

OPTIMALIZÁCIA HPLC- COULOCHEMICKEJ METÓDY PRE STANOVENIE HOMOCYSTEÍNU A VYBRANÝCH METABOLITOV V PLAZME PO SUPLEMENTÁCII FUNKČNOU POTRAVINOU

CSILLA MIŠLANOVÁ^{a,b} a MILAN HUTTA^b

^a *Fakulta ošetrovateľstva a zdravotníckych odborných štúdií, Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová 12, 833 03 Bratislava,* ^b *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova ulica č. 6, 842 15 Bratislava 4*
mislanova@fns.uniba.sk

Došlo 15.1.16, prijaté 3.3.16.

Kľúčové slová: elektrochemická detekcia, funkčná potravina, homocysteín, HPLC, plazma

Úvod

Rastlinná ríša je bohatá na prírodné zdroje (ovocie, zelenina, cereálie, čaj atď.) bioaktívnych látok, ako sú polyfenoly (predovšetkým flavonoidy a katechíny), fytoestrogény, vitamín C, minerálne látky, vláknina, proteíny a ostatné látky ovplyvňujúce genetické, bunkové, biochemické a fyziologické funkcie v organizme. Zvýšený príjem ovocia, zeleniny a zeleného čaju znižuje rizikové faktory, ktoré zvyčajne prispievajú k vývoju ischemickej choroby srdca, rakoviny, cukrovky, aterosklerózy, zápalových a neurodegeneratívnych ochorení (Parkinsonova a Alzheimerova choroba atď.). Potenciálne prospešný vplyv vyššie zmienených látok je zvyčajne spájaný s ich antioxidantnými vlastnosťami. Antioxidanty sú účinné lapače reaktívnych kyslíkových radikálov a dezaktivujú nabité častice atómu kyslíka¹⁻³, pričom nerovnováha medzi antioxidantmi a reaktívnymi voľnými radikálmi spôsobuje oxidačný stres.

Zdrojom antioxidantov môžu byť aj flavonoidy. Mnohé štúdie naznačujú, že flavonoidy majú biologickú aktivitu. Hlavnou podskupinou flavonoidov sú flavonoly, z ktorých kvercetín (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavón) a kempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavón) patria medzi najznámejšie⁴. Flavonoidy spolu s antioxidantnými vitamínmi a enzýmami môžu prispieť k obrannej sústave ľudského organizmu.

Zvýšená koncentrácia homocysteínu (HCY) v organizme (hyperhomocysteinémia) spôsobuje tvorbu voľných radikálov a je spojená s rizikom vzniku kardiovaskulárnych ochorení⁵⁻⁷. Spôsoby odbúrania homocysteínu sú: remetyláciou za prítomnosti kofaktorov folátu

a kyanokobalamínu alebo trans-sulfuráciou na cysteín a jeho následné vylúčenie močom za účasti pyridoxínu.

V plazme je asi 80 % cirkulujúceho HCY viazaného na proteíny, predovšetkým na albumín. Ďalších 20 % je prítomných vo forme disulfidov a len nepatrné množstvo ostáva vo voľnej forme⁸⁻¹¹. Vzhľadom na dôležitý biologický význam HCY je veľký záujem o jeho detekciu v biologických vzorkách.

Väčšina metód pre stanovenie HCY sa delí na priame a nepriame. Priame metódy zahŕňajú predovšetkým enzymoimunoanalýzy a enzymatické metódy¹²⁻¹⁴. Nepriame metódy sú založené na separačných technikách vrátane vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), kapilárnej elektroforézy (CE)^{15,16} a plynovej chromatografie (GC)^{17,18}. V prehľadových článkoch^{19,20} autori hodnotia výhody a nevýhody rôznych analytických metód pre rutinnú analýzu homocysteínu a ostatných tiolov v plazme a v krvi, ako aj predúpravu vzoriek.

HPLC v spojení s rôznymi technikami detekcie, ako UV spektrofotometria^{21,22}, fluorescenčná detekcia²³⁻²⁸, hmotnostná spektrometria²⁹⁻³², elektrochemická detekcia³³⁻³⁸ a v poslednom období aj chemiluminiscenčná detekcia³⁹ patrí v súčasnosti k najpoužívanejším analytickým metódam pre stanovenie homocysteínu v biologickej vzorke (predovšetkým v plazme). Úprava vzoriek plazmy pred HPLC analýzou HCY zvyčajne spočíva v redukcii disulfidických väzieb medzi HCY a ďalšími aminotiolmi a plazmatickými proteínmi precipitáciou týchto proteínov^{19,33}.

