

**E-VITAMIN MÉRÉSRE ALKALMAS NAGYHATÉKONYSÁGÚ
FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS VALIDÁLÁSA**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY METHODS FOR VITAMIN E MEASUREMENTS**

**Nikolett Nánási¹, Edina Cseh¹, Márton Szentirmai¹, Gábor Veres^{1,2}, Péter Klivényi¹,
László Vécsei^{1,2}, Dénes Zádori¹**

¹*Department of Neurology, Faculty of Medicine, Albert Szent-Györgyi Clinical Center,
University of Szeged, Szeged, Hungary*

²*MTA-SZTE Neuroscience Research Group, Szeged, Hungary*
e-mail: nannik1026@gmail.com

Abstract

Tocopherols, also known as the ingredients of fat-soluble vitamin E compounds play an important role in antioxidant mechanisms. Their deficiency of tocopherols, mainly that of α -tocopherol, can cause several neurological disorders, such as ataxia, myopathy, retinopathy, peripheral neuropathy. The aim of this study was to validate and establish methods applicable for the detection of α -tocopherol from murine serum and certain brain regions.

In the present study we report 3 different reversed-phase HPLC methods using a single C18 column in isocratic system. The detection was carried out with 3 different detectors. For the detection of murine serum samples, a diode-array detector (DAD) was applied, whereas for murine brain samples electrochemical (ECD) and fluorescence detectors (FLD) were utilized and a detailed validation process was carried out.

The ranges of precision and recovery were the following during the validation processes: 0.61-3.57% and 66.19-105.91%, respectively.

The application of these methods provide a valuable tool for the determination of α -tocopherol from murine serum and brain samples.

Bevezetés

Az E-vitamin csoportjába tartozó 8 vegyület (α -, β -, γ - és δ -tokoferolok, valamint a tokotrienolok) kiemelkedő szereppel bír az oxidatív stressz ellen, közülük is leginkább az aktívabb és magasabb koncentrációban megtalálható α -tokoferol, mely különös tekintettel az alábbi területeken fejt ki jótékony hatását: keringési- és idegrendszer [1]. Számos neurológiai elváltozás kialakulásában, lefolyásában az antioxidáns rendszer sérült működése állhat. Többek között az ataxia izolált E-vitamin hiány (*ataxia with vitamin E deficiency, AVED*), mely esetén az α -tokoferol transzporter fehérje (*α -tocopherol transport protein, α -TTP*) nem expresszálódik a májsejtekben [2], így nincs, ami biztosítsa a szervezet számára a megfelelő antioxidáns védelmet.

Célunk egy olyan robosztus, reprodukálható metodika fejlesztése, validálása majd alkalmazása, amely gyors és megbízható α -tokoferol koncentráció méréseket eredményez, úgy az egér szérum, mint az agyi szövetekből is. Egészen az 1980-as évekre nyúlik vissza az ehhez hasonló kutatások gyökere [3], azóta több módszert is alkalmasnak találtak E-vitamin és metabolitjainak meghatározására, ám csak csekély számúban találni hiteles adatokat validálás hiányában [4-7]. Nem találtunk olyan közleményt, mely ilyen meghatározást több detektor és metodika összehasonlításával értékelné.

Kísérleti rész

Tanulmányunk során C57BL/6 egerek szérum és egyes agyi régióinak (striatum, cortex, hippocampus, cerebellum és agytörzs) α -tokoferol-szintjét határoztuk meg HPLC (Agilent 1100 és 1260 Series) segítségével. Az állatokból nyert mintákat metodikai módszereink segítségével előkészítettük. Az állatok ($n = 6$) elaltatását követően a bal kamrából vért nyertünk, melyhez meghatározott mennyiségben 50 mg/ml etilén-diamin-tetraecetsav-oldatot (EDTA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) adtunk, 4°C-on tárolás és 30 percnyi alvadás után 3500 fordulat/perc sebesség mellett 5 percig centrifugáltuk a vérmintákat 4°C-on (Hettich Mikro 220, Tuttlingen, Németország). A felülúszókat egy 2,2 ml-es Eppendorf csöbe gyűjtöttük össze, majd vortex segítségével 20 másodpercig homogenizáltuk. A homogenizált szérumból 200 μ l-nyi mennyiségeket azonnal stabilizáltunk 200 μ l 85 mM aszkorbinsav-oldattal (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) és 400 μ l 1,14 mM butil-hidroxi-toluol (BHT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) -etanol (VWR International, Radnar, PA, Amerikai Egyesült Államok) oldattal. Az így kapott ~ 800 μ l stabilizált és homogenizált szérum mintákat ezt követően -80°C-on tároltuk felhasználásig.

