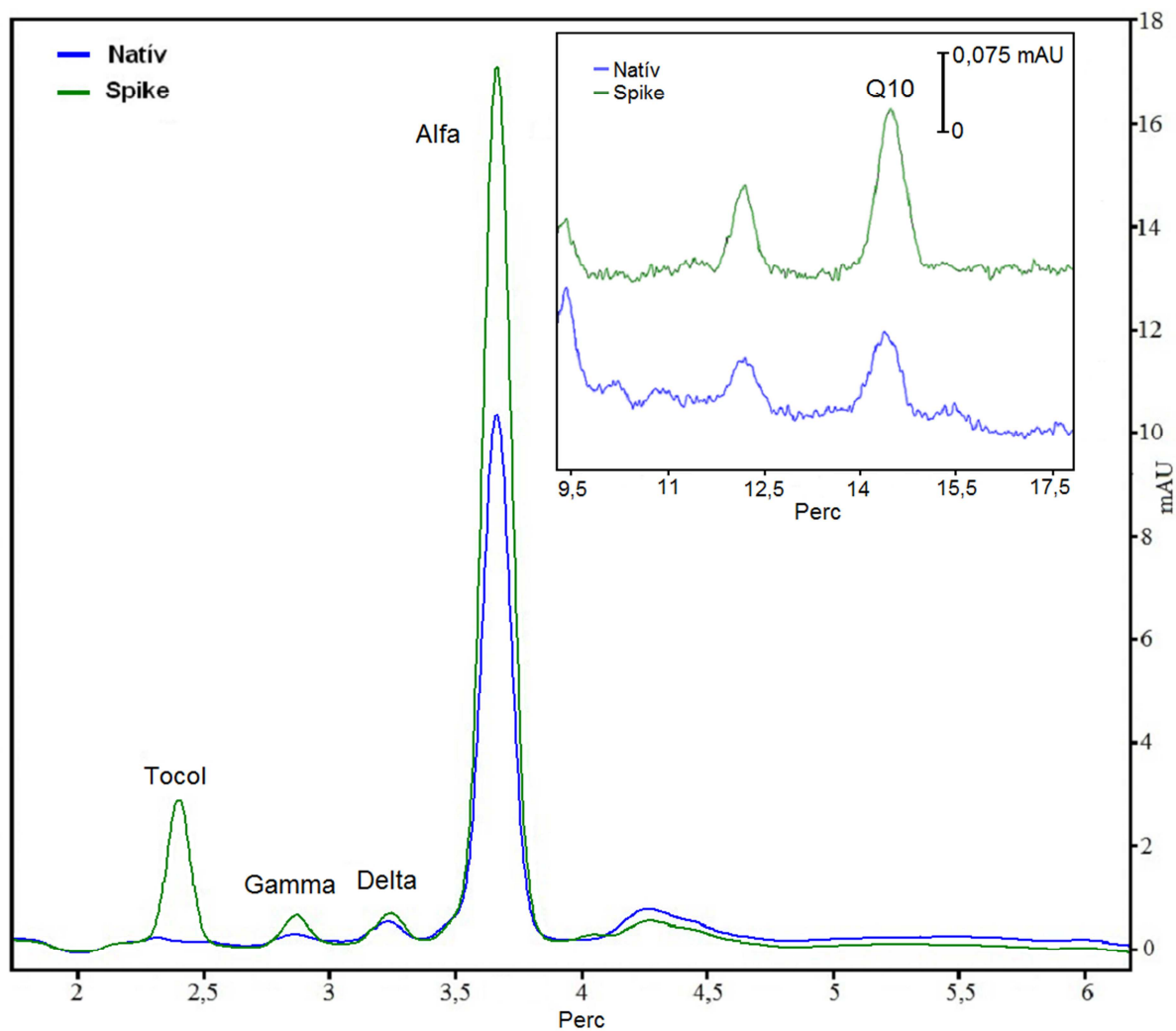
Az analit koncentrációk méréséhez Agilent 1260 diódasoros detektorral meghatároztuk az optimális mérési hullámhosszokat. Ehhez rögzítettük 190 és 800 nm hullámhossz tartományban az abszorbanciát az idő függvényében megnövelt analit tartalmú szérums minta mérése közben. Ennek egy részletét mutatja be az 1. ábra.