HPLC s fluorescenčnou detekciou patrí k často používaným technikám detekcie pre stanovenie HCY a ďalších aminotiolov v biologických vzorkách pre jej dostatočnú citlivosť a spoľahlivosť systému. Detekčný princíp vyžaduje predkolónovú derivatizáciu alebo výber vhodného redukčného činidla. Medzi najpoužívanejšie derivatizačné činidlá patria: halogénsulfonylbenzofurazány (7-fluorobenzofurazán-4-sulfónová kyselina; SBD-F a 4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazán; ABD-F)³⁹⁻⁴¹ a *o*-ftalaldehyd (OPA)⁴²⁻⁴⁴. Bežnými redukčnými činidlami sú: 2-merkaptoetanol, borohydrid sodný a tri-*n*-butylfosfin.

Hoci sú dostupné rôzne HPLC metódy pre meranie koncentrácií HCY v plazme, neumožňujú simultánne stanovenie kompletného profilu aminotiolov. Vývoj coulometrickej detekcie poskytuje výhody v porovnaní s amperometrickej detekciou, a to minimalizáciu oxidácie elektródy a dlhšiu odolnosť voči zmenám. Hlavnou výhodou elektrochemickej detekcie je, že nie je potrebná derivatizácia tiolov pred samotnou detekciou.

Jedným z najbežnejších a najbohatších zdrojov flavonoidu-kvercetínu (hlavne vo forme glukozidov) je cibuľa. Vo väčšine štúdií autori aplikujú kombináciu potravy bohatej na flavonoidy (cibuľa, jablko, tofu, brokolica, sójové bôby, zeler, listy reďkovky, šošovica, fazuľa a pod.) a čaju, ako zdroja kvercetínu⁴⁵⁻⁴⁸. Konzumácia cibule (najemno nasekanej čerstvej cibule alebo vo forme polievky) nemusí byť komfortná pre každého. Preto sme navrhli cereálnu cibuľovú sušienku s prihliadnutím nielen na chuť, cenu, nutričné a zdravotné hodnoty, ale v neposlednom

rade aj na pohodlie pri jej konzumácii. V predloženej práci sme pripravili funkčnú potravinu obohatenú o bioaktívne látky (kvercetín, fruktány, beta-glukán atď), ktoré sa vyskytujú v prírodných zdrojoch bioaktívnych látok.

Cieľom práce bolo optimalizovať a validovať HPLC metódu s coulochemickou detekciou vhodnú pre stanovenie aminotiolov v klinických a epidemiologických štúdiách ako aj v štúdiách u populácie so špeciálnymi stravovacími návykmi, napr. vegetariáni, kde sa predpokladá vyššia expozícia homocysteínu.

Experimentálna časť

Chemikálie a materiály

Analytické štandardy: homocystein (HCY), cystein (CYS), redukovaný glutation (GSH), metionín (MET); monohydrát fosforečnanu draselného, 1-oktánsulfónová kyselina, perchlórová kyselina, EDTA, acetonitril HPLC čistoty a kyselina fosforečná (85%, p.a.) boli dodané firmou Sigma (St. Louis, MO, USA). Borohydrid sodný bol dodaný firmou Merck (Darmstadt, Nemecko). Interný štandard penicilinamín bol dodaný firmou Fluka (Milwaukee, WI, USA). Tlmivý roztok bol pripravený použitím ultračistej deionizovanej vody (vodivosť 18,2 M Ω cm⁻¹) zo systému Simplicity UV185 (Millipore, Bedford, USA).

Prístroje

Pre HPLC analýzy bol použitý chromatografický systém HP 1200 (Agilent, USA) s kvartérnou pumpou, automatickým dávkovačom, s termostatovaním kolón, DAD detektorom v sérii zapojeného s coulochemickým detektorom Coulochem II (ESA, USA) s ochrannou celou typu 5020 a vysoko citlivou analytickou celou typu 5011A. Pre zber a vyhodnotenie údajov bol použitý softvér HP 3D Chemstation (Agilent, USA).

