

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra analytické chemie



**Úprava biologického materiálu před
HPLC analýzou - Stanovení α -tokoferolu
v erytrocytární membráně**

Diplomová práce

Hradec Králové 2010

Bc. Nad'á Pospíchalová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové

Květen 2010

Naďa Pospíchalová (v. r.)

Poděkování:

Děkuji RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení a za poskytnutí podkladů. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Plíškovi, Mgr. Markétě Kašparové a Mgr. Lence Krčmové za jejich vstřícný přístup, cenné rady a čas, který mi věnovali. Děkuji i vedení Gerontologické a metabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, které mi poskytlo své prostory ke zpracování praktické části mé diplomové práce.

OBSAH

Obsah.....	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1. Úvod ...	8
2. Cíle.....	8
3. Teoretická část.....	10
3.1. Centrifugy.....	11
3.1.1. Principy činnosti a vztahy.....	11
3.1.2. Typy centrifug.....	15
3.1.3. Typy rotorů.....	15
3.1.4. Metody centrifugace.....	16
3.2. Extrakce tuhou fází.....	20
3.2.1. Princip a význam SPE.....	20
3.2.2. Instrumentace SPE.....	21
3.2.3. Sorbenty SPE.....	22
3.2.4. Základní postup provedení SPE.....	25
3.3. Vitamín E.....	28
3.3.1. Struktura a vlastnosti vitamínu E.....	28
3.3.2. Zdroje vitamínu E.....	29
3.3.3. Vstřebávání, transport a distribuce vitamínu E.....	29
3.3.4. Volné radikály a teorie stárnutí.....	30
3.3.5. Úloha vitamínu E v lidském organismu.....	31
3.3.6. Deplece a toxicita vitamínu E.....	33
3.3.7. Vitamín E v erytrocytární membráně.....	34
3.3.8. Stanovení vitamínu E v erytrocytární membráně.....	37
4. Praktická část.....	41
4.1. Přístrojové vybavení a chemikálie.....	42

4.1.1. Přístrojové vybavení.....	42
4.1.2. Chemikálie.....	43
4.1.3. Standardy.....	44
4.1.4. Příprava zásobních a pracovních roztoků	44
4.2. Původní metody pro stanovení α -tokoferolu z erytrocytární membrány ...	46
4.2.1. Promytí erytrocytů	46
4.2.2. Liquid-liquid extrakce.....	46
4.2.3. Příprava vzorku a postup SPE.....	47
4.2.4. Podmínky HPLC analýzy	48
4.3. Výsledky a diskuze.....	48
4.3.1. Experiment s naředěnými erytrocyty	49
4.3.2. Vliv ultracentrifugačního kroku na vnitřní standard.....	50
4.3.3. Vnitřní standard v roztoku HEPES.....	51
4.3.4. Objem promytých erytrocytů	52
4.3.5. Ztráty vnitřního standardu	54
4.3.6. Odpaření vnitřního standardu	57
4.3.7. Nanesení vnitřního standardu do objemu vzorku na SPE kolonku	59
4.3.8. Vliv objemu vnitřního standardu.....	60
4.3.9. Eluční objem	63
4.3.10. Opakovatelnost	64
4.3.11. Správnost	66
5. Závěr... ..	69
Seznam zkratk	71
Použitá literatura	73

ABSTRAKT

α -Tokoferol je hlavním antioxidantem buněčných membrán savců, jeho účinky však nespočívají pouze v antioxidační aktivitě. Řada studií poukazuje na to, že hladiny α -tokoferolu v membráně erytrocytů vypovídají lépe o jeho saturaci organismu než hladiny plasmatické. Tato diplomová práce se zabývá stanovením α -tokoferolu pomocí HPLC-UV s využitím diferenciální ultracentrifugace a extrakce tuhou fází (SPE) v přípravě vzorku. Vzorky erytrocytů byly ultracentrifugovány ($288\,000 \times g$, 3 minuty, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) v přítomnosti butylhydroxytoluenu (BHT), D-mannitolu, HEPES a CaCl_2 . Poté byl α -tokoferol extrahován z membrán erytrocytů hexanem pomocí extrakce na tuhou fází za použití kyseliny askorbové a vnitřního standardu tokoferol acetátu. Extrakt, rozpuštěný v methanolu, byl separován na monolitické koloně Chromolith Performance RP-18e ($100 \times 4,6\text{ mm}$) 100% methanolovou mobilní fází. Absorbance byla změřena při 295 nm.

ABSTRACT

α -Tocopherol is the principal membrane antioxidant in mammalian cells, although antioxidant is not the only mechanism of this vitamin. Many studies consider erythrocyte α -tocopherol levels to be more suitable to assess the tocopherol status of organism than its plasma levels. This thesis presents erythrocyte membranes α -tocopherol HPLC-UV analysis with differential ultracentrifugation and solid phase extraction sample pretreatment. Red cell samples were ultracentrifuged ($288\ 000 \times g$, 3 minutes, $4\ ^\circ\text{C}$) in the presence of butylated hydroxytoluene (BHT), D-mannitol, HEPES and CaCl_2 . Then α -tocopherol was extracted from erythrocyte membranes by solid phase extraction with n-hexane in the presence of ascorbic acid and tocopherol acetate internal standard. The extract was dissolved in methanol and separated on the monolithic column Chromolith Performance RP-18e ($100 \times 4.6\ \text{mm}$) using a 100% methanol as the mobile phase. The absorbance of α -tocopherol was measured at 295 nm wavelength.

1. ÚVOD

Příprava biologických vzorků pro analýzu extrakcí tuhou fází (solid phase extraction, SPE) nachází v současnosti široké uplatnění v řadě klinických i forensních oborů. Tato extrakční metoda je vysoce selektivní a nabízí dobrou výtěžnost při malé spotřebě biologického materiálu i extrakčních činidel a možnost on-line napojení na analytické systémy. V této diplomové práci se věnujeme úpravě biologického vzorku, lidských erytrocytů, před analýzou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Z erytrocytárních membrán, které izolujeme pomocí diferenciální ultracentrifugace, extrahujeme právě pomocí extrakce tuhou fází α -tokoferol, významný liposolubilní antioxidant erytrocytární membrány. Stanovení α -tokoferolu v erytrocytárních membránách může sloužit jako marker saturace organismu vitamínem E nebo rizika rozvoje aterosklerózy, při monitorování hemolytických stavů indukovaných cytostatiky, řady hemolytických anémií či sledování dopadu LDL aferéz.

2. CÍLE

Praktická část této diplomové práce navazuje na práce předešlé, zpracované ve Výzkumné laboratoři GMK FNHK, zabývající se přípravou biologického vzorku a HPLC analýzou pro stanovení liposolubilních vitamínů v různých biomatricích. Zejména jsem navazovala na práce Mgr. Plíška a Mgr. Denkové postupem přípravy vzorku pro stanovení α -tokoferolu v erytrocytární membráně využívající separační techniku diferenciální ultracentrifugace, extrakční techniku SPE a stanovení již vyvinutou a validovanou HPLC metodou. Cílem této diplomové práce bylo pokračovat v optimalizaci tohoto postupu přípravy vzorku, zpřesnit stanovení α -tokoferolu použitím metody vnitřního standardu a nově vyvinutou metodu částečně zvalidovat.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Centrifugy

Centrifugy jsou v širším smyslu zařízení, která pomocí kruhového pohybu vytvářejí odstředivé zrychlení. V užším smyslu jsou centrifugy laboratorní přístroje, které vlivem kruhového pohybu ovlivňují sedimentaci částic v roztoku.

Centrifugace je separační metoda, která se v laboratořích používá hlavně k urychlování sedimentace, odstranění sraženin, oddělování suspendovaných částic od kapaliny, dělení směsí kapalin, k určování velikosti částic, rozdělování makromolekul podle hustoty či velikosti a izolaci nebo odstranění buněk a subcelulárních částic.¹

3.1.1. Principy činnosti a vztahy

Pohyb po kružnici

Pohyb po kružnici popisujeme dráhou s , tedy velikostí opsaného oblouku úhlem φ (rad), který opíše spojnice pohybujícího se bodu se středem otáčení a poloměrem otáčení r (m). Dále u kruhového pohybu určujeme úhlovou rychlost ω (rad. s⁻¹), definovanou následujícím vztahem:

$$\omega = \frac{d\varphi}{dt}$$

Pro vztah mezi úhlovou rychlostí ω (rad. s⁻¹) a rychlostí v (m. s⁻¹) platí:

$$\omega = \frac{v}{r}$$

Pro rovnoměrný pohyb po kružnici ($\omega = \text{konst}$) určujeme ještě frekvenci otáček f (Hz, rpm):

$$f = \frac{1}{T},$$

kde perioda T (s) je definována jako doba oběhu. Jednotkou frekvence je hertz (Hz), často se v případě centrifug udává frekvence v počtu otáček za minutu rpm (1 rpm = 1/60 Hz).¹

Mezi úhlovou rychlostí, která se někdy označuje jako kruhová frekvence, a frekvencí platí následující převodní vztah:

$$\omega = 2\pi f$$

Na těleso, pohybující se po kružnici, působí tzv. odstředivé zrychlení a_0 ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$). Velikost tohoto zrychlení je možno vypočítat ze vztahu:

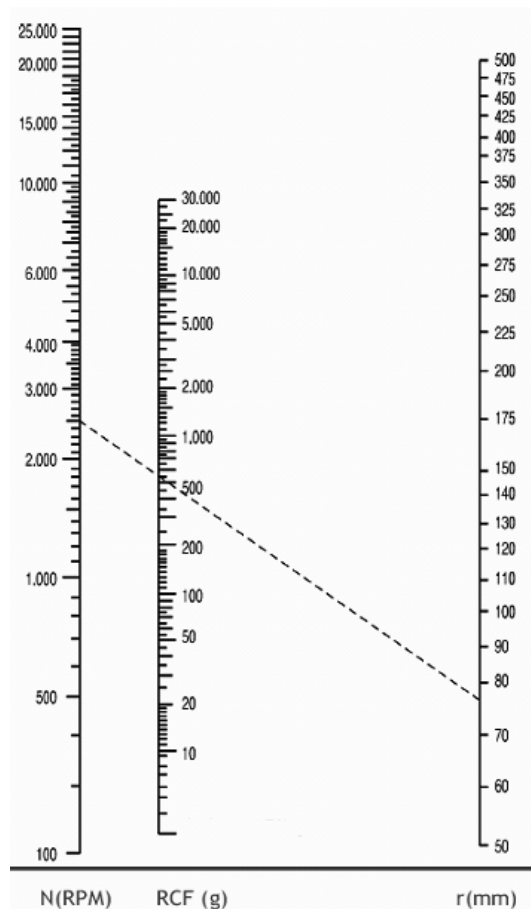
$$a_0 = \omega^2 \cdot r$$

U centrifug je zvykem udávat odstředivé zrychlení v násobcích zemského gravitačního zrychlení ($g \cong 9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$). Takto udávané zrychlení se označuje jako relativní odstředivé zrychlení nebo také relativní odstředivá síla RCF .

$$RCF = \frac{\omega^2 \cdot r}{g}$$

Relativní odstředivá síla závisí na frekvenci (rpm) a poloměru otáčení r .^{1, 2}

$$RCF = 11,18 \cdot r \cdot \left(\frac{f}{1000}\right)^2$$



Obr. 1 Nomogram

Relativní odstředivou sílu lze také zjistit z nomogramu (Obr. 1). Tento způsob je využíván zejména pro přibližné zjištění možné relativní odstředivé síly centrifug dosahujících nižších maximálních rychlostí. Výhodou je možnost relativně rychlého zjištění *RCF* v kterékoliv hloubce centrifugační kyvety.³

Převodní vztah pro výpočet počtu otáček za minutu (rpm) z relativní odstředivé síly a poloměru otáčení (cm) je následující:

$$f = 299 \cdot \sqrt{\frac{RCF}{r}}$$

Sedimentace

Pokud je kyveta se suspenzí v centrifuze umístěna tak, aby odstředivé zrychlení působilo ve směru osy kyvety, působí na suspendované částice síla podle Stokesova zákona.¹

$$\frac{1}{6} \pi \cdot d^3 \cdot (\rho_p - \rho_l) \cdot a_0 = 3 \pi \cdot d \cdot \mu \cdot v,$$

kde d je průměr částice, a_0 je zrychlení (v případě centrifug se jedná o odstředivé zrychlení, ρ_p je hustota částice, ρ_l je hustota kapaliny a μ je viskozita kapaliny.

Je-li hustota částic větší než hustota kapaliny, pak se částice pohybují ve směru odstředivého zrychlení a po jisté době se hromadí na konci kyvety, který je vzdálenější od osy otáčení. Zanedbáme-li vliv difúze, je rychlost sedimentace ideálně kulovité částice dána Stokesovým vztahem:^{1, 4}

$$v = \frac{d^2 \cdot (\rho_p - \rho_l) \cdot a_0}{18\mu}$$

Ze Stokesova vztahu vyplývá:

- Rychlost sedimentace dané částice je úměrná velikosti této částice.
- Rychlost sedimentace je úměrná rozdílu mezi hustotou částice a hustotou kapaliny.
- Rychlost sedimentace se rovná nule v případě, když se hustota částice rovná hustotě kapaliny.

- Rychlost sedimentace vzrůstá se vzrůstajícím odstředivým zrychlením.
- Rychlost sedimentace klesá se zvyšující se viskozitou kapaliny.⁴

K popisu velikosti částic (např. buněčných organel) se v některých případech využívá sedimentačního koeficientu s (S), přičemž jednotka jeden svedberg odpovídá přesně času 10^{-13} s. K výpočtu sedimentačního koeficientu lze použít tento vztah:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{v}{a_0},$$

kde v je rychlost sedimentace, ω je úhlová rychlost, r je vzdálenost částice od středu otáčení, a_0 je odstředivé zrychlení.^{1, 4}

Účinnost rotoru

Účinnost sedimentace konkrétního rotoru lze vyjádřit pomocí k-faktoru. Ten je dán poměrem maximálního a minimálního poloměru otáčení obsahu centrifugační kyvety, jež souvisí s mírou naplnění centrifugační kyvety. Tyto poloměry, použité v následujícím vzorci, se tedy mohou lišit od maximálního a minimálního poloměru otáčení rotoru udávaného výrobcem rotoru.³

$$k = \frac{2,53 \cdot 10^{11}}{f^2} \cdot \ln\left(\frac{r_{\max}}{r_{\min}}\right),$$

kde f je počet otáček za minutu, r_{\max} a r_{\min} viz výše.

K-faktor určuje dobu t (h) potřebnou k sedimentaci částice o velikosti 1 S. Čím je tato doba kratší, tím je rotor účinnější. Tento vztah vyjadřuje rovnice:

$$t = \frac{k}{s}$$

K-faktor udávaný výrobcem odpovídá maximálnímu počtu otáček za minutu f_{\max} . Při využití nižšího počtu otáček za minutu f_{new} se hodnota nového k-faktoru vypočítá pomocí vzorce:

$$k_{\text{new}} = k \cdot \left(\frac{f_{\max}}{f_{\text{new}}}\right)^2$$

I malý rozdíl počtu otáček za minutu tak může díky druhé mocnině významně ovlivnit hodnotu nového k-faktoru.³

Při výměně rotoru lze dobu běhu centrifugace určité metody přepočítat pomocí k-faktorů. Pro dva rotory A a B pak platí:²

$$\frac{t_A}{t_B} = \frac{k_A}{k_B}$$

3.1.2 Typy centrifug

Centrifugy se nejčastěji rozdělují podle dosahovaného relativního odstředivého zrychlení, respektive frekvence otáček, na nízkoobrátkové, vysokoobrátkové a ultracentrifugy.³

K vybavení běžné klinicko-biochemické laboratoře, provádějící standardní vyšetření, postačují zpravidla nízkoobrátkové centrifugy s relativním odstředivým zrychlením 8 000 g a frekvencí otáček 2 000 – 6 000 rpm. Používají se zejména urychlení sedimentace rostlinných a živočišných buněk.

Vysokoobrátkové centrifugy pracují zpravidla bez vakua a bývají chlazené. Pomocí nich dosáhnout relativního odstředivého zrychlení až 60 000 g a frekvence otáček 18 000 – 22 000 rpm. Lze jimi navíc separovat bakterie, buněčná jádra a některé membránové organely.

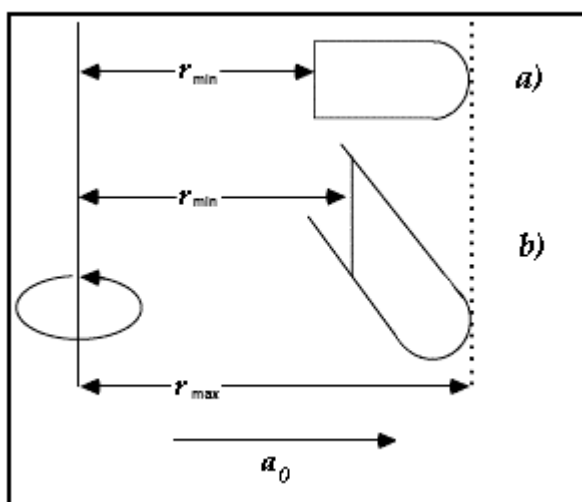
K sedimentaci menších částic, např. virů, makromolekul, ribozomů nebo membránových frakcí jsou nezbytné ultracentrifugy dosahující relativního odstředivého zrychlení až 700 000 g a frekvence otáček 35 000 – 120 000 rpm. Rotory ultracentrifug pracují ve vakuu, čímž se snižuje odpor vzduchu a tím vyvolaný vznik tepla třením.^{3, 5}

3.1.3 Typy rotorů

Podle konstrukce se rozlišují rotory s výkyvnými kyvetami a rotory úhlové.