Jelen egerek vérmentes agyi régióit is felhasználtuk, melyeket perfuzionálás útján kaptunk, melyet perisztaltikus pumpa segítségével a bal kamrába mesterséges agyfolyadékot áramoltattunk 3 percig. Az agyszöveteket jégen választottuk szét, majd 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük a régiókat és felhasználásig -80°C-on tároltuk őket. A szövetek feldolgozása a következő lépésekből állt. A fagyott agyi régiókat külön-külön lemértük analitikai mérlegen, majd 1020 μ l homogenizáló oldat hozzáadása után UH100 homogenizátorral (amplitúdó 100%, ciklus: 0,5) agytömegtől függően 1-2 perc alatt szétroncsoltuk a mintákat. A homogenizált agyi mintákat 10 percig 4°C-on tároltuk, majd 12000 fordulat/perc sebesség mellett 10 percen keresztül ülepitettük őket 4°C-on. A további mintaelőkészítés megegyezett a szérumnál tárgyaltakkal.

Három detektálási módszert alkalmaztunk α -tokoferol meghatározásra. A vérből nyert szérumot DAD, az agyi régiókat ECD és FLD detektálás mellett mértük.

Mérés előtt felolvasztott, 4°C-os mintákhoz, mind szérum, mind agyi minta esetén 600 μ L 1,13 mM koncentrációban BHT-t és rac-tocolt (Matreya LLC., Pleasant Gap, PA, Amerikai Egyesült Államok) tartalmazó hexán (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) oldatot adtunk. Pontosan 1 percen keresztül kevertettük vortex segítségével az oldatokat. Ezután a hexános és etanolos fázist elválasztandó 12000 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltunk 4°C-on. A centrifugálást követően a felső, hexános fázisból 450 μ L-t bepároltunk N₂ gázzal hozzávetőlegesen 15 perc alatt. Ezután a visszamaradt komponenseket 28,57 V/V% etanol (VWR International, Radnar, PA, Amerikai Egyesült Államok), 28,57 V/V% 1,4-dioxán (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 42,86 V/V% acetonitril (ACN, VWR International, Radnar, PA, Amerikai Egyesült Államok) elegyben oldottuk és 10 másodpercig vortexszel homogenizáltuk, így injektálásra és elválasztásra kész állapotra hozva a mintákat.

Szérum minták elválasztásához Agilent 1260-as rendszeren Kinetex C18 (150x4,6 mm; 5 μ m, Phenomenex Inc., Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) oszlopot használtunk 25°C-os hőmérsékleten termosztálva. A kolonna védelme érdekében előtét kolonnát használtunk: Security Guard C18 (4x3 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok). A mobilfázis összetétele: 66,54 V/V% ACN (VWR International, Radnar, PA, Amerikai Egyesült Államok), 21,40 V/V% tetrahidrofurán (THF, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 6,61 V/V% metanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis,

MO, Amerikai Egyesült Államok), 2,72 V/V% ammónium-acetát (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) 1 vegyes százalékos oldata, 2,72 V/V% desztillált víz (injekcióhoz való víz). A mobilfázist minden mérés előtt frissen készítettük és az elkészítését követően kerámiaszűrőn 0,45 µm-es pórusméretű hidrofób PVDF membránszűrőn vízsugárszivattyú segítségével szűrtük. A mobilfázis áramlási sebessége 2,1 mL/perc volt. Minden mintából 50 µL térfogatot injektáltunk a mérések során.

Agyminták esetén Agilent 1100 rendszeren Luna C18(2) oszlopot (75x4,6 mm; 3 µm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) 25°C-os hőmérsékleten termosztálva. A kolonna védelme érdekében szintén előtét kolonnát használtunk: Security Guard C18 (4x3 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok). A mobilfázis összetétele ECD méréshez: 91,25 V/V% metanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 4,25 V/V% desztillált víz, 4,50 V/V% izopropil-alkohol (VWR International, Radnar, PA, Amerikai Egyesült Államok), 0,291 vegyes% nátrium-perklorát (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok). Hasonlóan, mint DAD méréseknél, a mobilfázist minden mérés előtt frissen készítettük és az elkészítését követően kerámiaszűrőn 0,45 µm-es pórusméretű hidrofób PVDF membránszűrőn vízsugárszivattyú segítségével szűrtük. A mobilfázis áramlási sebessége 1,2 mL/perc volt. Minden mintából 10 µL térfogatot injektáltunk a mérések során mintatermosztálás mellett (4°C). A mobilfázis összetétele FLD mérés esetén az alábbi volt: 100 V/V% metanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok). A mobilfázis áramlási sebessége 1,8 mL/perc volt. Minden mintából 10 µL térfogatot injektáltunk a mérések során mintatermosztálás mellett (4°C)