Chromatografické podmienky

Stanovenie kvercetínu v cibuli (čerstvá, sušená), cereálnej sušienke a zelenom čaji

Na analýzu bola použitá analytická kolóna LiChrospher 100 RP18 (250 × 4,0 mm, I.D., 5 μ m, Merck, Darmstadt, Nemecko) s predkolónou LiChrospher® 60 RP-select B (4 × 4 mm, I.D., 5 μ m). Mobilná fáza pozostávala z acetonitrilu, 10 mmol l⁻¹ octanu amónneho s 0,3 mmol l⁻¹ EDTA, ľadovej kyseliny octovej (29:70:1, v/v/v, pH 3,8). Prietok mobilnej fázy bol 1,3 ml min⁻¹ a teplota kolóny 20 °C. Vlnová dĺžka pre detekciu bola 370 nm (cit.⁴⁹).

Stanovenie aminotiolových látok v plazme

Pre stanovenie zložiek aminotiolov v plazme sme vychádzali z publikácie Melnyka a spol.³³, pričom podmienky sme prispôbili meraným analytom. Na analytickú separáciu bola použitá reverzne-fázová analytická kolóna Purospher STAR C18 (250 × 4,6 mm, I.D., 5 μ m,

Merck, Darmstadt, Nemecko) s predkolónou Purospher® STAR RP-18e (4 × 4 mm, I.D., 5 μ m, Merck, Darmstadt, Nemecko). Mobilná fáza pozostávala z 50,0 mmol l⁻¹ dihydrogénfosforečnanu sodného, 1,0 mmol l⁻¹ ión-párového činidla *n*-oktánsulfónovej kyseliny (OSA), 6% acetonitrilu (v/v), pH bolo upravené na 2,6 s 85% (v/v) kyselinou fosforečnou. Pre elektrochemickú detekciu bol použitý coulochemický detektor (Coulochem II, ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA) s analytickou celou (model 5010A) a ochrannou celou (model 5020). Potenciály na coulochemickom detektore boli nasledovné: +1400 mV pre ochrannú celu, +650 mV a +900 mV pre kanály E1 a E2 analytickej cely.

Dizajn štúdie

Cereálna cibuľová sušienka bola pripravená rutinnou pekárskou technológiou (schválená a prijatá ako úžitkový vzor)⁵⁰. Pre jeho prípravu bola použitá celozrnná ovsená múka, pšeničná múka a sušená cibuľa, ako prírodné zdroje bioaktívnych látok. Bolo použitých 8,0 g sušenej cibule na 100,0 g cereálnej sušienky (obsah kvercetínu bol 7× vyšší ako u čerstvej cibule, t.j. 264 mg kg⁻¹ vs. 38 mg kg⁻¹).

Probandi konzumovali 6 kusov cereálnej sušienky (celková dávka 130 g) denne po dobu 2 mesiacov a pre zvýšenie príjmu kvercetínu pili zelený čaj (6,0 g na 0,5 l za deň). Denný príjem kvercetínu bol 34,3±3,7 mg z cibule a 15,0±2,4 mg zo zeleného čaju. Po období konzumácie sušienky nasledovalo 2 mesačné obdobie tzv. „wash-out“ s pokračovaním normálnych stravovacích návykov.

Ďalšie možné zdroje kvercetínu neboli kontrolované, ale predpokladali sa štandardné a normálne nutričné návyky u populácie, z ktorej boli probandi vybraní. U normálnej populácie je priemerný príjem kvercetínu odhadovaný na 4–12 mg na deň bez ohľadu na vek, pohlavie a stravovacie návyky⁴⁹.