Rotory s výkyvnými kyvetami se hodí pro menší zrychlení a nalezneme je v centrifugách nízkoobrátkových. Kyvety se umísťují do výkyvného držáku a během rotace se vychylují do vodorovné polohy. Hlavní výhodou výkyvných kyvet je, že sedimentace probíhá ve směru osy kyvety, zóny sedimentovaných částic nejsou kolmé na osu a lze je pohodlně odebrat (Obr. 2).^{1, 6}

Úhlové rotory masivní konstrukce a hladkého povrchu umožňují dosažení většího počtu otáček a kratší doby dělení. Kyvety jsou umístěny v šikmých otvorech kompaktního kovového rotoru, který má tvar komolého kužele. Částice nesedimentují podél osy kyvety ale šikmo (Obr. 2).⁶ Úhel kyvet v rotoru bývá v rozmezí 20° až 40°.^{1, 3, 5}



Obr. 2 Kyvety.

a) Kyveta výkyvná b) Kyveta úhlového rotoru

Pro centrifugaci v hustotním gradientu se s výhodou používají speciální tzv. zonální rotory, umožňující centrifugaci velkých objemů materiálu. Plnění i vyprazdňování rotoru může probíhat během jeho otáčení, čímž se zabraňuje promíchání gradientu.⁵

3.1.4. Metody centrifugace

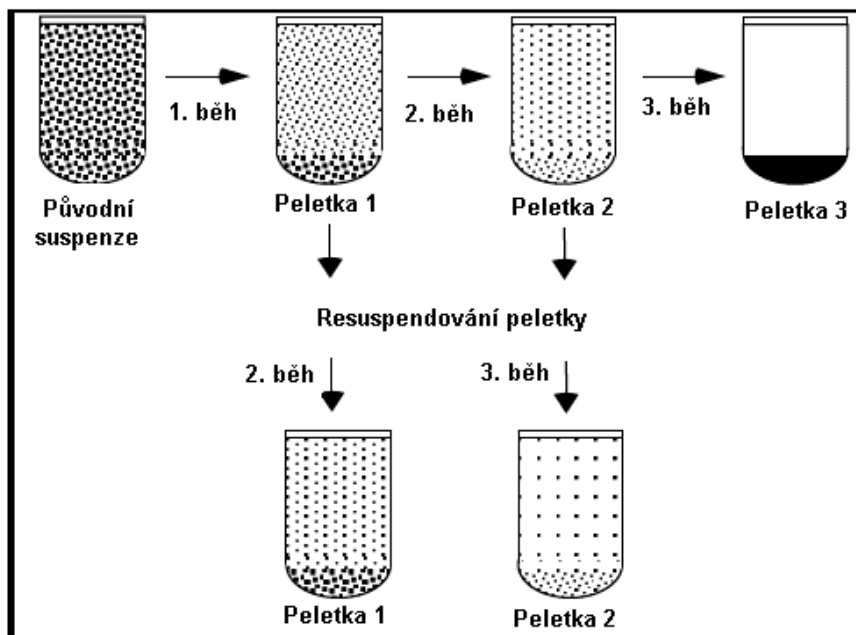
Dříve se centrifugace (analytická centrifugace) používala ke stanovení molekulové hmotnosti makromolekulárních látek, s nástupem jednodušších

postupů (např. SDS-PAGE) je centrifugační postup využíván především pro preparativní účely. Preparativní centrifugace slouží hlavně k separačním účelům – k dělení suspenzí na jednotlivé frakce, které pak mohou být analyzovány.⁷

Metody preparativní centrifugace můžeme dělit na centrifugaci diferenciální a centrifugaci v hustotním gradientu, metodu gradientové centrifugace lze dále dělit podle použité techniky na zonální a izopyknickou.⁴

Diferenciální centrifugace

Centrifugace probíhá v homogenním mediu s podstatně nižší hustotou, než jakou mají sedimentující částice (používá se např. vodný roztok sacharosu 0,25 mol.l⁻¹). Principem dělení jsou rozdíly v sedimentačních rychlostech částic. Během centrifugace sedimentují různé částice různou rychlostí podle své velikosti. Dělení se provádí tak, aby částice určité velikosti (částice s největším sedimentačním koeficientem) zcela sedimentovaly na dno kyvety. Supernatant,



Obr. 3 Diferenciální centrifugace

který obsahuje další složky směsi, je odebrán a znovu centrifugován při vyšší rychlosti. Pro zlepšení čistoty lze peletku resuspendovat v malém objemu vhodného rozpouštědla a znovu centrifugovat (Obr. 3).^{4, 6}

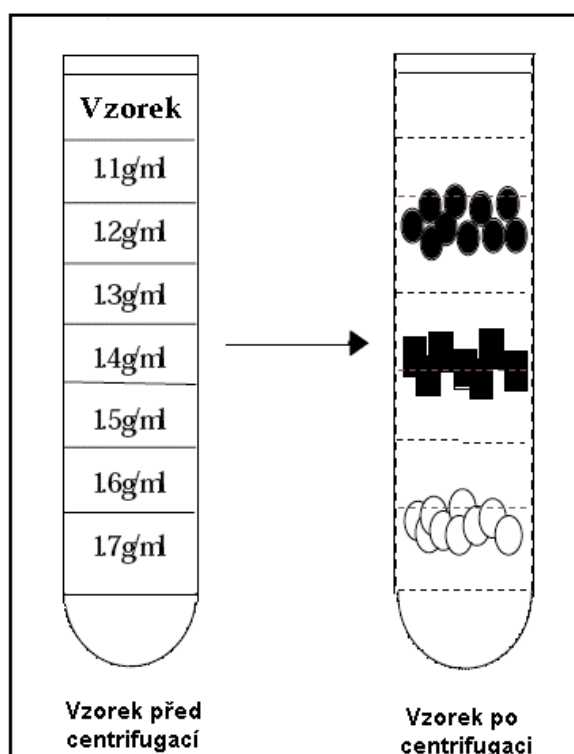
Diferenciální centrifugace je nejběžněji využívanou centrifugační metodou. Používá zejména k odstranění buněk, k oddělení sraženiny a při rozdělení buněčného homogenátu na částice (resp. při odstranění některých částic z homogenátu). Nevýhodou je jen částečná čistota frakcí.⁷

Centrifugace v hustotním gradientu

Před centrifugací v hustotním gradientu je kyveta naplněna roztokem, jehož hustota roste směrem ke dnu kyvety. Hustotní gradient roztoku je tvořen látkou nízké molekulové hmotnosti v rozpouštědle, které je vhodné pro částice, jež mají být separovány.⁴

Existují dvě metody provedení centrifugace v hustotním gradientu - zonální a izopyknická.

Při zonální centrifugaci je na povrch roztoku, který tvoří hustotní gradient, je nanesen vzorek, jež má být rozdělen. Vlivem odstředivého zrychlení začnou

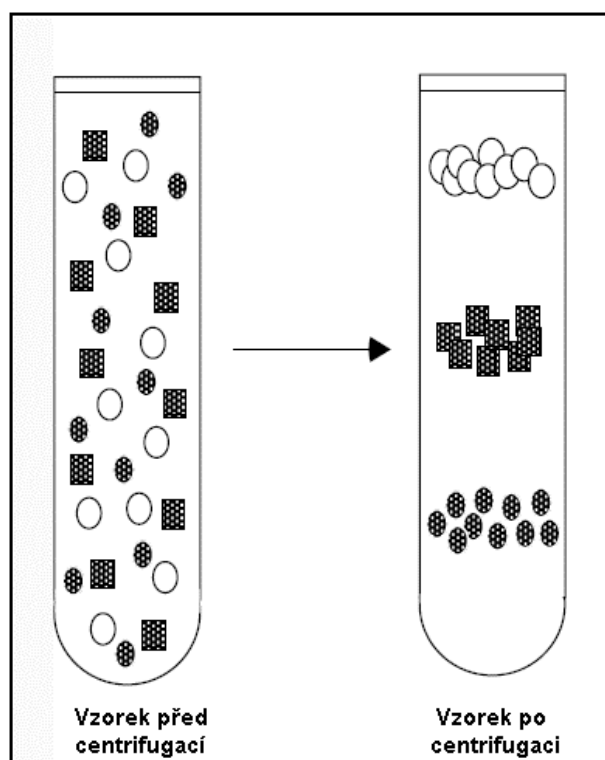


Obr. 4 Zonální centrifugace

částice gradientem sedimentovat v oddělených zónách, odpovídajících jejich rychlosti sedimentace v (Obr. 4). Pro správné provedení zonální centrifugace musí

být hustota sedimentovaných částic vždy vyšší než hustota gradientu a běh centrifugace musí být zastaven dříve, než separované zóny dosáhnou dna kyvety.^{4,6}

Centrifugace izopyknická probíhá na principu rozdílu hustoty částic nezávisle na jejich ostatních vlastnostech. Používá se roztok s hustotním gradientem, přičemž rozsah hustot leží v oblasti očekávaných hustot dělených částic. Hustoty média přibývá od horního okraje centrifugační kyvety ke dnu. Během centrifugace sedimentuje částice jen potud, než se dostane do oblasti, v níž se její hustota shoduje s hustotou média (izopyknický bod) (Obr. 5). Zaujetí rovnovážné polohy vyžaduje více času (např. 30 h i více) než diferenciální centrifugace v prostředí s nízkou hustotou.^{6,7}



Obr. 5 Izopyknická centrifugace

K přípravě hustotního gradientu se nejčastěji používají roztoky sacharózy, polymerů (dextran, albumin, polyethylenglykol) a solné roztoky (např. CsCl, RbCl). Existují dva typy hustotních gradientů – diskontinuální a kontinuální.^{4,7}

Diskontinuální gradient je tvořen několika různě hustými vrstvami. Dělené částice určité hustoty se soustředí na hranici mezi dvěma vrstvami.

Při kontinuálním gradientu je změna hustoty plynulá v celém rozsahu centrifugační kyvety. Může být připraven lineární, konvexní nebo konkávní gradient.

Metoda hustotního gradientu se používá k separaci a vyčištění makromolekulárních částic polymerního charakteru (bílkovin, nukleových kyselin), virů, bakterií, rostlinných a živočišných buněk a jejich organel.^{4,7}

3.2. Extrakce tuhou fází

3.2.1. Princip a význam SPE

Extrakce tuhou fází (Solid phase extraction, SPE) patří v současnosti k nejoblíbenějším a nejvyužívanějším technikám přípravy vzorků a její význam neustále roste. Její podstatou je zachycení analytu na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek, a jeho následná eluce vhodným elučním činidlem. Mezi retenční a eluční krok lze zařadit libovolný počet kroků promývacích, při kterých se lze zbavit dalších nežádoucích a případně interferujících složek vzorku. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu. Proto lze SPE nazvat také chemickou filtrací.^{8,9}

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, lze ji však použít i pro přípravu pevných vzorků, které byly předem převedeny do rozpouštědla. Hlavní význam SPE spočívá v extrakci a zakoncentrování analytu a odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení.^{10,11}

SPE nabízí mnoho výhod oproti tradičním separačním technikám, mezi něž patří zejména extrakce v soustavě kapalina – kapalina, a to především:

- vysokou výtěžnost
- dobrou selektivitu, specifitu a reprodukovatelnost
- úsporu organických rozpouštědel
- omezení vzniku emulzí

- snadné provedení
- možnost automatizace a napojení na další instrumentální metody
- použití jednorázových plastových materiálů
- možnost současného zpracování 12, 24, 96 nebo 384 vzorků
- výměnu rozpouštědel (analyt je převeden z jedné specifické matrice do jiné, např. z vodné do organické)
- derivatizace (analyt je zachycen na sorbent, převeden na derivát a pak eluován)^{8, 11, 12, 13}

3.2.2. Instrumentace SPE

Zařízení pro SPE není složité. Existují dva základní formáty sorbentů SPE – extrakční kolonky a disky. Extrakční kolonky mají podobu injekční stříkačky bez pístu nebo destičky. Sorbent je v kolonce uzavřen fritami z polyethylenu případně z nerezové oceli či teflonu. Miniaturizace systému může přinést úsporu rozpouštědel pro aktivaci, promytí sorbentu a eluci analytu, ovšem díky nízké průtokové rychlosti také prodloužení celkové doby extrakce. Extrakční disky jsou vyráběny ve třech základních konstrukčních podobách:

- sorbent se nachází mezi dvěma fritami z inertního materiálu
- sorbent je vpleten do sítě teflonu nebo jiného inertního polymeru
- sorbent je uchycen na skleněná vlákna nebo papírový filtr

Větší poloměr extrakčního disku umožňuje rychlejší průtok sorbetem při zachování dostatečného kontaktu vzorku se sorbetem.⁹

Sorbenty kladou odpor protékajícím kapalinám. Jejich průtok bývá urychlen vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky, centrifugací nebo probíhá jen díky gravitaci.^{8,9}

Spojení on-line SPE s HPLC případně GC nabízí možnost přímého nástřiku vzorku do systému, a tedy minimalizaci kroku přípravy vzorku. SPE kolonku lze umístit do dávkovací smyčky na šesticestném ventilu. Po kondicionaci sorbentu, nanesení vzorku a promytí je ventil přepnut a eluát je mobilní fází nesen přímo na analytickou kolonu.^{9, 14}

3.2.3. Sorbenty SPE

Kromě znalosti vlastností analytu a matrice je pro kvalitní provedení SPE důležitá i volba sorbentu. Pro vhodnou sílu retence a správnou eluci konkrétního analytu lze dnes vybírat z velkého množství komerčních sorbentů. Jakkoliv může být tento výběr složitý, množství sorbentů představuje obrovské možnosti využití SPE.⁹

Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, sorbenty pro SPE však mívají větší zrnění než je tomu u kapalinové chromatografie, takže lze pracovat při nízkém podtlaku či přetlaku. Pro separaci se využívá různých vazebných interakcí nepolárních Van der Walsových sil, polárních vodíkových vazeb a interakcí dipól-dipól, iontově-výměnných i imunoafinitních interakcí.^{9,11, 14} Každý sorbent nabízí specifickou kombinaci těchto interakcí. Hlavní interakci, klíčovou pro extrakci analytu, označujeme jako primární, vedlejší působící interakce jako sekundární.⁸

Sorbenty SPE jsou nejčastěji tvořeny chemicky modifikovanými částicemi silikagelu nejčastěji o průměru 40-50 μm , s průměrem pórů 50-500 \AA a povrchovou plochou 50-500 m^2/g .⁹ Při modifikaci se na povrchové silanolové skupiny silikagelu navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu. Nechá-li se část silanolových skupin volných (non end-capped - neuzavřený sorbent), podílí se na výsledných vlastnostech sorbentu. Naopak v uzavřeném sorbentu (end-capped) jsou na všechny silanolové skupiny navázány funkční skupiny pevné fáze případně trimethylsilylové skupiny. Jako sorbent slouží kromě silikagelu i jiné oxidy (např. oxidy hliníku, hořčíku, zirkonia, titanu nebo thoria), grafit nebo polymerní sorbenty na bázi polystyrenu či polymethylmethakrylátu. Nejběžněji se však používají chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově-výměnné fáze sorbentů.^{8, 9, 10}

Reverzní fáze SPE

Pro reverzní fáze SPE je charakteristická hydrofobní, nepolární stacionární fáze, polární nebo mírně polární matrice vzorku s nepolárním nebo mírně

polárním analytem. Promývacím rozpouštědlem je polární kapalina, nejčastěji voda. Typickým sorbetem je silikagel s chemicky vázanými oktylovými (C8), oktadecylovými (C18) nebo fenylovými (PH) skupinami s průměrem pórů 60 Å a průměrem částic 40 μm. Primární interakcí, umožňující retenci analytu, jsou Van der Waalsovy síly.^{8,10} Nevýhodou tohoto typu sorbentu je relativně nízká kapacita pro polární analyty, nízká výtěžnost zásaditých analytů a omezená stabilita sorbentu při použití extrémně kyselých či bazických médií. Při překročení rozmezí pH (2-7,5) může dojít k hydrolýze a odštěpení funkčních skupin stacionární fáze a rozpuštění silikagelu.¹⁰ Naproti tomu kopolymery styrenu a divinylbenzenu (PS-DVB) jsou stabilní v celém rozsahu pH. (Tab. 1)^{11,14}

Tab. 1

Označení	Funkční skupina	-R
PH	fenyl	
PS-DVB	kopolymer styrenu a divinylbenzenu	
C18	oktadecyl	
C8	oktyl	

Normální fáze SPE

Normální fáze SPE jsou používány pro extrakci polárních analytů ze středně polární a nepolární matrice vzorku polární stacionární fází. Typickými sorbenty jsou silikagel modifikovaný funkčními skupinami kyanopropylu (CN), aminopropylu (NH₂) nebo 3-(2,3-dihydroxypropoxy)propylu (DIOL) a polární adsorpční média jako nemodifikovaný silikagel, Florosil (křemičitan hořečnatý)

nebo Alumina (oxid hlinitý). (Tab. 2)¹¹ K retenci analytu dochází primárně kvůli interakcím mezi polárními funkčními skupinami sorbentu a analytu, konkrétně jsou to vodíkové vazby, interakce dipól-dipól, π - π , aj.¹⁰ U některých sorbentů (např. silikagelu, aminopropylsilikagelu) se sekundárně uplatňuje i iontová výměna – silanolová skupina je slabě kyselá a vyměňuje kationy, zatímco aminopropyllová skupina je slabě zásaditá a vyměňuje anionty.⁸