ECD esetén a beállított munkapotenciál (előzetes feszültség vs. áramerősség görbék felvételével) +700 mV volt, FLD esetén a gerjesztési hullámhossz 292 nm, a mérési hullámhossz pedig 330 nm volt [8]. DAD esetén az α-tokoferol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) 292 nm-en, míg a belső standardot (rac-tokol, Matreya LLC., Pleasant Gap, PA, Amerikai Egyesült Államok) 297 nm-en regisztráltuk. A metodikákat az ICH által megfogalmazott paraméterek szerint validáltuk, így meghatároztuk a metodikák pontosságát, érzékenységét, szelektivitását, linearitását és visszanyerhetőségét.

Eredmények

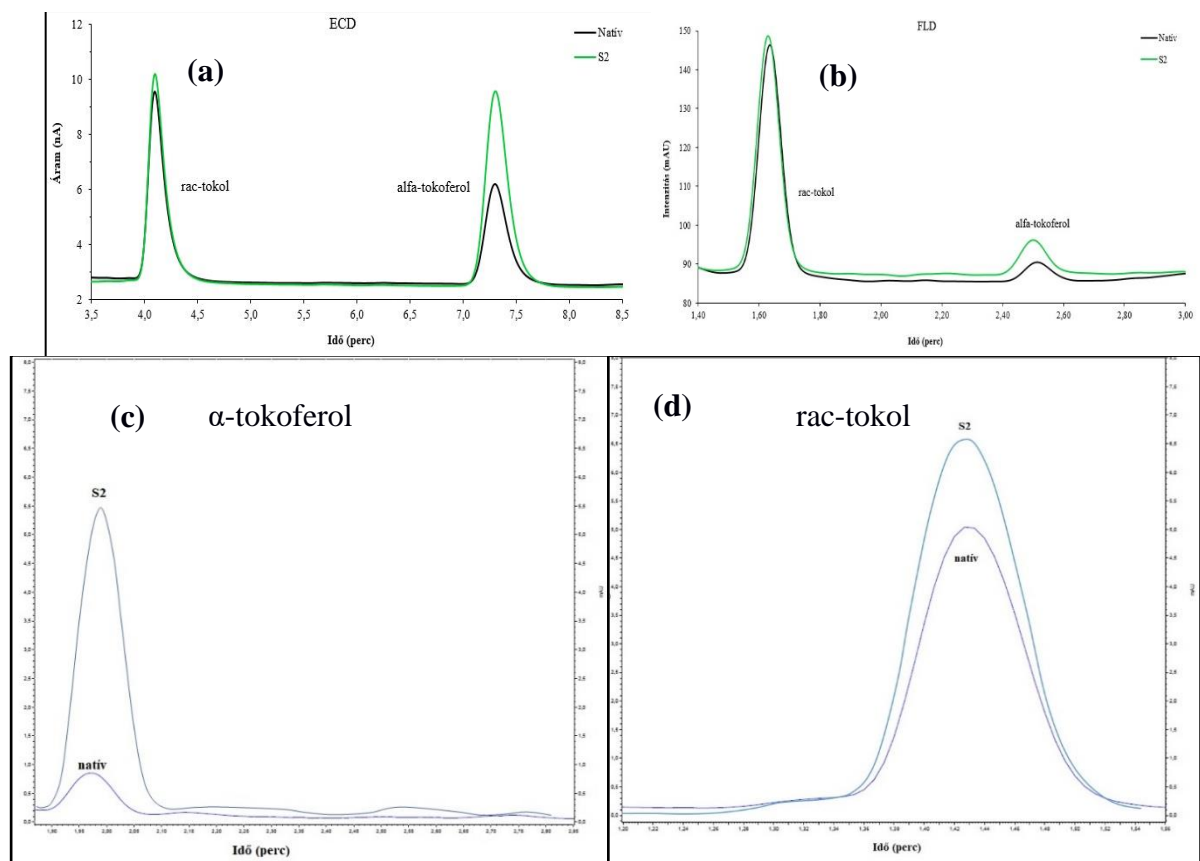
A validálás során a **1. Táblázatban** látható eredményeket kaptuk, ahol a variációs együtthatók (*coefficient of variance*, CV%) értékek láthatók, a mérési variancia és a mérés átlagának hányadosa százalékos értékben kifejezve. A visszamérési tényező (*recovery factor*, RF) kiszámítására 2 olyan oldatot készítünk, mely a natív mintához képest ismert koncentrációban hozzáadott analitot tartalmaz. A S1 oldat alacsony, míg az S2 oldat magasabb koncentrációban tartalmazza az analitokat. A mért koncentráció és az ismert koncentráció hányadosa a RF értékekkel szolgál, százalékban kifejezve. A linearitás megállapításához minden esetben 6 tagú kalibráló oldatsorozatot készítettünk. Az integrált csúcs alatti területeket a kalibráló oldat ismert koncentrációinak függvényében ábrázolva, és alkalmazva a legkisebb négyzetek módszerét, minden analitra igen jó linearitást mutattunk ki ($R^2 \geq 0.99$, kiértékelő szoftver: R Development Core Team, 2002). A metodikák szelektivitását az **1. ábra** mutatja be, ahol egy natív és egy S2 mintát mutatunk be. A meghatározási határ (*limit of quantification*, LOQ) azt a legkisebb koncentrációt jelenti, mely még megfelelő precizitással és helyességgel meghatározható, míg a kimutatási határ (*limit of detection*, LOD) az alapzaj háromszorosának megfelelő magasságú jelet adó koncentráció, illetve a következő képletekkel határoztuk meg (σ : a vakminta szórása, S' : érzékenység).