Metódy

Extrakcia a hydrolýza kvercetínu

Pre extrakciu a hydrolýzu kvercetínu bol použitý postup podľa Hertoga a spol.⁵¹ s určitými modifikáciami. K 1 g vybranej matrice (sušená cibuľa, sušienka alebo zelený čaj) alebo k 3 g čerstvej cibule bol pridaný 70% etanol na celkový objem 15 ml v polypropylénovej skúmavke. Vzorka bola premiešaná a inkubovaná pri teplote 40 °C po dobu 60 min. Po centrifugácii 5 min bol postup opakovaný ešte dvakrát a výsledné objemy boli doplnené do 50 ml 70% etanolom. K alikvotnému objemu (8 ml) tohto extraktu bolo pridané 2 ml 6 mol l⁻¹ HCl (koncentrácia 1,2 mol l⁻¹) a roztok bol refluxovaný pri 90 °C po dobu 120 min. Extrakt bol ochladený a po zriedení deionizovanou vodou (1:1) bolo 50 μ l extraktu dávkované do HPLC systému.

Úprava vzoriek plazmy

Vzorky krvi boli zbierané od 36 zdravých dobrovoľníkov v domove dôchodcov do EDTA skúmaviek, usklad-

nené v ľade a dopravené do laboratória. Vzorky boli centrifugované pri 10 000 g pri 4 °C po dobu 10 min. Aliquoty plazmy boli uskladňované pri –80 °C až do analýzy. Pred analýzou boli vzorky rozpustené pri izbovej teplote, premiešané a centrifugované pri 14 000 g po dobu 5 min pre separáciu koagulovaných proteínov od matrice plazmy. Vzorky štandardov boli pripravené pridaním známeho množstva cysteínu, redukovaného glutatiónu, homocysteínu a metionínu k presnému objemu plazmy.

K 100 µl plazmy bol pridaný objem 50 µl interného štandardu (penicilamín, pripravený v 1,0 mmol l⁻¹ vodnom roztoku EDTA) a 40,0 µl roztoku borohydridu sodného (1,0 mol l⁻¹ v 0,1 mol l⁻¹ NaOH). Po jemnom premiešaní bol roztok inkubovaný pri 50 °C po dobu 30 min. Na precipitáciu proteínov v plazme bolo pridaných 100 µl 0,6 mol l⁻¹ kyseliny perchlórovej obsahujúcej EDTA (1,0 mmol l⁻¹), nasledovala centrifugácia pri 14 000 g po dobu 5 min. Supernatant bol nariadený v mobilnej fáze

v pomere 1:1 a 50 µl bolo dávkovaných do HPLC systému³⁴.

Validácia HPLC metódy

Vo všeobecnosti, validovaná analytická metóda znamená, že poskytuje spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky, pričom sú definované a overiteľné parametre a hlavné operačné podmienky. Hlavné parametre validácie sú uvedené v tab. I.

Linearita

Kalibračné čiary boli zostrojené v rozsahu 12,5–300,0 µmol l⁻¹ (12,5; 25,0; 50,0; 80,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0) pre CYS; 1,0–40,00 µmol l⁻¹ pre GSH a HCY (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 40,0) a 5,0–100,0 µmol l⁻¹ pre MET (5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 25,0; 30,0; 50,0; 80,0; 100,0). Jednotlivé body kalibračnej kriv-

Tabuľka I
Parametre validácie pre HPLC stanovenie aminotiolov

Parametre	CYS	GSH	HCY	MET
	12,5–200,0 µmol l ⁻¹	1,0–40,0 µmol l ⁻¹	1,0–40,0 µmol l ⁻¹	5,0–100,0 µmol l ⁻¹
Vnútrodnová presnosť ^a				
RE %	0,8–6,5	0,8–5,5	0,8–6,1	1,0–7,2
CV %	0,8–5,8	0,7–5,9	0,8–6,2	1,0–6,8
Medzidňová presnosť ^b				
RE%	1,0–7,1	1,0–6,6	1,2–7,4	1,4–8,2
CV%	0,9–6,9	0,9–1,1	1,2–7,9	1,3–7,9
Opakovateľnosť RE%				
– retenčného času ^c	0,1	0,1	0,1	0,3
– plochy píku ^d				
C1	4,6	2,5	2,8	3,1
C2	2,2	2,1	2,3	2,9
LOD [mmol l ⁻¹]	5,0	0,3	0,3	2,5
LOQ [mmol l ⁻¹]	16,4	1,2	1,3	8,1
Výťažnosť [%] ± RSD				
C1	97±3	98±3	98±3	99±3
C3	98±4	99±3	98±3	99±3
C4	99±4	99±3	99±4	99±3