Tab. 2

Označení	Funkční skupina	-R
NH ₂	aminopropyl	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \end{array}$
DIOL	3-(2,3-dihydroxypropoxy)propyl	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} (\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH---} \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$
CN	kyanopropyl	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} (\text{CH}_2)_3\text{CN} \\ \end{array}$
Si	nemodifikovaný silikagel	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} \text{OH} \\ \end{array}$

Iontově-výměnné fáze SPE

Iontově-výměnnou fází SPE lze použít pro kapalné vzorky s analytem, jehož molekula má náboj. Anionty analytu lze extrahovat na silikagelu modifikovaném trimethylamoniumpropylem (SAX) nebo aminopropylem (NH₂), kationty na silikagelu s navázanými skupinami benzensulfonové kyseliny (SCX) nebo karboxypropylu (WCX). (Tab. 3)¹¹ Primární interakcí jsou elektrostatické přitažlivé síly mezi nabitými funkčními skupinami sorbentu a analytu. K retenci tedy může dojít jedině v případě analytu v podobě iontu. Toho lze docílit použitím pufru s vhodným rozsahem pH, navrženém podle pK_a analytu. Eluce se provádí dvěma možnými způsoby. Iont analytu je nehrazen iontem, který má vyšší selektivitu nebo je přítomen v nadbytku, nebo neutralizací sorbentu či analytu vhodným kyselým případně zásaditým rozpouštědlem.^{9, 10}

Tab. 3

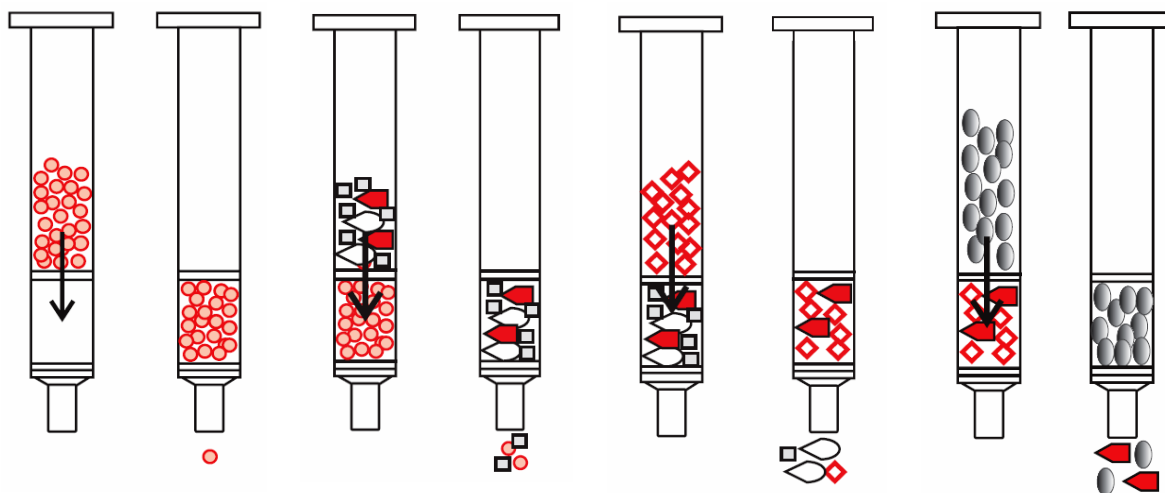
Označení	Funkční skupina	-R
NH ₂	aminopropyl	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} \\ \end{array} (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
SCX	benzensulfonová kyselina	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} \\ \end{array} (\text{CH}_2)_2\text{---} \langle \text{benzene ring} \rangle \text{---SO}_3^-\text{H}^+$
WCX	karboxypropyl	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} \\ \end{array} (\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_2$
SAX	trimethylamoniumpropyl	$\begin{array}{c} \\ \text{---Si---} \\ \end{array} (\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

3.2.4. Základní postup provedení SPE

Je-li na základě vlastností matrice a analytu zvolen formát sorbentu, jeho složení a kapacita, a vhodná rozpouštědla, samotný postup SPE se pak většinou skládá z pěti základních kroků.

Příprava vzorku před extrakcí

Před samotnou extrakcí je třeba připravit vzorek tak, aby jeho fyzikálně chemické vlastnosti podporovaly retenci analytu v extrakční kolonce. Tuhé vzorky je nutno převést do roztoku, vzorky obsahující tuhé nečistoty je vhodné odstranit filtrací, analyty chemicky vázané v matrici je třeba z těchto vazeb uvolnit (deproteinace, saponifikace).⁸

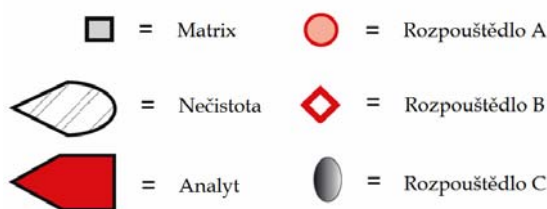


Obr. 6
Kondicionace

Obr. 7
Nanesení vzorku

Obr. 8
Promytí kolonky

Obr. 9
Eluce analytu



Aktivace a kondicionace kolonky

Aby došlo ke kvalitní retenci analytu, je nutné sorbent kondicionovat. Reverzní silikagelové fáze a nepolární adsorpční sorbenty se obvykle kondicionují organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou (např. methanol), následuje nanesení pufru či vody, čistého rozpouštědla vzorku. Methanol smáčí povrch sorbentu a proniká mezi alkylové řetězce stacionární fáze, uvolní je a napřímí, a tak umožní lepší kontakt polární matrice vzorku s nepolární stacionární fází sorbentu.⁹ Před tento kondicionační krok se někdy vkládá krok další, při kterém se na SPE kolonku nanese eluční činidlo, a tak se odstraní případné nečistoty, které by mohly interferovat s analytem. Normální silikagelové fáze a polární adsorpční média se kondicionují organickým rozpouštědlem, shodným s tím, ve kterém je rozpuštěn vzorek. Iontovýměnné sorbenty se pro analyty v nepolární matrici kondicionují čistým rozpouštědlem vzorku, pro vzorky polární se používá s vodou mísitelné organické rozpouštědlo s vhodným pH a koncentrací solí (Obr. 6).^{8,10}

Nanesení vzorku

Připravený vzorek se napipetuje do rezervoáru kolonky a nechá se dostatečně dlouho protékat. Příliš rychlý průtok sorbetem může způsobit nedostatečnou retenci analytu. Obecně se doporučuje, aby průtok nepřesáhl 2 ml/min u iontovýměnných kolonek, 5 ml/min u ostatních SPE kolonek a 50 ml/min u extrakčních disků. Celkový objem vzorku se pohybuje v řádu mikrolitrů až litrů. Při použití reverzních fází SPE a objemu vzorku nad 250 ml lze do objemu vzorku přidat malé množství (do 10 %) s vodou mísitelného organického rozpouštědla pro udržení kondicionovaného stavu stacionární fáze SPE.^{8,10}

Promytí kolonky

K selektivnímu odmytí nežádoucích, kolonkou nezadržených složek vzorku se často používá čisté rozpouštědlo vzorku, případně jiného, ve kterém je analyt nerozpustný. Při použití iontově-výměnných nebo nepolárních sorbentů je důležité pH promývacího rozpouštědla. (Obr. 8)¹⁰ V případě, kdy se analyt narozdíl od ostatních složek matrice na sorbentu nezadrží a je vymyt, slouží tento krok v procesu extrakce jako eluční.^{8,10}

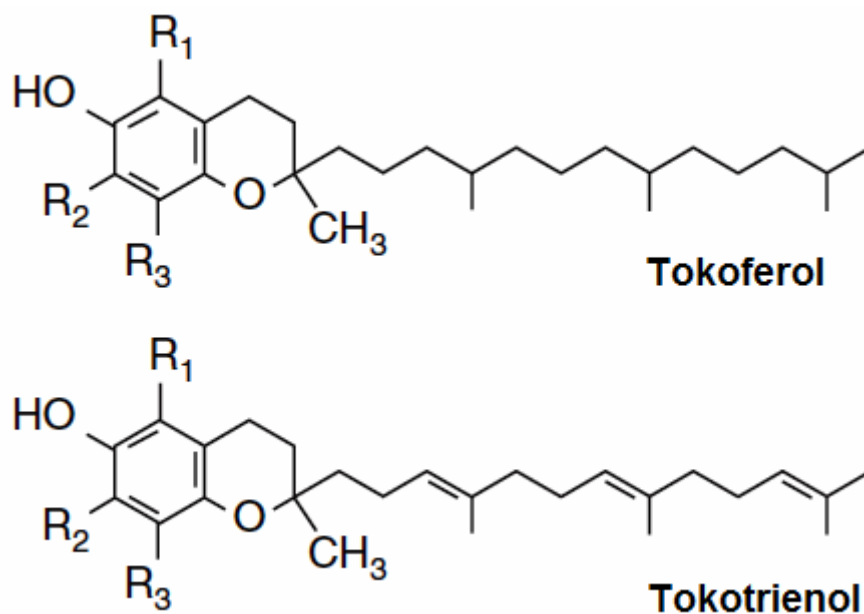
Eluce analytu

Cílem elučního kroku je vymýt vhodným činidlem analyt z kolonky, zatímco případné nečistoty nevymyté v promývacím kroku ponechat na SPE kolonce. (Obr. 9)¹⁰ Eluční objem se liší v závislosti na velikosti sorbentu (u extrakčních kolonek 200 μ l – 2 ml, u extrakčních disků 5 – 10 ml). Ukazuje se, že nanesení dvou menších alikvotů elučního činidla (např. 1 ml + 1 ml) přináší lepší výtěžnost analytu a zlepšuje přesnost, než při nanesení celého objemu najednou (např. 2 ml).^{9,10}

3.3. Vitamín E

3.3.1. Struktura a vlastnosti vitamínu E

Vitamín E se řadí do skupiny liposolubilních vitamínů. Vyskytuje se ve formě osmi vitamerů - α , β , γ , δ -tokoferol a α , β , γ , δ -tokotrienol.¹⁵ Všechny tokoferoly jsou odvozeny od tokolu, který se skládá z chromanolového jádra a hydrofobního fytylového řetězce, tokotrienoly mají ve fytylovém řetězci nenasycené vazby. Na chromanolový kruh je připojena jedna hydroxylová skupina, která je dárce vodíkových atomů a podmiňuje antioxidační účinek molekuly. Osm vitamerů vitamínu E se liší polohou a počtem metylových skupin na chromanolovém kruhu (Obr. 10).¹⁶



Obr. 10 Tokoferoly a tokotrienoly

α : R₁ = CH₃, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃

β : R₁ = CH₃, R₂ = H, R₃ = CH₃

γ : R₁ = H, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃

δ : R₁ = H, R₂ = H, R₃ = CH₃

Fytylový řetězec tokoferolů obsahuje tři chirální centra. Syntetický α -tokoferol (all-rac- α -tokoferol) je směsí osmi enantiomerů, vznikajících ve stejném poměru. Rostliny specificky produkují jen RRR enantiomer všech čtyřech tokoferolů.²¹

Největší biologickou aktivitu vitamérů vykazuje α -tokoferol. Bylo zjištěno, že biologická aktivita α -tokoferolu přesně neodpovídá jeho antioxidační aktivitě, a tedy mechanismus jeho působení není pouze antioxidační. Biologická afinita souvisí i se specifickou afinitou k proteinu přenášejícímu α -tokoferol (α -TTP), který v játrech inkorporuje α -tokoferol do lipoproteinových částic, absorpci, regeneraci, degradaci, exkreci, chiralitě druhého uhlíku fytylového řetězce a řadě dalších faktorů.^{17, 18, 19} Přírodní vitamín E má vyšší biologickou aktivitu než syntetický, ovšem rozdíl v antioxidační kapacitě prakticky nelze pozorovat.²⁰

3.3.2. Zdroje vitamínu E

Lidský organismus neumí vitamín E syntetizovat, proto je třeba přijímat ho potravou.²¹ Nejvyšší obsah tokoferolu je v oleji z pšeničných klíčků a ve slunečnicových, sojových a kukuřičných semenech. Z běžných potravin jej dokážeme také v olivovém oleji a dalších rostlinných olejích a margarinech. Určitý obsah vitamínu E je prokázán i v zelenině. Potřebná denní dávka (kolem 12 mg) pochází téměř výhradně z rostlinné potravy. Výjimkou živočišné stravy je plnotučné mléko.^{22, 23}

3.3.3. Vstřebávání, transport a distribuce vitamínu E

Vitamín E se vstřebává ze střední části tenkého střeva za přítomnosti solí žlučových kyselin a pankreatické lipasy.²⁴ Vstřebává asi 20-50 % normálního denního příjmu.²³ Absorpce vitamínu E je závislá na řadě okolností, především na velikosti příjmu polynenasycených mastných kyselin. Hladina vitamínu E je ve vnitřním prostředí ovlivňována jeho příjmem z potravy, ale také tvorbou volných

kyslíkových radikálů, které podstatnou měrou zvyšují jeho spotřebu. Zvýšená konzumace tuků také zvyšuje potřebu vitamínu E.¹⁵ Absorpce α -tokoferolu je negativně ovlivněna naringeninem, karotenoidy (hlavně luteinem) a zřejmě i γ -tokoferolem.²⁰ Hladiny α -tokoferolu ovlivňuje též podávání statinů. To lze vysvětlit tak, že blokádou syntézy cholesterolu statiny se blokuje i biosyntéza ubiquinolu Q10, jež se podílí na regeneraci vitamínů C a E.²⁰

Po resorpci je vitamín E z enterocytu transportován v chylomikronech. Později je v plazmě vázán v lipoproteinech LDL (40-60 %) a HDL (35 %).²⁴ Prosté plazmatické hladiny nejsou nejlepším ukazatelem dostatečné saturace organismu vitamínem E. Vzhledem k tomu, že vitamín E je transportován v lipoproteinech, ve kterých je také realizována jeho fyziologická funkce, je vhodné stanovovat koncentrace vitamínu E v jednotlivých lipoproteinových frakcích, případně trombocytech či membránách erytrocytů.^{15, 25}

Nejvyšší koncentrace vitamínu E nalezneme v nadledvinách, hypofýze, varlatelych a trombocytech, ovšem celkově největší množství je uloženo v tukové tkáni, játrech a svalovině. Při depleci dochází k rychlým změnám hladin tokoferolu v plasmě a játrech, naopak pomalé jsou tyto změny v tukové tkáni a svalovině.²³ Z buněčných organel jsou na α -tokoferol nejbohatší mitochondriální frakce a endoplasmatické retikulum, málo je ho v cytosolu a peroxisomech.²⁰

3.3.4. Volné radikály a teorie stárnutí

Volné radikály nebo správněji aktivní formy kyslíku jsou vysoce reaktivní chemické látky, které snadno vstupují do reakce s biologicky aktivními makromolekulami za vzniku příčných vazeb (cross-links). V důsledku toho se mění jejich chemické složení a tím i jejich funkce. Předpokládá se, že vlivem volných radikálů dochází zejména ke změnám v genovém materiálu DNA, buněčných membránách a citlivých enzymů v cytoplazmě. Jejich vlivem dochází k peroxidaci nenasycených mastných kyselin, změnám v chemické konstituci lipoproteinů, které jsou vlivem aktivních forem kyslíku modifikovány a mají

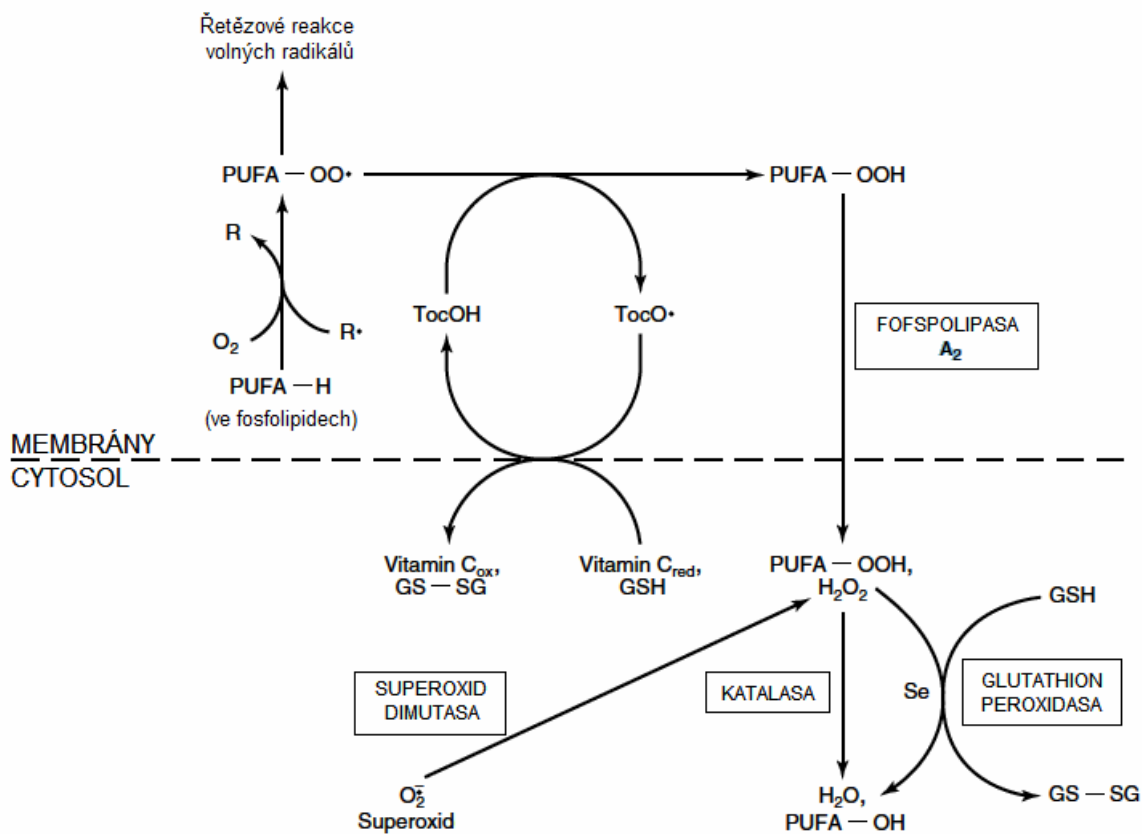
výrazně aterogenní efekt. Uvedené změny se pak podílejí ve svém souhrnu na stárnutí buněčných systémů a poruchách v proteosyntéze.²⁶