1. Ábra: Humán szérums minta kromatogram részlete a hullámhossz függvényében, T: tocol; α , γ , δ : α -, γ -, δ -tokoferol

Eredmények és értékelésük

Az elválasztandó komponensek szelektivitásának meghatározására a biológiai mátrixot hat különböző forrásból származó humán szérum minta összekeverésével alkottuk. A mérendő komponensek azonosításához ismert koncentrációjú analit addíciójával mért mintákat hasonlítottunk össze az azonos eredeti összetételű addíció nélküli (vak) oldatokkal, ezt mutatja be a 2. ábra.



2. Ábra: Humán szérum minta kromatogram részlete 292 nm-en tocol, α -, γ -, δ -tokoferol oldatokkal spikeolva, a kis ábrán az ubikinon oldattal spikeolt kromatogram részlet látható 276 nm-en

A precizitás meghatározása során hat párhuzamos mérést végeztünk, melyek eredményeiből számított relatív standard deviációkat az 1. táblázat tartalmazza. Nem biológiai mátrixok esetén a precizitás értéke 5% alatt kell, hogy maradjon, míg biológiai minták esetén 15%-os relatív standard deviáció az általánosan elfogadott érték. A belső standardot nem validáltuk, mivel abból a nekünk megfelelő mennyiséget használtunk minden méréshez.

A mérendő anyag visszanyerhetőségének vizsgálata során a biológiai mátrixhoz ismert, két különböző koncentrációban hozzáadtuk a vizsgált anyagokat és 3 párhuzamos méréssel megállapítottuk az analitok koncentrációját. A hozzáadott analitokat tartalmazó oldatok koncentrációiból levontuk a vak oldatban mért analitok koncentrációit. A kapott

eredményt összehasonlítottuk az elvárt ismert koncentrációkkal, amit százalékosan adtunk meg. A visszanyerésnek nem kell 100%-nak lennie, de legyen konzisztens, pontos és reprodukálható.

Az ubikinon esetén a mérés precizitása és a kalibrációs egyenes R^2 értéke további fejlesztést tesz indokolttá.

Eredmények					
	α -tokoferol	δ -tokoferol	γ -tokoferol	Q10	tocol
Mérési hullámhossz (nm)	292	297	297	276	297
Retenciósi idő (perc)	3,7	3,3	2,9	15,5	2,3
Standardsor tartománya (μ M)	0 - 40	0 - 6	0 - 6	0 - 2,4	0 - 24
Kalibrációs egyenes R^2	0,9934	0,9985	0,9996	0,9840	0,9999
Precizitás - RSD%	4,066	2,949	15,187	20,134	-
Visszamerítettség %	87,7 - 104,5	95,4 - 108,4	116,2 - 123,8	106,7 - 116,9	-

1. Táblázat: Az elválasztott komponensek és validálásuk adatai

Összefoglalás

Sikerült megfelelő mintaelőkészítést tartalmazó analitikai eljárást kidolgoznunk humán szérum minták α -, δ -, γ -tokoferol belső standard melletti koncentráció-meghatározására. Az ubikinon koncentráció megbízható meghatározására további fejlesztések szükségesek. Az eredményeink a szakirodalmi adatokkal összhangban vannak [4]. Metodikánk nemcsak a kutatások során, hanem a későbbiekben akár a mindennapi orvosi diagnosztikában is jól hasznosítható eredményekkel szolgálhat.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Nemzeti Agykutatási Program - KTIA_13_NAP-a-III/9 és az MTA-SZTE Idegtudományi kutatócsoport támogatta.

Referenciák

- [1]Hacquebard M., Carpentier Y. A., Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2005;8:133-138.
- [2]Bentinger M., Brismar K., Dallner G., Mitochondrion, 2007;7S:S41-S50.
- [3]Eggermont E., European Journal of Pediatrics, 2006;165:429-434.
- [4]Lai J. F., Franke A. A., Journal of Chromatography B, 2013;931:23-41.