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma/S', \text{ illetve } \text{LOQ} = 10 \sigma/S'$$

1. egyenlet. LOD és LOQ számítására alkalmas képletek.

3. Táblázat. HPLC metodikák validálási eredményei.

Metodikák validálása	Komponens	α-tokoferol			rac-tokol		
	Metodika	DAD	ECD	FLD	DAD	ECD	FLD
Precizitás	Terület	0,73%	1,46%	3,57%	0,61%	1,82%	0,75%
	c (μM)	0,73%	1,49%	3,46%	0,62%	1,84%	0,75%
Visszanyerési tényező	RF 1	71,00%	103,64%	86,86%	-	-	-
	RF 2	66,19%	105,91%	103,96%	-	-	-
Érzékenység (S')		5230	0,1086	0,0631	5520	0,0247	0,094
Kimutatási határ (nM)		23	6	69	590	148	28
Meghatározási határ (nM)		69	17	207	1790	447	83



5. ábra. (a) ECD, (b) FLD detektorral regisztrált kromatogramjai ugyanazon agyi szövetek natív és S2 mintáiból, (c) és (d) DAD detektorral regisztrált egérszérum kromatogramjai.

Összefoglalás

Sikerült megfelelő mintaelőkészítést követően α -tokoferolt meghatározni egér szérumból és agyszövetből, sikeresen validáltuk a metodikáinkat, valamint meghatároztuk, hogy agyszövet esetén a kétféle detektálás (ECD és FLD) hasonlóan robusztus és precíz.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00034 és EFOP-3.6.1-16-2016-00008 pályázatokból valósult meg. Dr. Zádori Dénes a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja támogatja.

Irodalomjegyzék

- [1] Hacquebard M., Carpentier Y. A., *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2005; 8:133-138.
- [2] Eggermont E., *European Journal of Pediatrics*, 2006; 165:429-434.
- [3] R.G.Fariello, O. Ghilardi, A Pescgechera, *Neuropharmacology*, 1988, 10:1077-1080
- [4] M. Podda, C. Weber, M. G. Traber, L. Packer, *Journal of Lipid Research*, 1996, 37: 893-901.
- [5] G. T. Vatassery, H. T. Quach, W. E. Smith, *Biochimica et Biophysica Acta* 1782, 2008, 414-420.
- [6] S. Hagl, D. Berressem, R. Grewal, *Nutritional Neuroscience*, 2016, 19:1, 1-10.
- [7] K. Takahashi, S. Takisawa, K. Shimokado, *European Journal of Nutrition*, 2017, 56:1317-1327.
- [8] C. Yuan, M. Burgyan, D.R. Bunch, *Journal of Separation Science*, 2014, 2293-2299.