Z fyzikálních procesů vedoucích k produkci volných radikálů je nejvýznamnější interakce ionizujícího (radioaktivního, Rentgenova a ultrafialového) záření a světla s vodou, obsaženou v organismu. Volné radikály, vznikající jako důsledek ultrafialového záření, se nepodílí na přirozeném stárnutí, protože toto záření proniká jen do malých hloubek pokožky a k životně důležitým orgánům a tkáním se nedostane. Může však způsobit předčasné stárnutí kůže. Nejdůležitějším organickým procesem vzniku volných radikálů je jejich produkce v dýchacím řetězci. Volné radikály také vznikají při reakci organismu na některé cizorodé látky v organismu. Z tohoto důvodů je možné, že rostoucí znečištění životního prostředí, včetně vzduchu a potravy, může přispívat k poškození organismu volnými radikály a ke zrychlenému stárnutí. Hlavní teorií vysvětlující příčiny vzniku změn spojených se stárnutím na buněčné úrovni je teorie volných radikálů.²⁷

3.3.5. Úloha vitamínu E v lidském organismu

Vitamín E patří k nejúčinnějším antioxidačním látkám, chránícím biologické struktury před poškozením volnými kyslíkovými radikály. Vitamín E je lokalizován v biologických membránách, kde se odehrává jeho protektivní působení, vycytává volný elektron z aktivovaného kyslíku, hydroxylového nebo superoxidového radikálu, čímž je inaktivuje.¹⁵ Tak chrání nenasycené mastné kyseliny (PUFA) před oxidativním poškozením, případně brání poškození bílkovin dalšími produkty peroxidace lipidů. Radikál tokoferolu není příliš reaktivní. Oxidovaná forma tokoferolu může být regenerovaná kyselinou askorbovou (Obr. 11). Produktem je radikál monodehydroaskorbátu, který je enzymaticky nebo neenzymaticky přeměněn na askorbát a dehydroaskorbát, které nejsou radikály.^{15, 16} V procesu regenerace vitamínu E hraje roli celá řada dalších koantioxidantů např. ubichinol Q10, kyselina 3-hydroxyantranolová a jiné látky v souhře s dalšími na sebe navazujícími reakcemi, v nichž se uplatní redukovaný

glutathion, enzym glutathionreduktasa a koenzym NADPH. Při chybění jakékoli z těchto látek nemůže k regeneraci vitamínu E dojít a jeho antioxidační účinek se nedostaví.^{16, 28}



Obr. 11 Regenerace tokoferolu

Vzhledem k tomu, že v lidském organismu vzniká neustále velké množství volných kyslíkových radikálů, které mohou poškozovat cílové struktury, jsou požadavky na přívod vitamínu E značné.

Zároveň je třeba zmínit to, že relativní stabilita radikálu tokoferolu mu umožňuje dostat se hlouběji do buňky a dát tam vzniknout řetězovým radikálovým reakcím. Tak se vysvětluje určitá prooxidační aktivita vitamínu E při jeho vyšších plasmatických koncentracích.¹⁶

Vitamín E hraje důležitou roli v patofyziologii aterogeneze, a to nejen antioxidačním působením ochrany LDL cholesterolu před modifikací, ale i cestou ovlivnění metabolismu kyseliny arachidonové, např. působí protizánětlivě inhibicí proteinkinasy C, fosfolipasy A₂ a cyklooxygenasy.^{15, 29, 30} Kromě toho potlačuje

expresi adhezivních molekul na povrchu leukocytů a endoteliálních buněk cév, podporuje vasodilatační a bariérovou funkci endotelu a inhibuje migraci buněk hladké svaloviny a jejich proliferaci v intimě cév. Především však omezuje vznik pěnových buněk a snižuje expresi scavengerového receptoru na povrchu makrofágů.³¹

Rovněž byl popsán mechanismus antiagregačního působení α -tokoferolu na trombocyty inhibicí induktorů agregace ADP a arachidonové kyseliny a inhibicí proteinkinasy C, navíc potlačuje i adhezivitu trombocytů.^{30, 31}

K dalším důležitým funkcím vitamínu E nutno zařadit jeho antikancerogenní působení, stimulaci reprodukce a podporu růstu a zasahuje do oxidoredukčních pochodů buněčného dýchacího řetězce.¹⁵

Člověku se aplikuje tokoferol při léčbě anginy pectoris a preventivně se podává ke snižování rizika srdečního infarktu. Uvádí se, že paralyzuje vliv karcinogenů, ačkoliv lékem již rozvinutého zhoubného bujení není. V pokuse na zvířeti omezuje karcinogenní efekt nitrosaminů.²²

3.3.6. Deplece a toxicita vitamínu E

Vitamín E byl původně objeven jako faktor proti sterilitě pro samice a samce potkanů. Nedostatek vedl k degenerativním změnám na varlatech a samice nebyly schopny donosit plod (řecky *tokos* = porod). Avšak žádný z těchto příznaků karence nebyl pozorován u člověka.²²

Hyposaturace tokoferolu se u člověka klinicky manifestuje anémií (porucha metabolismu železa, omezení syntézy hemoglobinu, zkracuje se doba přežívání červených krvinek). Další symptomy vyplývají z poruch nervového a svalového aparátu (degenerativní změny periferních nervů, poruchy chůze, šlachové hypo až areflexie). Může se objevit kreatinurie jako odraz zvýšeného rozpadu svalových bílkovin. Karence vitamínu E vede ke vzniku jaterní nekrózy a k poruchám kapilární permeability.^{15, 22}

Vitamín E je relativně netoxický. Nebyla u něj prokázána mutagenita, teratogenita ani kancerogenita. Nadměrný přívod vitamínu E, vedoucí ke vzniku

hypervitaminózy, se projevuje poruchami zažívacího traktu, celkovou únavou, svalovou slabostí, nechutenstvím.

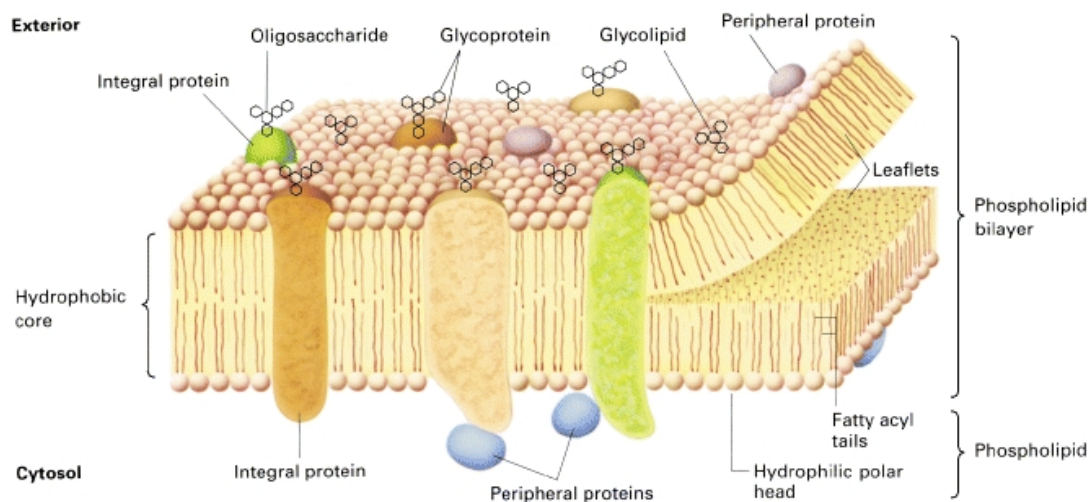
Doporučená denní dávka vitamínu E je závislá na věku osoby a na fyziologickém stavu. Denní potřeba je pro kojence 5–6 mg, děti 8–10 mg, dospělé 10–14 mg, optimální dávka 100 mg/den. Toxická je denní dávka nad 3000 mg/den.¹⁵

3.3.7. Vitamín E v erytrocytární membráně

Erytrocyty jsou buňky, které jsou zřejmě nejvíce ze všech vystaveny působení volných radikálů. Tyto volné radikály vznikají např. při běžné oxidaci hemoglobinu, při níž vzniká velmi reaktivní superoxid, při oxidaci a redukci léčiv a xenobiotik nesených krví nebo při metabolických dějích v různých orgánech (obzvláště v játrech), jimiž krev protéká.³²

Ochranné mechanismy, jimiž jsou erytrocyty chráněny proti oxidativnímu poškození, se nachází v cytosolu i v buněčné membráně. V cytosolu je to relativně složitý komplex enzymů – superoxiddismutasy, katalasy a glutathionperoxidasy. Hlavním liposolubilním antioxidantem membrány erytrocytu je vitamín E.^{32, 33}

Membrána erytrocytu patří k nejlépe prozkoumaným buněčným membránám vůbec. Důvodem je snadný způsob získání velkého počtu buněk s jedním typem membrány.³⁴ Erytrocytární membrána má charakter tekuté mozaiky, je typickým příkladem dvojvrstevné membrány s asymetrickým rozmístěním lipidů a proteinů (Obr. 12).^{35, 36} Podobně jako jiné buněčné membrány se skládá z lipidů (43 % w/w), proteinů (49 % w/w) a malého množství sacharidů (8 % w/w).³⁴



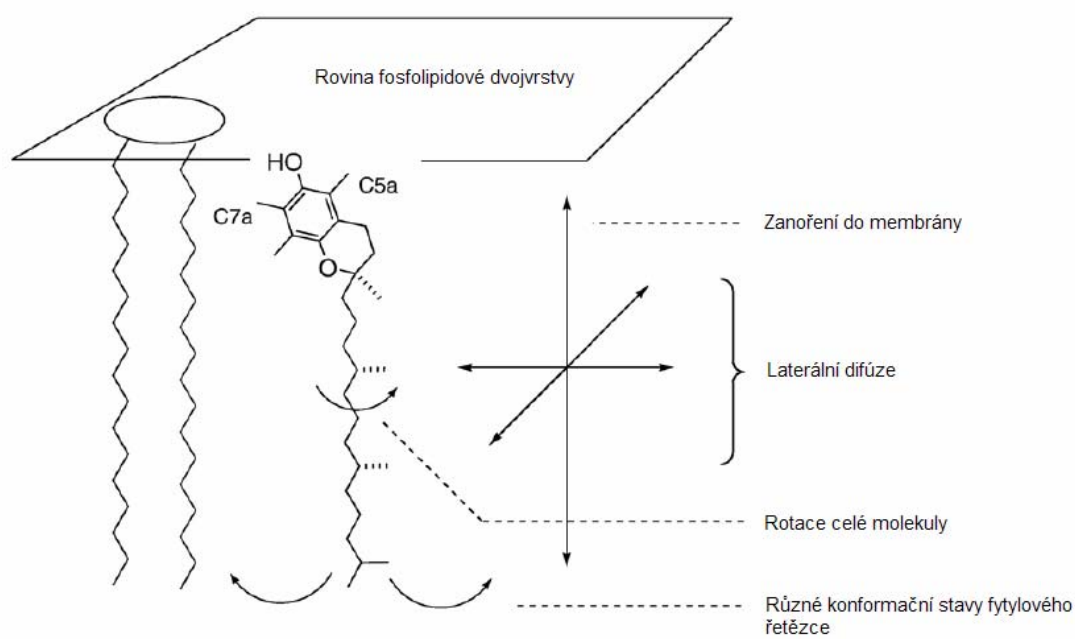
Obr. 12 Model buněčné membrány

Lipidy jsou zastoupeny neutrálními lipidy (25 %), fosfolipidy (60 %) a glykolipidy (15 %). Neutrální lipidy zastupuje téměř výhradně cholesterol ($\geq 98\%$), ten se pohybuje mezi oběma vrstvami membrány a částečně přechází i do plasmy. Fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a sfingomyelin představují více než 90 % všech fosfolipidů erytrocytární membrány. Fosfolipidy jsou v dvojvrstvě membrány uloženy asymetricky. Přibližně 80 % fosfatidylethanolaminu a téměř všechny fosfatidylserin jsou uloženy ve vnitřní vrstvě, zatímco 76 % fosfatidylcholinu a 82 % sfingomyelinu se nachází ve vrstvě vnější. Z glykolipidů jsou zastoupeny neutrální glykosfingolipidy, globosidy a gangliosidy, jejichž cukerné zbytky vyčnívají z vnější membrány a tvoří antigenní determinanty (např. ABO systém krevních skupin).^{34, 37}

Membránové proteiny erytrocytů dělíme na povrchové a integrální. Z povrchových proteinů vnitřní vrstvy membrány lze zmínit spektrin, který napomáhá udržet tvar erytrocytu. Příkladem integrálních proteinů jsou různé iontové kanály např. Band 3 nebo Na^+/K^+ ATPasa. Také glykoproteiny jsou často integrálními proteiny, jejichž cukerná složka je nositelkou antigenní specifity.³⁷

Poloha a uspořádání α -tokoferolu v biologických membránách nejsou dosud zcela objasněny. Tokoferol není v membráně rozmístěn nahodile, ale asociuje s nenasycenými mastnými kyselinami fosfolipidů. Bylo zjištěno, že metylové skupiny 5a a 7a se nachází nejbližší povrchu membrány, fytylový řetězec ukotvuje molekulu α -tokoferolu ve fosfolipidové dvojvrstvě a že dochází ke vzniku vodíkových vazeb mezi fenoxylovou skupinou α -tokoferolu a fosfátovým nebo karbonylovým kyslíkem fosfolipidu. Molekuly α -tokoferolu zauímají v membráně řadu konformací, otáčí se kolem osy kolmé na rovinu membrány, dochází k laterální difúzi membránou nebo pomalému flip-flop fenoménu mezi vrstvami membrány (Obr. 13).^{38, 39}

Koncentrace vitamínu E v erytrocytární membráně je relativně nízká ve srovnání s jeho koncentrací v plasmě. Poměr těchto koncentrací je přibližně 1:3.³²



Obr. 13 α -Tokoferol v membráně erytrocytu

Při nedostatku vitamínu E se zvyšuje riziko oxidativního poškození erytrocytární membrány. Takto poškozená membrána ztrácí svou flexibilitu, což vede ke zkrácení životnosti erytrocytu.³³ Před lipoperoxidací chrání zejména nenasycené uhlovodíkové řetězce jako linoleoyl, arachidonyl a DHA. Ovšem ani

dnes, více než 80 let od objevení vitamínu E, není zcela jasné, zda tyto nenasycené masné kyseliny chrání lépe v molekule fosfatidylcholinu, fosfatidylserinu nebo fosfatidylethanolaminu.³⁹

Nedostatek vitamínu E také zvyšuje adhezivitu erytrocytů k endoteliálním buňkám cév.³³ Vitamín E, a zvláště pak α -tokoferol, působí jako stabilizátor erytrocytární membrány. Inhibuje hemolýzu indukovanou heminem, retinolem nebo tamoxifenem. Jeho podávání v terapii chronických hemolytických anémií, např. defektu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, vedlo prodloužení životnosti erytrocytů. Výrazně snížené koncentrace α -tokoferolu byly zjištěny například u srpkovité anémie, talasemie a deficiencie glukosa-6-fosfátdehydrogenasy.⁴⁰ Bylo také zjištěno, že koncentrace vitamínu E v erytrocytární membráně vypovídá o riziku aterosklerosy mnohem lépe než jeho koncentrace v plasmě.³¹

3.3.8. Stanovení vitamínu E v erytrocytární membráně

Příprava vzorku

Příprava vzorku je časově i ekonomicky nejnáročnější částí postupu a bývá i hlavním zdrojem chyb. Množství α -tokoferolu v erytrocytární membráně je však velmi malé, a proto je třeba analyt zakoncentrovat. Vitamín E není v membráně chemicky vázán k proteinům, lipidům či sacharidům a není tedy zřejmě nutné k uvolnění z biomatrice používat tvrdých technik a činidel, které by zároveň mohly vitamín E poškodit. Nicméně je třeba vitamín E uvolnit ze slabých vazebných interakcí, jimiž je asociován např. s molekulami nenasycených mastných kyselin.²¹

Příprava vzorku často zahrnuje saponifikaci za zvýšené teploty pomocí KOH v ethanolu^{25, 41, 42} či methanolu.²¹ Pro ochranu vitamínu E před oxidací, ke které by během saponifikace mohlo dojít, se využívá řada antioxidantů – BHT, askorbová kyselina⁴², pyrogallol²⁵ nebo jejich kombinace⁴¹. Tyto antioxidanty jsou ovšem používány i v postupech, kde se saponifikace neprovádí – BHT^{43, 44}, askorbová kyselina, pyrogallol^{45, 46}. Ke snížení výtěžnosti může také docházet v souvislosti s oxidačními reakcemi sloučenin železa a hemu s membránovými

lipidy.^{41, 45} Jako extrakční činidlo je nejběžněji používán hexan, samotný nebo s malým množstvím polárnějšího rozpouštědla (např. ethanol^{25, 45, 47}, ethylacetátem), případně antioxidantem^{25, 41, 45}, přestože ve srovnání s jinými organickými rozpouštědly nemusí být jeho účinnost nejlepší. To může nastat v případě velmi málo mísitelných fází, kdy se hexan neseťká se všemi molekulami extrahovaného analytu. Tento problém může částečně řešit použití vnitřního standardu.²¹

Chromatografické metody

Tenkvrstvou chromatografií lze v současnosti využít k vyčištění vzorku, např. společně se saponifikací za tepla a derivatizací TMS, před analýzou plynovou chromatografií s plamenově ionizační detekcí. Hlavní význam má plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS), to umožňuje identifikaci metabolitů vitamínu E, jeho stereoisomerů a oxidačních produktů.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) představuje rychlou, jednoduchou, citlivou, selektivní metodu, která je i více robustní než GC. Separace tokoferolů pomocí HPLC se provádí v módu normální (NP)²⁵ i reverzní fáze (RP)^{41, 44, 45, 47}. Kolony pro normální fáze umožňují separaci všech izomerů, zatímco separovat β - a γ -tokoferol pomocí konvenční kolony pro reverzní fáze je nesnadné. Nicméně ekvilibrační čas reverzních fází je kratší než normálních a RP HPLC kolony dosahují lepší reprodukovatelnosti.²¹

Vnitřní standard

Snížená či různá výtěžnost je jedním z hlavních problémů při stanovení vitamínu E. Použití vnitřního standardu, podobajícího se fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu, pomáhá tento problém řešit. Při stanovení tokoferolů tuto úlohu často plní tokol^{25, 41} a 5,7-dimethyltokol. V některých případech jsou jako vnitřní standard použity β -tokoferol, δ -tokoferol a γ -tokotrienol, ačkoliv jsou přirozenou součástí vzorku. Značně využívaný je i α -tokoferol acetát^{44, 45}, syntetická forma vitamínu E, přestože nemá vlastnosti umožňující elektrochemickou nebo fluorescenční detekci.²¹

Detekce

Nejvíce citlivá a specifická detekce tokoferolů po HPLC separaci je detekce elektrochemická^{41, 47}. Fluorescenční detekce má asi o řád nižší citlivost než elektrochemická.^{25, 43} HPLC-UV^{32, 44} je přibližně o tři řády méně citlivá než ED, přesto je tato citlivost v mnoha případech stanovení α -tokoferolu dostačující. Použitím DAD⁴⁵ navíc získáme spektrum, které poslouží k identifikaci píku a zjištění jeho čistoty.²¹

Příklady několika postupů stanovení α -tokoferolu z erytrocytární membrány je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4 Stanovení α -tokoferolu v erytrocytární membráně

Příprava erytrocytů	Použitý objem	Příprava vzorku	Analýza Detekce	Podmínky analýzy	Poznámky
	100 μ l erytrocytů	Saponifikace: KOH (60 °C, 30 min) v přítomnosti BHT, kyseliny askorbové a pyrogallolu; LLE: hexan s obsahem BHT; odpaření	RP (Ultrasphere ODS) HPLC-ED	MeOH: ACN: fosfátový pufr (83:12:5)	41 IS: tokol; výtěžnost závislá na antioxidantu: 80-100 %
Plná krev odebrána do K ₃ EDTA, odstředěna, supernatant odstraněn; erytrocyty 3x promyty NaCl s K ₃ EDTA, supernatant odstraněn; resuspendovány v NaCl s K ₃ EDTA a pyrogallem; uloženy při -70 °C	150 μ l erytrocytární suspenze	Deproteinace: ethanol s IS v přítomnosti pyrogallolu. LLE: hexan; odpaření	RP (Spherisorb ODS) HPLC-UV	MeOH	45 IS: tokoferol acetát; výtěžnost: 94,08 %
Plná krev odebrána do EDTA; erytrocyty 3x promyty PBS, supernatant odstraněn	1 ml erytrocytů	Deproteinace: ethanol v přítomnosti kyseliny askorbové; Saponifikace: KOH (70 °C, 30 min); LLE: hexan	TLC (silikagel G), UV; Skvrny seškrabnuty a rozpuštěny v etheru, kvantifikace spektrofotometricky (Emmerie-Engel, modifikace Tsen)	dichlorfluorecein, chloroform, isopropylether v hexanu	42 Výtěžnost: 69 %
Plná krev odebrána do heparinátu sodného, odstředěna, supernatant odstraněn	500 μ l erytrocytární suspenze	Reakce s NaHSO ₃ ; Deproteinace: ethanol; LLE: hexan; odpaření	RP (MC MEDICAL C18) HPLC-ED	MeOH:H ₂ O (96:4), 40 mM NaClO ₄	47 Výtěžnost: 91,5 \pm 2,85 %

4. PRAKTICKÁ ČÁST

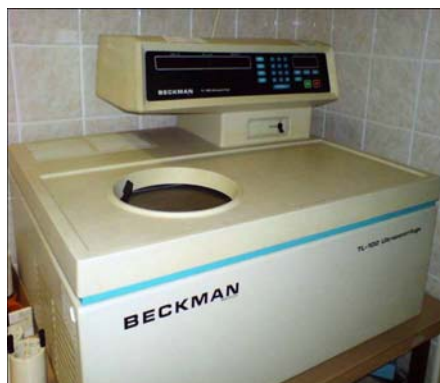
4.1. Přístrojové vybavení a chemikálie

4.1.1. Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf:
 - HPLC sestava od firmy PERKIN ELMER (Norwalk, USA)
 - Diode array detektor LC 235C
 - LC Column oven 101 thermostat
 - LC 200 pump
 - LC 200 autosampler
 - Monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
 - Software Turbochrom verze 4.1 PERKIN ELMER
- Analytické váhy Sartorius ME5-0CE (Goettingen, Německo)
- Analytické váhy Sartorius LE5-623S-0CE (Goettingen, Německo)
- Pístová pipeta BRAND Transferpettor 500 µl
- Laboratorní třepačka LT-1 Kavalier (Sázava, Česká republika)
- Chlazená centrifuga Labofuge 400R Heraeus (Hanau, Německo)
- Ultracentrifuga TL-100 Beckman-Coulter (Palo Alto, USA)
- Úhlový rotor TLA-100.2 Beckman-Coulter (Palo Alto, USA)



Obr. 14 Perkin Elmer HPLC



Obr. 15 Ultracentrifuga Beckman
TL-100



Obr. 16 SPE Vacuum Manifold

- Beckman Centrifuge Tubes (11 × 34 mm, polykarbonát)
- Vakuové čerpadlo VACC Space - 50, Chromservis (Praha, Česká republika)
- SUPELCO Visiprep™ SPE Vacuum Manifold standard, 12-port model Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, Česká republika)
- Spe-ed SPE Cartridges C18/18% (500 mg / 3 ml / 40 μm / 60 Å), Applied Separations (Allentown, USA)
- Elektrický vibrační strojek Lab Dancer IKA WERKE (Staufen, Německo)
- Koncentrátor AD 5301 Eppendorf (Hamburg, Německo)

4.1.2. Chemikálie

- Acetonitril HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)
- BHT, Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Destilovaná voda, GORO system (Praha, Česká republika)
- Destilovaný methanol, PENTA (Praha, Česká republika)
- D-Mannitol, Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Ethanol denaturovaný 5 % methanolem, PENTA (Praha, Česká republika)
- Helium 4,6, LINDE (Praha, Česká republika)
- HEPES, Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Chlorid vápenatý, Lachema (Brno, Česká republika)
- Methanol HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)

- n-Hexan HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)
- L-Askorbová kyselina, Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika)
- Chlorid sodný 0,9%, B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Německo)

4.1.3. Standardy

- α -Tokoferol, Fluka, Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika)
- Tokoferol acetát, Fluka, Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika)

4.1.4. Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky

- Zásobní roztok α -tokoferolu $c = 2000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 43,072 mg α -tokoferolu v hexanu a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol/l}$ byl připraven rozpuštěním 23,638 mg tokoferol acetátu v n-hexanu a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok D-mannitolu $c = 50 \text{ mmol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 1,822 mg D-mannitolu v destilované vodě a doplněn do 200 ml.
- Zásobní roztok HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) $c = 5 \text{ mmol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,2383 mg HEPES v destilované vodě a doplněn do 200 ml.
- Zásobní roztok chloridu vápenatého $c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 5,5495 mg chloridu vápenatého v destilované vodě a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok kyseliny askorbové $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 176,12 mg kyseliny askorbové v destilované vodě a doplněn do 10 ml.

Pracovní roztoky

- Pracovní roztok tokoferol acetátu $c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.

- Pracovní roztok tokoferol acetátu $c = 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.
- Pracovní roztok tokoferol acetátu byl připraven zředěním zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem na koncentraci $c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$.
- Pracovní roztok α -tokoferolu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku α -tokoferolu $c = 2000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.
- Pracovní roztok standardu α -tokoferolu $c = 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s tokoferol acetátem $c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku α -tokoferolu $c = 2000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.
- Pracovní roztok standardu α -tokoferolu $c = 2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s tokoferol acetátem $c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku α -tokoferolu $c = 2000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.
- Pracovní roztok standardu α -tokoferolu $c = 5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s tokoferol acetátem $c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku α -tokoferolu $c = 2000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.
- Pracovní roztok standardu α -tokoferolu $c = 10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s tokoferol acetátem $c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl připraven zředěním zásobního roztoku α -tokoferolu $c = 2000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methanolem.
- Pracovní roztok HEPES s tokoferol acetátem byl připraven zředěním zásobního roztoku tokoferol acetátu $c = 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ roztokem HEPES $c = 5 \text{mmol.l}^{-1}$ na koncentraci $c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

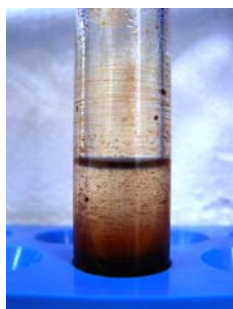
4.2. Původní metody pro stanovení α -tokoferolu z erythrocytární membrány

4.2.1. Promytí erytrocytů

2,5 ml venózní krve odebrané do K_3EDTA jsme centrifugovali 10 minut při $2000 \times g$, odebrali jsme supernatant. K erythrocytární mase jsme přidali roztok 0,01 % BHT ve fyziologickém roztoku do objemu 2,5 ml. Obsah zkumavky jsme promíchali a nechali opět odstředit. Tento postup jsem zopakovali 3x. Takto promyté erythrocyty jsme uskladnili při $-86 \text{ }^\circ\text{C}$.⁴⁸

4.2.2. Liquid-liquid extrakce

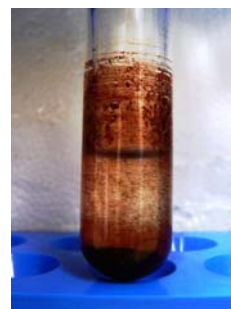
Do zábrusové zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml promytých naředěných erytrocytů (1:1), přidali 2,5 ml n-hexanu, protřepali a nechali 2 minuty stát při pokojové teplotě (Obr. 17). Poté jsme přidali 0,5 ml ethanolu denaturovaného 5 % methanolem s přídatkem vnitřního standardu (α -tokoferol acetátu, $c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Po třiminutové deproteinaci jsme vzorek 5 minut intenzivně třepali na třepačce (Obr. 18). Vzorek jsme nechali centrifugovat ($2000 \times g$, 10 minut, $0 \text{ }^\circ\text{C}$) (Obr. 19), poté jsme z horní hexanové fáze odebrali 2,0 ml do nové skleněné zkumavky. Extrakt jsme odpařili v koncentrátoru v módu pro těkavé kapaliny, odparek rozpustili ve 400 μl methanolu a analyzovali pomocí HPLC.⁴⁸



Obr. 17



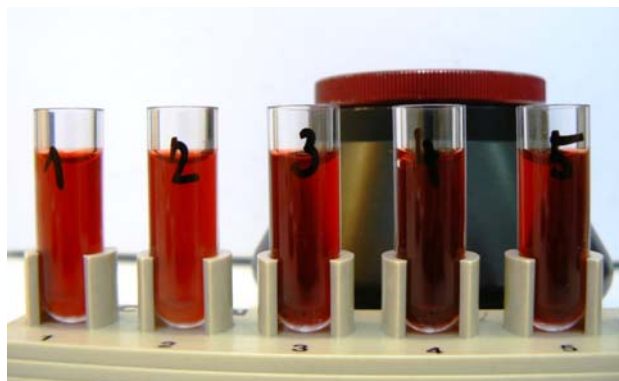
Obr. 18



Obr. 19

4.2.3. Příprava vzorku a postup SPE

Do ultracentrifugační kyvety jsme napipetovali 500 μl 5 mmol.l^{-1} HEPES ($\text{pH} \cong 7,4-7,5$) a 500 μl 50 mmol.l^{-1} D-mannitolu. Následovalo odebrání promytých vytemperovaných erytrocytů pomocí pístové pipety. Pipeta byla zvenku pečlivě očištěna buničinou a 100 μl promytých erytrocytů bylo vpraveno do kyvety. Poté jsme přidali 11 μl 1 mol.l^{-1} CaCl_2 a obsah kyvety jsme důkladně promíchali (Obr. 20). Vzorky byly ultracentrifugovány (90 000 rpm = 288 000 \times g, $r_{\text{AV}} = 31,8$ mm, 3 minuty, 4°C).



Obr. 20

500 μl supernatantu bylo odpipetováno a následně bylo přidáno 100 μl 0,1 mol.l^{-1} kyseliny askorbové. Peletka na stěně kyvety byla vyškrábnuta, homogenizována a celý obsah byl opět důkladně promíchán (Obr. 21). Obsah kyvety byl převeden na připravenou SPE kolonku.



Obr. 21

Pro extrakci jsme používali kolonku Spe-ed C18/18% (500 mg/3 ml). Samotný postup SPE byl následující. Nejprve jsme kolonku aktivovali 1 ml methanolu, promyli 1 ml destilované vody, nanесли vzorek, promyli 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5 a eluovali 2 ml hexanu. Po eluci hexanem byly stěny zkumavek pečlivě omyty 1 ml čistého hexanu. Po odpaření eluentu v koncentrátoru při 45 °C a pod vakuem jsme odparky rozpustili ve 100 µl methanolu.⁴⁹

4.2.4. Podmínky HPLC analýzy

Připravené vzorky jsme analyzovali pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie metodou vyvinutou pro stanovení vitamínu E v lidské erythrocytární membráně za těchto podmínek:

- mobilní fáze: 100% methanol
- kolona: monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Německo)
- průtok mobilní fáze: 2,5 ml/min
- nástřik: 50 µl
- doba analýzy: 2,5 minuty
- detekce: 295 nm
- teplota analýzy: 25°C^{50, 51}

4.3. Výsledky a diskuze

Tato práce přímo navazuje na metody, vyvinuté ve Výzkumné laboratoři GMK FN HK, zabývající se stanovením vitamínu E v lidské erythrocytární membráně. Během těchto prací byl nalezen vhodný postup zpracování odebraných erythrocytů⁴⁸, přípravy vzorku ultracentrifugací a její podmínky⁴⁹, typ SPE kolonky⁵², byl vyvinut a částečně optimalizován postup extrakce na pevné

fázi vitamínu E^{49, 52}, dále byl nalezen vhodný antioxidant⁴⁹. Extrahovaný vitamín E byl stanoven již vyvinutou a validovanou HPLC metodou.^{50, 51}

Cílem naší práce bylo zkvalitnit kvantifikaci vitamínu E v membráně lidských erytrocytů optimalizací postupu⁴⁹ s vnitřním standardem tokoferol acetátem.

4.3.1. Experiment s naředěnými erytrocyty

Cílem tohoto experimentu bylo usnadnění práce s promytými erytrocyty a lepší průtok vzorku SPE kolonkou. Postup vychází z kapitoly 4.2.3. Příprava vzorku a postup SPE. Čerstvé promyté erytrocyty jsme naředili v poměru 1:1 s 0,01 % BHT ve fyziologickém roztoku. Kvůli kapacitě ultracentrifugační kyvety jsme zachovali objem vzorku 100 μ l.

Postup:

- 1) **A:** obsah ultracentrifugační kyvety: 500 μ l HEPES; 500 μ l D-mannitolu; 100 μ l promytých neředěných erytrocytů; 11 μ l CaCl₂
B: obsah ultracentrifugační kyvety: 500 μ l HEPES; 500 μ l D-mannitolu; 100 μ l promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μ l CaCl₂
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm (288 000 \times g, r_{AV} = 31,8 mm); 3 minuty; 4°C
- 3) odebráno 500 μ l supernatantu; přidáno 100 μ l kyseliny askorbové
- 4) SPE
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μ l methanolu
- 6) HPLC analýza

Tab. 5

	Promyté erytrocyty	n	Ø Plocha α -tokoferolu	Ø Koncentrace α -tokoferolu [μ mol.l ⁻¹]
A	Neředěné	2	2705	2,02
B	Naředěné (1:1)	3	6980	5,18

Závěr: Snížením viskozity naředěním promytých erytrocytů vedlo k snazší manipulaci s erytrocyty, zlepšení průtoku SPE kolonkou a také ke zvýšení výtěžnosti extrakce (Tab. 5).

4.3.2. Vliv ultracentrifugačního kroku na vnitřní standard

Naším hlavním úkolem bylo zakomponovat námi zvolený vnitřní standard (tokoferol acetát) do stávající metody a zpřesnit tak kvantifikaci α -tokoferolu v erytrocytární membráně.

Nejdříve jsme se pokusili přidat vnitřní standard rozpuštěný v methanolu přímo do směsi vzorku v ultracentrifugační kyvetě v modifikaci před a po centrifugaci. Navíc jsme se pokusili zjednodušit postup vypuštěním činidel pro úpravu prostředí (D-mannitol, CaCl_2). Z důvodu snížení objemu vzorku jsme také neodebírali supernatant.

Postup:

- 1) **A:** obsah ultracentrifugační kyvety: 500 μl HEPES; 100 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
B: obsah ultracentrifugační kyvety: 500 μl HEPES; 100 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1)
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm ($288\,000 \times g$, $r_{AV} = 31,8 \text{ mm}$); 3 minuty; 4°C
- 3) **A:** přidáno 100 μl kyseliny askorbové
B: přidáno 100 μl kyseliny askorbové a 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- 4) SPE
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu
- 6) HPLC analýza

Tab. 6

	n	Ø Koncentrace α-tokoferolu [μmol.l ⁻¹]	Ø Plocha α-tokoferolu	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]*
A	2	1,45	4685	---	---
B	2	2,20	7209	799	6,4

Závěr: Vnitřní standard se během postupu ztrácí (Tab. 6), koncentraci α-tokoferolu podle jeho plochy nelze spolehlivě vypočítat.

Koncentrace α-tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnějšího standardu podle kalibrační přímky standardu α-tokoferolu ($y = 3360,5x - 191,08$).

4.3.3. Vnitřní standard v roztoku HEPES

Pro zjednodušení postupu a zpřesnění pipetování objemu vnitřního standardu jsme vytvořili roztok pufru HEPES s vnitřním standardem (tokoferol acetát $c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Také jsme ověřili vliv odebrání supernatantu.

Postup:

- 1) obsah ultracentrifugační kyvety: 500 μl (HEPES+TAC); 500 μl D-mannitolu; 100 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μl CaCl₂
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm (288 000 × g, $r_{AV} = 31,8$ mm); 3 minuty; 4°C
- 3) **A:** odebráno 500 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
B: přidáno 100 μl kyseliny askorbové
- 4) SPE
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu
- 6) HPLC analýza

* Spočítáno jako poměr plochy vnitřního standardu ve vzorku a průměrné plochy standardu tokoferol acetátu ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$, plocha = 12534,2).

Tab. 7

	n	Ø Koncentrace α -tokoferolu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Plocha α -tokoferolu	Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
A	2	2,26	7415	4119	32,8
B	2	2,21	7232	3455	27,5

Závěr: Postup s použitím směsi pufru HEPES a vnitřního standardu se neosvědčil. Odebrání 500 μl supernatantu nemá na výsledek žádný vliv. Vnitřní standard se během postupu ztrácí (Tab. 7).

Koncentrace α -tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnějšího standardu podle kalibrační přímky standardu α -tokoferolu ($y = 3360,5x - 191,08$).

4.3.4. Objem promytých erytrocytů

Zvýšením objemu vzorku jsme se pokusili zvýšit výtěžnost extrakce. Zdvojnásobili jsme tedy objem promytých naředěných erytrocytů (1:1). Kvůli zvýšení objemu erytrocytů jsme byli donuceni snížit objemy D-mannitolu a HEPES, aby nedošlo k překročení objemové kapacity ultracentrifugační kyvety.

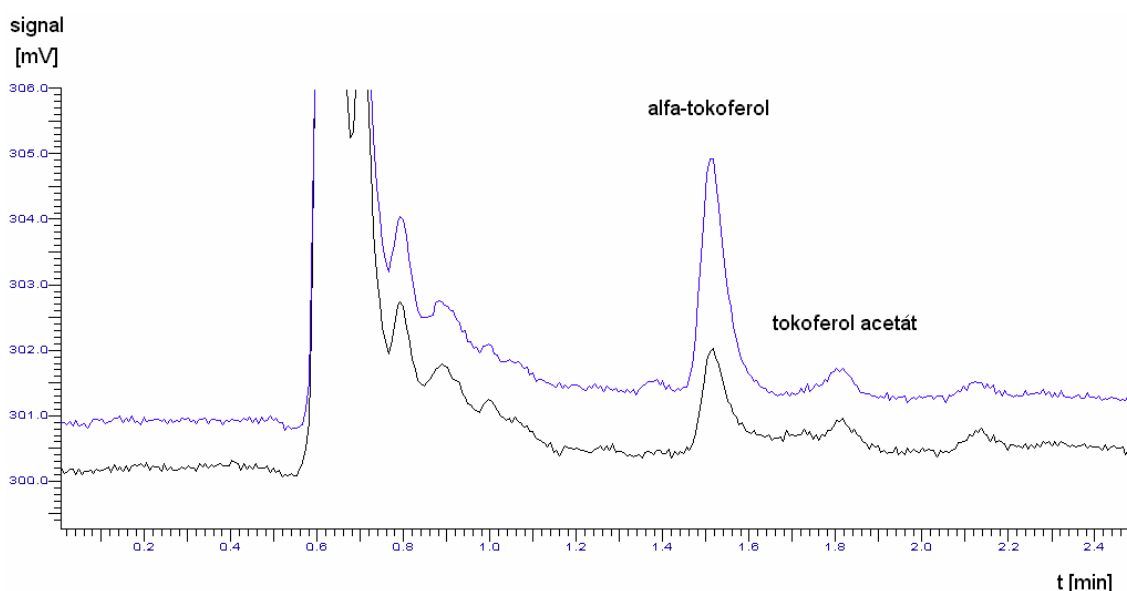
Postup:

- 1) **A:** obsah ultracentrifugační kyvety: 500 μl HEPES; 500 μl D-mannitolu; 100 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μl CaCl_2 ; 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
B: obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μl HEPES; 450 μl D-mannitolu; 200 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μl CaCl_2 ; 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm ($288\,000 \times g$, $r_{AV} = 31,8 \text{ mm}$); 3 minuty; 4°C
- 3) odebráno 500 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
- 4) SPE
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu

6) HPLC analýza

Tab. 8

	n	Naředěné promyté erythrocyty (1:1)	Ø Koncentrace α-tokoferolu [μmol.l ⁻¹]	Ø Plocha α-tokoferolu	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
A	2	100 μl	1,86	6063	779	12,4
B	2	200 μl	4,12	13651	1616	25,8



Chromatogram 1: Objem promytých erytrocytů.

• A: 100 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1) ($t_{r_{AT}} = 1,51 \text{ min}$; $t_{r_{TAC}} = 1,81 \text{ min}$); • B: 200 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1) ($t_{r_{AT}} = 1,51 \text{ min}$; $t_{r_{TAC}} = 1,81 \text{ min}$)

Závěr: Zvýšení objemu erytrocytů zvýšilo výtěžnost extrakce. Opět se vyskytl problém se ztrátou vnitřního standardu (Tab. 8).

Koncentrace α-tokoferolu byla spočítána rovnicí pomocí metody vnějšího standardu podle kalibrační přímky standardu α-tokoferolu ($y = 3360,5x - 191,08$).

4.3.5. Ztráty vnitřního standardu

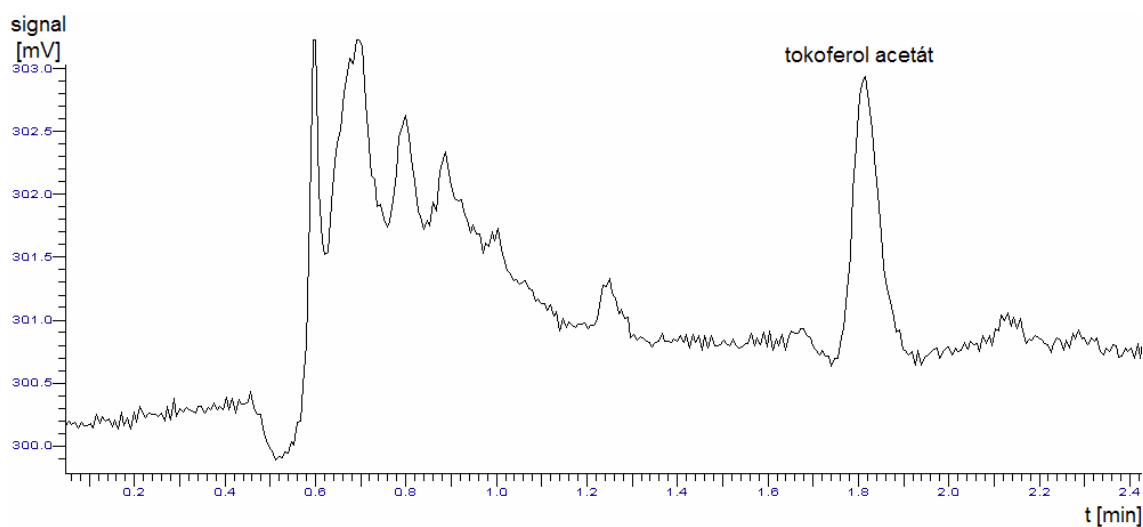
Následujícím experimentem jsme se pokusili zjistit, jak se extrahuje samotný roztok vnitřního standardu tokoferol acetátu ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) nanesený v objemu $8 \mu\text{l}$ na připravenou SPE kolonku.

Postup:

- 1) SPE
- 2) odparek rozpuštěn ve $100 \mu\text{l}$ methanolu
- 3) HPLC analýza

Tab. 9

n	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
2	9053	72,2



Chromatogram 2: Roztok vnitřního standardu tokoferol acetátu ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) nanesený v objemu $8 \mu\text{l}$ na připravenou SPE kolonku. ($t_{rTAC} = 1,81 \text{ min}$)

Závěr: K hlavním ztrátám vnitřního standardu dochází mimo extrakční krok (Tab. 9).

Dále jsme se pokusili zjistit, na kterém místě v postupu dochází ke ztrátám vnitřního standardu. Kvůli jednoduššímu provedení a zabránění vzniku interferencí jsme provedli celý postup bez přidání erytrocytů. Proto jsme také v některých postupech odebírali zmenšený objem supernatantu. Vnitřní standard jsme zkoušeli přidat před i po ultracentrifugaci.

Zajímalo nás, jestli se vnitřní standard nevymývá do odpadu nebo nezůstává v ultracentrifugační zkumavce. Proto jsme provedli HPLC analýzu vzorků připravených LLE odpadu po promytí vzorku 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5 a obsahu vyprázdněné ultracentrifugační zkumavky.

Postup:

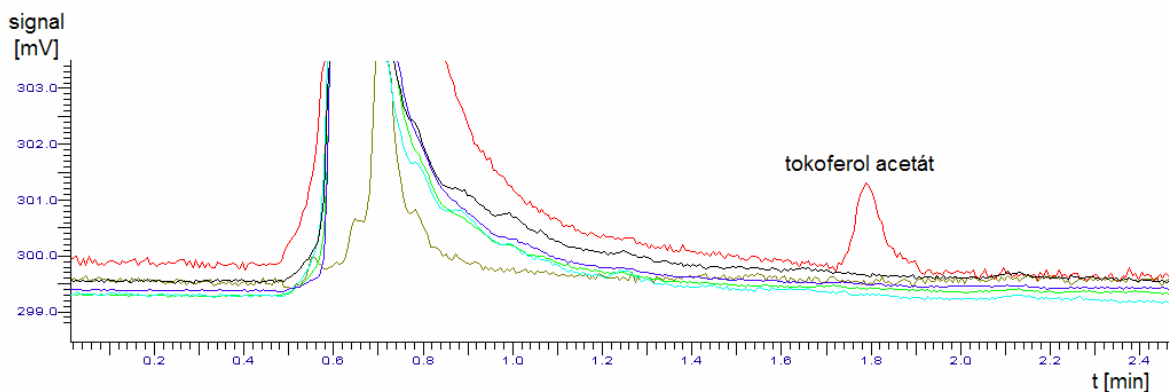
- 1) **A:** obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μ l HEPES; 450 μ l D-mannitolu; 11 μ l CaCl₂; 8 μ l TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
B: obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μ l HEPES; 450 μ l D-mannitolu; 11 μ l CaCl₂
C: obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μ l HEPES; 450 μ l D-mannitolu; 11 μ l CaCl₂; 8 μ l TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
D: obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μ l HEPES; 450 μ l D-mannitolu; 11 μ l CaCl₂
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm ($288\,000 \times g$, $r_{AV} = 31,8 \text{ mm}$); 3 minuty; 4°C
- 3) **A:** přidáno 100 μ l kyseliny askorbové
B: přidáno 100 μ l kyseliny askorbové a 8 μ l TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
C: odebráno 300 μ l supernatantu; přidáno 100 μ l kyseliny askorbové
D: odebráno 300 μ l supernatantu; přidáno 100 μ l kyseliny askorbové a 8 μ l TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- 4) **A:** SPE
B: SPE
C: SPE
D: SPE
E: LLE odpadu po promytí vzorku. K odpadu jsem přidali 2,5 ml n-hexanu, poté jsme vzorek nechali 5 minut intenzivně třepat na třepačce, odstředili

(2000 × g, 10 minut, 4 °C), poté z horní hexanové fáze odebrali 2,0 ml do nové zkumavky. Vzorke jsme nechali odpařit v koncentrátoru v módu pro těkavé kapaliny.

- 5) **A:** odpárek rozpuštěn ve 100 µl methanolu
B: odpárek rozpuštěn ve 100 µl methanolu
C: odpárek rozpuštěn ve 100 µl methanolu
D: odpárek rozpuštěn ve 100 µl methanolu
E: odpárek rozpuštěn ve 100 µl methanolu
F: obsah vyprázdněných ultracentrifugačních zkumavek po odebrání vzorku rozpuštěn ve 100 µl methanolu
- 6) HPLC analýza

Tab. 10

	n	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
A	2	---	---
B	2	---	---
C	2	---	---
D	2	---	---
E	4	---	---
F	4	5166	41,2



Chromatogram 3: Ztráty vnitřního standardu.

- **A:** IS přidán do obsahu ultracentrifugační kyvety před ultracentrifugací; bez odebrání supernatantu;
- **B:** IS přidán do obsahu ultracentrifugační kyvety po ultracentrifugaci; bez odebrání supernatantu; • **C:** IS přidán do obsahu ultracentrifugační kyvety před ultracentrifugací; supernatant odebrán; • **D:** IS přidán do obsahu ultracentrifugační kyvety po ultracentrifugaci; supernatant odebrán; • **E:** LLE odpadu po promytí vzorku; • **F:** obsah vyprázdněných ultracentrifugačních zkumavek po odebrání vzorku ($t_{r\text{TAC}} = 1,79 \text{ min}$)

Závěr: Vnitřní standard přidáný do objemu vzorku se s ním dostatečně nemísí a ulpívá na stěně ultracentrifugační zkumavky (Tab. 10).

4.3.6. Odpaření vnitřního standardu

Dále jsme se pokusili vyhnout nedostatečnému smísení vnitřního standardu a vzorku odpařením objemu vnitřního standardu, který jsme pipetovali do ultracentrifugační a skleněné zkumavky.

Postup:

- 1) **A:** Do ultracentrifugační zkumavky jsme napipetovali 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a nechali odpařit. Dále jsme pokračovali běžným postupem.
- B:** Do ultracentrifugační zkumavky jsme napipetovali 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a nechali odpařit. Dále jsme pokračovali běžným postupem.

- 2) obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μl HEPES; 450 μl D-mannitolu; 11 μl CaCl_2
- 3) ultracentrifugace: 90 000 rpm ($288\,000 \times g$, $r_{AV} = 31,8$ mm); 3 minuty; 4°C
- 4) **A:** odebráno 300 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
B: přidáno 100 μl kyseliny askorbové
C: odebráno 300 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
D: přidáno 100 μl kyseliny askorbové
- 5) **C:** Takto připravený vzorek jsme převedli do skleněné zkumavky, do níž bylo předem napipetováno 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a jehož objem byl odpařen. Po přidání vzorku byl obsah skleněné zkumavky důkladně promíchán. Dále jsme pokračovali běžným postupem.
D: Takto připravený vzorek jsme převedli do skleněné zkumavky, do níž bylo předem napipetováno 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a jehož objem byl odpařen. Po přidání vzorku byl obsah skleněné zkumavky důkladně promíchán. Dále jsme pokračovali běžným postupem.
- 6) SPE
- 7) odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu
- 8) HPLC analýza

Tab. 11

	n	\emptyset Plocha IS	\emptyset Výtěžnost IS [%]
A	2	---	---
B	2	337	2,7
C	2	866	6,9
D	2	464	3,7

Závěr: Postup s odpařením vnitřního standardu ve zkumavce, do níž byl následně přidán vzorek, se neosvědčil (Tab. 11).

4.3.7. Nanese ní vnitřního standardu do objemu vzorku na SPE kolonku

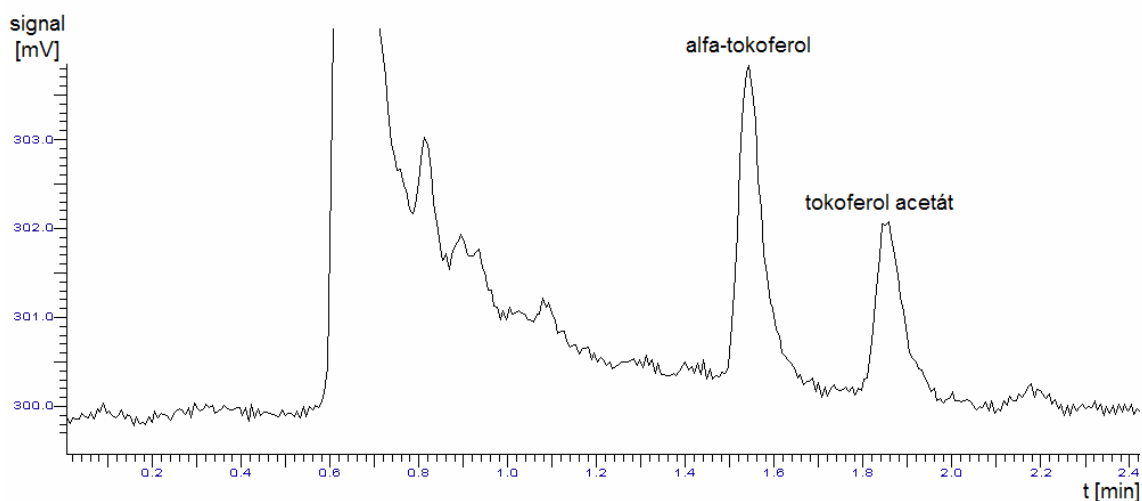
V následujícím postupu jsme vyzkoušeli nanést vnitřní standard do objemu vzorku přímo na SPE kolonku. Pokus jsme provedli bez a s přidávanými promytými erytrocyty naředěnými s BHT ve fyziologickém roztoku v poměru 1:1.

Postup:

- 1) **A:** obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μl HEPES; 450 μl D-mannitolu; 11 μl CaCl_2
B: obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μl HEPES; 450 μl D-mannitolu; 200 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μl CaCl_2
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm ($288\,000 \times g$, $r_{AV} = 31,8$ mm); 3 minuty; 4°C
- 3) **A:** odebráno 300 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
B: odebráno 500 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
- 4) SPE: přidáno 8 μl TAC ($c = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$) do objemu vzorku přímo na SPE kolonce
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu
- 6) HPLC analýza

Tab. 12

	N	Ø Koncentrace α -tokoferolu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Ø Plocha α -tokoferolu	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
A	2	---	---	7236	57,7
B	2	3,05	10057	7445	59,4



Chromatogram 4: Nanesení vnitřního standardu do objemu vzorku přímo na SPE kolonku.
($t_{rAT} = 1,54 \text{ min}$; $t_{rTAC} = 1,85 \text{ min}$)

Závěr: Nanesením vnitřního standardu přímo na SPE kolonku do objemu vzorku se zvýšila jeho výtěžnost (Tab. 12).

Koncentrace α -tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnějšího standardu podle kalibrační přímky standardu α -tokoferolu ($y = 3360,5x - 191,08$).

4.3.8. Vliv objemu vnitřního standardu

Pro tento experiment jsme jako vzorek využili standard α -tokoferolu ($c = 2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) s tokoferol acetátem ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Zajímalo nás, jak ovlivní objem standardu naneseného na SPE kolonku výtěžnost.

Postup:

- 1) **A:** SPE: vzorek: 500 μl standardu
B: SPE: vzorek: 200 μl standardu + 300 μl MeOH
C: SPE: vzorek: 100 μl standardu + 400 μl MeOH
- 2) **A:** odparek rozpuštěn ve 500 μl methanolu
B: odparek rozpuštěn ve 200 μl methanolu
C: odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu
- 3) HPLC analýza

Tab. 13

	Objem IS [μl]	n	$\bar{\text{O}}$ Koncentrace α -tokoferolu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	$\bar{\text{O}}$ Plocha α -tokoferolu	$\bar{\text{O}}$ Plocha IS	$\bar{\text{O}}$ Výtěžnost IS [%]
A	500	2	1,88	6000	12301	98,1
B	200	2	1,57	4942	12166	97,0
C	100	2	1,19	3572	11763	93,8

Závěr: Při zachovaném ředicím poměru a se vzrůstajícím objemem naneseného vnitřního standardu roste i jeho vyextrahované množství (Tab. 13).

Koncentrace α -tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnitřního standardu rovnicí podle kalibrační přímky poměru koncentrace α -tokoferolu a poměru ploch standardu α -tokoferolu a vnitřního standardu tokoferol acetátu ($y = 0,2684x - 0,0155$).

V dalším postupu jsme se tedy rozhodli použít objem 500 μl 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ tokoferol acetátu, který byl na SPE kolonku nanesen před a po nanesení vzorku. Zajímalo nás, jak ovlivní vnitřní standard rozpuštěný v methanolu SPE kolonku, na niž už byl nanesen vzorek, jestli dojde k jejímu ucpání.

Postup:

- 1) obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μl HEPES; 450 μl D-mannitolu; 200 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μl CaCl_2
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm ($288\,000 \times g$, $r_{AV} = 31,8\text{ mm}$); 3 minuty; 4°C
- 3) odebráno 500 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
- 4) SPE: aktivace: 1 ml methanolu
promytí: 1 ml destilované vody
A: nanesení IS: 500 μl TAC ($c = 4\ \mu\text{mol.l}^{-1}$)
promytí: 1 ml destilované vody
nanesení vzorku

promytí: 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5

B: nanesení vzorku

promytí: 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5

nanesení IS: 500 µl TAC (c = 4 µmol.l⁻¹)

promytí: 1 ml destilované vody

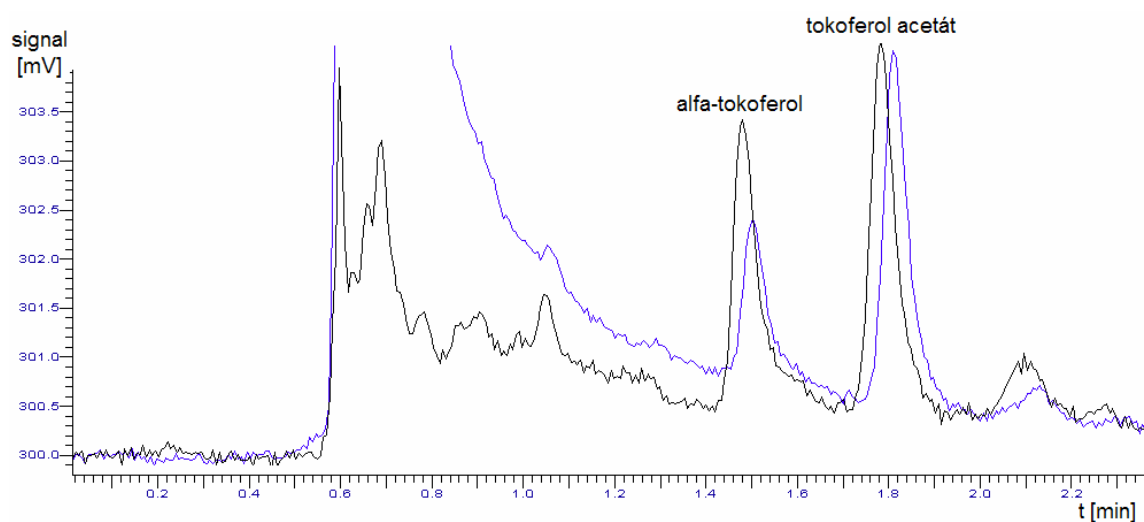
eluze: 2 ml hexanu

5) odparek rozpuštěn ve 100 µl methanolu

6) HPLC analýza

Tab. 14

	n	Ø Koncentrace α-tokoferolu [µmol.l ⁻¹]	Ø Plocha α-tokoferolu	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
A	2	2,63	9175	13302	106,0
B	2	3,29	11409	13157	104,9



Chromatogram 5: Vnitřní standard nanesen na SPE kolonku před a po nanesení vzorku.

• **A:** IS na SPE kolonku nanesen před nanesením vzorku ($t_{r AT} = 1,51$ min; $t_{r TAC} = 1,83$ min); • **B:** IS na SPE kolonku nanesen po nanesení vzorku ($t_{r AT} = 1,51$ min; $t_{r TAC} = 1,82$ min)

Závěr: Extrakce vnitřního standardu je u obou postupů uspokojivá (Tab. 14). Postup s nanesením vnitřního standardu až po vzorku vhodně ovlivňuje

i čistotu extraktu. Díky barevnosti vzorku je dobře patrné, že průtok, potažmo i promývání SPE kolony není zcela rovnoměrné a promytí 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5 není dostačující. Postup s nanesením vnitřního standardu až po vzorku se zařazením dalšího promývacího kroku se nám osvědčil.

Koncentrace α -tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnitřního standardu rovnicí podle kalibrační přímky poměru koncentrace α -tokoferolu a poměru ploch standardu α -tokoferolu a vnitřního standardu tokoferol acetátu ($y = 0,2684x - 0,0155$).

4.3.9. Eluční objem

Vyzkoušeli jsme porovnat výtěžnost extrakce původním postupem a při navýšení elučního objemu na 3 ml hexanu.

Postup:

- 1) obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μ l HEPES; 450 μ l D-mannitolu; 200 μ l promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μ l CaCl₂
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm (288 000 \times g, $r_{AV} = 31,8$ mm); 3 minuty; 4°C
- 3) odebráno 500 μ l supernatantu; přidáno 100 μ l kyseliny askorbové
- 4) SPE: aktivace: 1 ml methanolu
promytí: 1 ml destilované vody
nanesení vzorku
promytí: 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5
nanesení IS: 500 μ l TAC ($c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
promytí: 1 ml destilované vody
A: eluce: 2 ml hexanu
B: eluce: 2+1 ml hexanu
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μ l methanolu
- 6) HPLC analýza

Tab. 15

	n	Ø Koncentrace α-tokoferolu [μmol.l ⁻¹]	Ø Plocha α-tokoferolu	Ø Plocha IS	Ø Výtěžnost IS [%]
A	2	3,29	11409	13157	104,9
B	2	3,12	11526	13986	111,5

Závěr: Zvýšení elučního objemu neovlivní výtěžnost extrakce. Eluční objem 2 ml hexanu je dostačující. Zvýšení elučního objemu navíc zbytečně prodloužilo dobu odpařování (Tab. 15).

Koncentrace α-tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnitřního standardu rovnicí podle kalibrační přímky poměru koncentrace α-tokoferolu a poměru ploch standardu α-tokoferolu a vnitřního standardu tokoferol acetátu ($y = 0,2684x - 0,0155$).

4.3.10. Opakovatelnost

Opakovatelnost jsme provedli v počtu 10 vzorků postupem, který jsme vyhodnotili jako neoptimálnější.

Postup:

- 1) obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μl HEPES; 450 μl D-mannitolu; 200 μl promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μl CaCl₂
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm (288 000 × g, r_{AV} = 31,8 mm); 3 minuty; 4°C
- 3) odebráno 500 μl supernatantu; přidáno 100 μl kyseliny askorbové
- 4) SPE: aktivace: 1 ml methanolu
promytí: 1 ml destilované vody
nanesení vzorku
promytí: 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5

nanesení IS: 500 μl TAC ($c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$)

promytí: 1 ml destilované vody

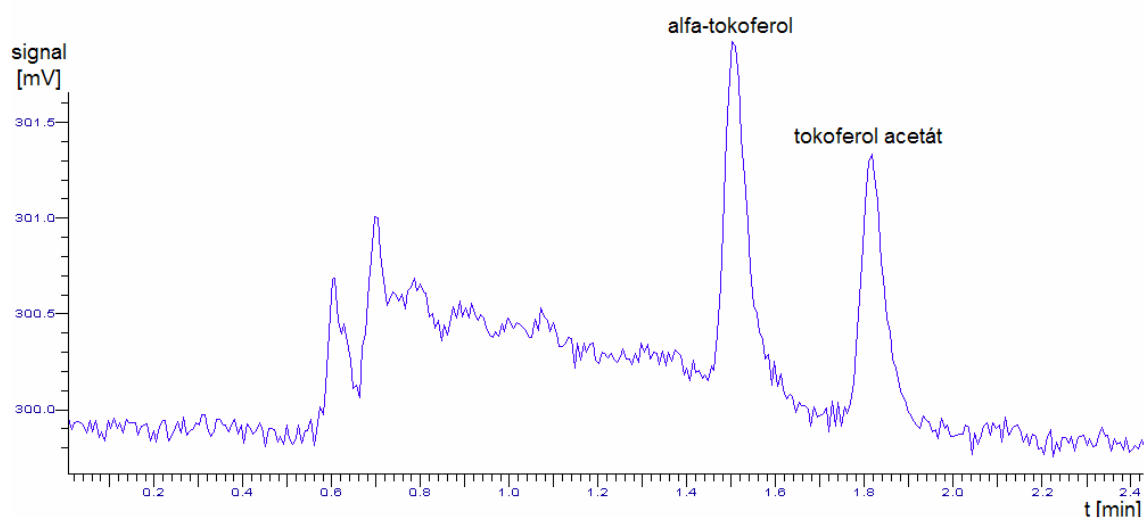
eluze: 2 ml hexanu

5) odparek rozpuštěn ve 100 μl methanolu

6) HPLC analýza

Tab. 16

	Koncentrace α-tokoferolu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Plocha α-tokoferolu	Plocha IS	Výtěžnost IS [%]
1	4,43	13926	11792	94,0
2	3,95	11300	10746	85,7
3	4,53	14180	11748	93,7
4	4,51	12768	10630	84,7
5	4,06	11358	10498	83,7
6	4,42	13968	11854	94,5
7	4,42	13154	11168	89,0
8	3,92	11466	10966	87,4
9	3,96	12042	11424	91,1
10	3,96	12100	11466	91,4
Průměr	4,22	12626	11229	89,5
SD	0,26	1132	502	4,01
RSD [%]	6,27	8,96	4,47	4,48



Chromatogram 6: Chromatogram stanovení α -tokoferolu z erytrocytární membrány s novou metodou přípravy vzorku. ($t_{rAT} = 1,51 \text{ min}$; $t_{rTAC} = 1,83 \text{ min}$)

Závěr: Podle daného postupu jsem zpracovali 10 vzorků promytých naředěných erytrocytů (1:1). Relativní směrodatná odchylka koncentrace α -tokoferolu byla 6,27 % (Tab. 16).

Koncentrace α -tokoferolu byla spočítána pomocí metody vnitřního standardu rovnicí podle kalibrační přímky poměru koncentrace α -tokoferolu a poměru ploch standardu α -tokoferolu a vnitřního standardu tokoferol acetátu ($y = 0,2684x - 0,0155$).

4.3.11. Správnost

Správnost postupu byla prověřena pomocí standardních přídavek α -tokoferolu o koncentracích 1, 5 a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Standardní přídávky byly zařazeny do kroku vnesení vnitřního standardu na SPE kolonku a byly analyzovány běžným způsobem.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí výtěžnosti R_i , jež byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i(\%) = 100 \cdot \frac{x_i - x_v}{x_0}$$

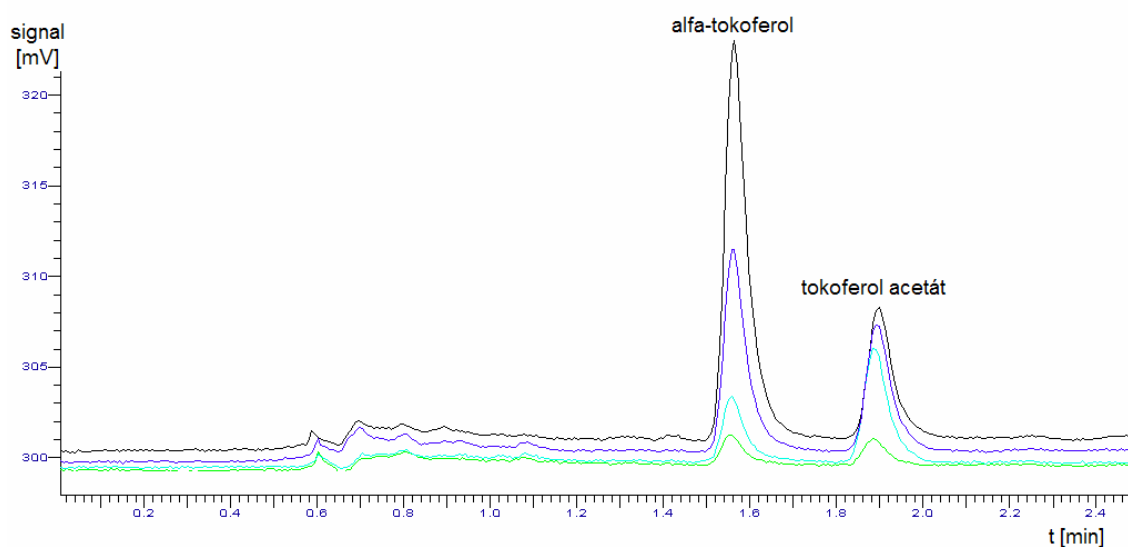
- x_i koncentrace ve vzorku zjištěná při analýze po přidavku standardu
 x_v koncentrace ve vzorku zjištěná při analýze bez přidavku standardu
 x_0 vypočtená koncentrace přidavku standardu

Postup:

- 1) obsah ultracentrifugační kyvety: 450 μ l HEPES; 450 μ l D-mannitolu; 200 μ l promytých naředěných erytrocytů (1:1); 11 μ l CaCl₂
- 2) ultracentrifugace: 90 000 rpm (288 000 \times g, $r_{AV} = 31,8$ mm); 3 minuty; 4°C
- 3) odebráno 500 μ l supernatantu; přidáno 100 μ l kyseliny askorbové
- 4) SPE: aktivace: 1 ml methanolu
promytí: 1 ml destilované vody
nanesení vzorku
promytí: 1 ml H₂O : MeOH = 95 : 5
A: nanesení IS: 500 μ l TAC ($c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
B: nanesení standardního přidavku:
500 μ l [TAC ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + AT ($c = 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$)]
C: nanesení standardního přidavku:
500 μ l [TAC ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + AT ($c = 5 \mu\text{mol.l}^{-1}$)]
D: nanesení standardního přidavku:
500 μ l [TAC ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + AT ($c = 10 \mu\text{mol.l}^{-1}$)]
promytí: 1 ml destilované vody
eluce: 2 ml hexanu
- 5) odparek rozpuštěn ve 100 μ l methanolu
- 6) HPLC analýza

Tab. 17

	Standardní přídavek [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	n	$\bar{\varnothing}$ Koncentrace α -tokoferolu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	$\bar{\varnothing}$ R_i [%]
A	blank	4	4,22	
B	1	4	5,18	96,43
C	5	4	9,12	100,17
D	10	4	14,28	100,77



Chromatogram 7: Metoda standardních přídavků. ($t_{r,AT} = 1,56 \text{ min}$; $t_{r,TAC} = 1,89 \text{ min}$)

- A: blank; ● B: standardní přídavek: $500 \mu\text{l}$ [TAC ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + AT ($c = 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$)];
- C: standardní přídavek: $500 \mu\text{l}$ [TAC ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + AT ($c = 5 \mu\text{mol.l}^{-1}$)]; ● D: standardní přídavek: $500 \mu\text{l}$ [TAC ($c = 20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + AT ($c = 10 \mu\text{mol.l}^{-1}$)]

Závěr: Průměr výtěžností α -tokoferolu byl 99,12 %. Správnost je vyhovující (Tab. 17).

5. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla vyvinuta, optimalizována a částečně zvalidována metoda přípravy vzorku pro stanovení α -tokoferolu v erythrocytární membráně využívající separační techniku ultracentrifugace, extrakční techniku SPE a kvantifikaci pomocí vnitřního standardu tokoferol acetátu.

Postup vyvinuté metody:

Do ultracentrifugační kyvety jsme napipetovali 450 μl 5 mmol.l^{-1} HEPES a 450 μl 50 mmol.l^{-1} D-mannitolu. Následovalo odebrání promytých vytemperovaných erythrocytů pomocí pístové pipety. Pipeta byla zvenku pečlivě očištěna buničinou a 200 μl promytých erythrocytů bylo vpraveno do kyvety. Poté jsme přidali 11 μl 1 mol.l^{-1} CaCl_2 a obsah kyvety jsme důkladně promíchali. Vzorky byly ultracentrifugovány (90 000 rpm = 288 000 \times g, $r_{\text{AV}} = 31,8$ mm, 3 minuty, 4°C).

500 μl supernatantu bylo odpipetováno a následně bylo přidáno 100 μl 0,1 mol.l^{-1} kyseliny askorbové. Peletka na stěně kyvety byla vyškrábnuta, homogenizována a celý obsah byl opět důkladně promíchán. Obsah kyvety byl převeden na připravenou SPE kolonku.

Pro extrakci jsme používali kolonku Spe-ed C18/18% (500 mg/3 ml). Samotný postup SPE byl následující. Nejprve jsme kolonku aktivovali 1 ml methanolu, promyli 1 ml destilované vody, nanесли vzorek, promyli 1 ml $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 95 : 5$, nanесли 500 μl vnitřního standardu tokoferol acetátu ($c = 4 \mu\text{mol.l}^{-1}$), promyli 1 ml destilované vody, eluovali 2 ml hexanu. Po eluci hexanem byly stěny zkumavek pečlivě omyty 1 ml čistého hexanu.

Po odpaření eluentu v koncentrátoru při 45 °C a pod vakuem jsme odparky rozpustili ve 100 μl methanolu a analyzovali pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie za těchto podmínek:

- mobilní fáze: 100% methanol

- kolona: monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Německo)
- průtok mobilní fáze: 2,5 ml/min
- nástřik: 50 µl
- doba analýzy: 2,5 minuty
- detekce: 295 nm
- teplota analýzy: 25°C^{50, 51}

Nově vyvinutá metoda úpravy vzorku byla částečně zvalidována.^{53, 54} Opakovatelnost metody byla hodnocena jako relativní směrodatná odchylka koncentrace α -tokoferolu, RSD = $\pm 6,27$ %.

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku na třech různých koncentračních úrovních. Průměrná hodnota výtěžnosti pro α -tokoferol byla stanovena na $99,12 \pm 1,92$ %.

Úprava vzorků erytrocytů pomocí nově vyvinuté metody usnadní stanovení vitamínu E v erytrocytární membráně metodou HPLC ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosin difosfát
AT	α -tokoferol
BHT	butylhydroxytoluen
DHA	dokosahexaenová kyselina
ED	elektrochemická detekce
GC	gas chromatography, plynová chromatografie
GMK FN HK	Gerontologická a metabolická klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové
GSH	redukováný glutathion
GS-SG	oxidováný glutathion
HDL	high density lipoprotein, lipoprotein vysoké hustoty
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
K ₃ EDTA	tri-draselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
KOH	hydroxid draselný
konst	konstantní
LDL	low density lipoprotein, lipoprotein nízké hustoty
LLE	liquid-liquid extraction
MeOH	methanol
MS	mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie
NP	normal phase, normální fáze
ODS	oktadecyl silikagel
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PDA	photodiode array, detektor diodového pole
pH	potenciál vodíku, vodíkový exponent

pK _a	disociační konstanta
PUFA	polyunsaturated fatty acids, polynenasycené mastné kyseliny
R•	volný radikál
r _{AV}	vzdálenost osy otáčení a středu kyvety
R _i	výtěžnost
RP	reverse phase, reverzní fáze
rpm	revolutions per minute, otáčky za minutu
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SPE	solid phase extraction
TAC	tokoferol acetát
TLC	thin layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie
TMS	trimethylsilyl
TocO•	radikál tokoferolu
TocOH	redukovaný tokoferol
t _r	retenční čas
UV	ultraviolet, ultrafialové záření
w/w	hmotnostní procento

POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ Ďoubal, S.: *Vybrané kapitoly z biofyziky*. Hradec Králové, 2006. S. 66-70.
- ² *Instructions for Using the TLA-100.2 Fixed Angle Rotor – In the Beckman TL-100 Tabletop Ultracentrifuge*. Palo Alto: Spinco Division of Beckman Instruments, 1989.
- ³ Rickwood, D., Ford, T. C., Steensgaard, J.: *Centrifugation: Essential data*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 1994. S. 1-12.
- ⁴ Griffith, O. M.: *Techniques of Preparative, Zonal, and Continuous Flow Ultracentrifugation*. Beckman Instruments, Fullerton, CA, 1986:9. S. 1-11.
- ⁵ Vávrová, J.: *Datový standard MZ ČR. Odstředování (centrifugace)*. 2009. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVACO.htm
- ⁶ Cole-Parmer Technical Library: *Basics of Centrifugation*. Obrázky centrifugace. Dostupné z: <http://www.masterflex.com/techinfo/techinfo.asp?htmlfile=basic-centrifugation.htm&ID=30>
- ⁷ Vávrová, J.: *Datový standard MZ ČR. Odstředování (centrifugace)*. 2009. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/JVAAB.htm
- ⁸ Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. S. 46-50. ISBN 80-86369-07-2
- ⁹ Simpson, N. J. K.: *Solid-phase extraction. Principles, Techniques, and Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. S. 2-5, 10-11, 19-37, 307-330, 433, 493-496. ISBN 0-8247-0021-X
- ¹⁰ *Guide to Solid Phase Extraction*. SUPELCO Bulletin. 1998; 910: 1-12.
- ¹¹ Procházková, D.: *Extrakce na tuhou fázi*. Sigma-Aldrich Co. Technical Document. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/01.Par.0001.File.tmp/01.pdf

-
- ¹² Mutavdžić Pavlović, D., Babić, S., Horvat, A. J. M., Kaštelan-Macan, M.: *Sample preparation in analysis of pharmaceuticals*. Trends in Analytical Chemistry. 2007; 26 (11): 1062-1075.
- ¹³ Gilar, M., Bouvier, E. S. P., Compton, B. J.: *Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods*. Journal of Chromatography A. 2001; 909: 111-135.
- ¹⁴ Hui, Y. H.: *Handbook of food science, technology, and engineering*. New York: Taylor & Francis Group. A CRC Press, 2006. S. 47: 34-36. ISBN 0-8493-9849-5
- ¹⁵ Hlúbik, P.: *Vitaminy – důležitý faktor ovlivňující zdraví. 1. část – Metabolismus liposolubilních vitaminů*. Interní medicína pro praxi. 2001; 11: 504-505.
- ¹⁶ Murray, R. K., Granner, D. K., Davis, J. C., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26. vydání. USA: The McGraw-Hill Companies, 2003. S. 486-487. ISBN 0-07-138901-6
- ¹⁷ Hosomi, A., Arita, M., Sato, Y., Mitose, Ch., Ueda, T., Igarashi, O., Arai, H., Inoue, K.: *Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs*. FEBS Letters. 1997; 409 (1, 2): 105-108.
- ¹⁸ Atkinson, J., Epand, R. F., Epand, R. M.: *Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review*. Free Radical Biology & Medicine. 2008; 44: 739-764.
- ¹⁹ Stone, W. L., Papas, A. M.: *Tocopherol and the Etiology of Colon Cancer. Review*. Journal of the National Cancer Institute. 1997; 89 (14): 1006-1014.
- ²⁰ Holeček, V., Rokyta, R., Vlasák, R.: *Antioxidanty a jejich gastrointestinální absorpce a interference jejich účinků*. Československá fyziologie. 2008; 57: 24, 25, 27.
- ²¹ Rupérez, F.J., Martín, D., Herrera, E., Barbas, C.: *Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices*. Journal of Chromatography. 2001; 935 (1, 2): 45-69.
- ²² Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005. S. 540-541. ISBN 80-246-0850-2
- ²³ Knekt, P.: *Natural Antioxidants in Human Health and Disease. Vitamin E and cancer Prevention*. New York: Academic Press, 1994. S. 199-202

-
- ²⁴ Hercberg, S.: *Vitamin E – an important antioxidant in humans*. *Medicine in focus*. 1996; 2: 9-11.
- ²⁵ Mino, M., Kitagawa, M., Nakagawa, S.: *Red blood cell tocopherol concentrations in a normal population of Japanese children and premature infants in relation to the assessment of vitamin E status*. USA: *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1985; 41: 631-638.
- ²⁶ Bureš, J., Horáček, J. a pořadatelé: *Základy vnitřního lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén, Praha: Karolinum, 2003. S. 825-839. ISBN 80-7262-208-0 (Galén), ISBN 80-246-0677-9 (Karolinum)
- ²⁷ Ďoubal, S., Klemra, P., Filipová, M., Dolejš, J.: *Teoretická gerontologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1997. S. 25, 35-50, 76-87. ISBN 80-7184-481-0
- ²⁸ Racek, J. et al.: *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2006. S. 143. ISBN 80-262-324-9
- ²⁹ Chandra, V., Jasti, J., Kaur, P., Betel, Ch., Srinivasan, A., Singh, T.P.: *First Structural Evidence of a Specific Inhibition of Phospholipase A2 by α -Tocopherol (Vitamin E) and its Implications in Inflammation: Crystal Structure of the Complex Formed Between Phospholipase A2 and α -Tocopherol at 1.8 Å Resolution*. *Journal of Molecular Biology*. 2002; 320 (2): 215-222.
- ³⁰ Reiter, E., Juany, O., Christen, S.: *Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol*. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007; 28 (5-6): 668-691.
- ³¹ Simon, E., Gariépy, J., Cogy, A., Moatti, N., Simon, A., Paul, J. L.: *Erythrocyte, but not plasma, vitamin E concentration is associated with carotid intima-media thickening in asymptomatic men at risk for cardiovascular disease*. *Atherosclerosis*. 2001; 159 (1): 193-200.
- ³² Constantinescu, A., Han, D., Packer, L.: *Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes*. *J Biol Chem*. 1993; 268 (15): 10906-10913.
- ³³ Shinozaki, K., Takeda, H., Inazu, M., Matsumiya, T., Takasaki, M.: *Abnormal incorporation and utilization of α -tocopherol in erythrocyte membranes of*

-
- streptozotocin-induced diabetic rats*. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 456: 133– 139.
- ³⁴ Russel, N. J., Powell, G. M., Jones, J. G., Winterburn, P. J., Basford, J. M.: *Blood biochemistry*. Beckenham: Croom Helm, 1982. S. 5-10. ISBN 0-7099-0003-1.
- ³⁵ Finean, J. B., Michell, R. H.: *Membrane structure*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. S.112-121. ISBN 0-444-80303-3.
- ³⁶ Lodish, H., Berk, A., Baltimore, D., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Darnell, J.: *Molecular Cell Biology. Schematic diagram of typical membrane proteins in a biological membrane*. W. H. Freeman & Co., 2000. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A608&rendertype=figure&id=A609>
- ³⁷ Raess, B. U., Tunnickliff, G.: *The Red Cell Membrane: A model for solute transport*. Clifton: The Humana Press, 1989. S. 401-409. ISBN 0-89603-158-6.
- ³⁸ Wang, X., Quinn, P. J.: *Vitamin E and its function in membranes*. *Progress in Lipid Research*. 1999; 38: 309-335.
- ³⁹ Atkinson, J., Epand, R. F., Epand, R. M.: *Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review*. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 44: 739–764.
- ⁴⁰ Wang, F., Wang, T., Lai, J., Li. M., Zou, C.: *Vitamin E inhibits hemolysis induced by hemin as a membrane stabilizer*. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 71: 799-805.
- ⁴¹ Vatassery G. T., Smith W. E., Quach H. T.: *A Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of α -Tocopherol and Tocopherolquinone in Human Red Blood Cells and Other Biological Samples where Tocopherol Is Easily Oxidized during Sample Treatment*. *Analytical Biochemistry*. 1993; 214 (2): 426-430.
- ⁴² Chow, C. K.: *Distribution of tocopherols in human plasma and red blood cells*. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1975; 28: 756-760.
- ⁴³ Brown, K. M., Morrice, P. C., Duthie, G. G.: *Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and*

-
- nonsmokers: dose response to vitamin E supplementation. American Journal of Clinical Nutrition. 1997; 65: 496-502.*
- ⁴⁴ Simon, E., Paul, J. L., Atger, V., Simon, A., Moatti, N.: *Study of vitamin E net mass transfer between α -tocopherol-enriched HDL and erythrocytes: application to asymptomatic hypercholesterolemic men. Free Radical Biology and Medicine. 2000; 28 (5): 815-823.*
- ⁴⁵ Gonzalez-Corbella, M. J., Lloberas-Blanch, N., Castellote-Bargallo, A. I., Lopez-Sabater, M. C., Rivero-Urgell, M.: *Determination of α -tocopherol in plasma and erythrocytes by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B. 1994; 660: 395-400.*
- ⁴⁶ Lehmann, J., Rao, D. D., Canary, J. J., Judd, J. T.: *Vitamin E and relationships among tocopherols in human plasma, platelets, lymphocytes, and red blood cells. American Journal of Clinical Nutrition. 1988; 47: 470-474.*
- ⁴⁷ Takeda, H., Shibuya, T., Yanagawa, K., Kanoh, H., Takasaki, M.: *Simultaneous determination of α -tocopherol and α -tocopherolquinone by high-performance liquid chromatography and coulometric detection in the redox mode. Journal of Chromatography A. 1996; 722: 287-294.*
- ⁴⁸ Solichová, D.: *Klinické využití metody HPLC pro stanovení liposolubilních vitamínů a neopterinu. Disertační práce. Hradec Králové, GMK FN HK, 2003.*
- ⁴⁹ Denková, B.: *Úprava vzorku pro stanovení α -tokoferolu v erytrocytární membráně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Rigorózní práce. Hradec Králové, FaF UK, 2010*
- ⁵⁰ Urbánek, L., Solichová, D., Melichar, B.: *Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. Analytica Chimica Acta. July 2006. 573-574: 267-272.*
- ⁵¹ Krčmová, L.: *Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení esterů retinolu v lidském séru s využitím monolitické kolony. Diplomová práce. Hradec Králové, FaF UK, 2006.*

-
- ⁵² Plíšek, J.: *Aplikace technologie nových stacionárních fází v HPLC analýze biologicky aktivních látek – stanovení vitamínu E*. Diplomová práce. Hradec Králové, FaF UK, 2008.
- ⁵³ Bliesner, D. M.: *Validating chromatographic methods: A practical guide*. New Jersey: Wiley-Interscience, A John Wiley&sons, Inc., Publication, 2006: S. 1-71. ISBN: 978-0-471-74147-3.
- ⁵⁴ *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM, 2001.