^a Vnútrodnová presnosť a správnosť metódy boli stanovené opakovaným nástrekom ($n=4$) kalibračného štandardu v plazme; ^b medzidňová presnosť a správnosť boli stanovené analýzou kalibračných štandardov počas 4 dní v týždni; ^c relatívne chyby (RE) (vyjadrené ako odhad relatívnej štandardnej odchýlky) boli vypočítané pre 20 dávkovaní štandardu a blanku plazmy na úrovni koncentrácie C2, ^d hodnoty RE boli vypočítané pre 20 dávkovaní analytov vo vzorke „spikovanej“ plazmy pre dve rôzne úrovne koncentrácií C1, C2. C1 – Experimenty boli robené dávkovaním koncentrácií 12,5 µmol l⁻¹ CYS, 1,0 µmol l⁻¹ GSH, 5,0 µmol l⁻¹ HCY a 5,0 µmol l⁻¹ MET. C2 – pre dávkovanie 100,0 µmol l⁻¹ CYS, 20,0 µmol l⁻¹ GSH, 20,0 µmol l⁻¹ HCY a 50,0 µmol l⁻¹ MET. C3 – pre dávkovanie 50,0 µmol l⁻¹ CYS, 10,0 µmol l⁻¹ GSH, 10,0 µmol l⁻¹ HCY, 25,0 µmol l⁻¹ MET. C4- pre dávkovanie 200,0 µmol l⁻¹ CYS, 40,0 µmol l⁻¹ GSH, 40,0 µmol l⁻¹ HCY, 100,0 µmol l⁻¹ MET

ky boli zostrojené pridaním malého množstva analytov s postupným zvyšovaním koncentrácie do „spikovanej“ vzorky plazmy.

Parametre kalibračných čiar dosiahli nasledovné hodnoty: y (μA) = $142,2$ ($\mu\text{A mmol}^{-1}\text{l}$) x + $2\ 936,0$ (μA) pre CYS; y (μA) = $244,7$ ($\mu\text{A mmol}^{-1}\text{l}$) x + $274,1$ (μA) pre GSH; y (μA) = $178,2$ ($\mu\text{A mmol}^{-1}\text{l}$) x + $181,4$ (μA) pre HCY a y (μA) = $16,83$ ($\mu\text{A mmol}^{-1}\text{l}$) x – $8,7$ (μA) pre MET. Korelačné koeficienty boli vyššie ako 0,99 pre všetky analyty. Kalibračné krivky boli zostrojené pre analyty v oboch mobilných fázach rovnakého zloženia okrem kvality a obsahu organického modifikátora (obsah 6 % (v/v) acetonitrilu alebo 5 % (v/v) metanolu).

Presnosť a správnosť

Pre stanovenie vnútrodňovej presnosti a správnosti metódy boli vyhodnotené opakované analýzy ($n=4$) kalibračných štandardov v plazme. Medzidňová presnosť a správnosť bola stanovená analyzovaním kalibračných štandardov počas štyroch rôznych dní v týždni. Koeficienty variácie CV% (pre presnosť) a relatívne chyby RE% (pre správnosť) boli vyjadrené ako odhady štandardných a absolútnych odchýlok vypočítaných pre súbory s počtom vzoriek väčších než sedem. Hodnoty CV a RE nižšie ako 10 % pre všetky koncentrácie boli považované za akceptovateľné.

Opakovateľnosť plochy píku

Relatívne chyby (vypočítané ako odhad relatívnej štandardnej odchýlky) boli vypočítané z 20 dávkovaní analytov v „spikovanej“ vzorke plazmy pre dve koncentračné úrovne C1 ($12,5$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre CYS, $1,0$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre GSH, $5,0$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre HCY a $5,0$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre MET) a C2 ($100,0$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre CYS, $20,0$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre GSH a HCY a $50,0$ $\mu\text{mol l}^{-1}$ pre MET).

Opakovateľnosť retenčného času

Bola stanovená z 20 dávkovaní štandardu a blanku plazmy pre koncentráciu C2.

Stanovenie limitu detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ)

Limit kvantifikácie bol stanovený ako koncentrácia najnižšieho kalibračného štandardu (pri pomere odozvy plochy píku voči šumu nulovej línie $S/N=10$) pre relatívnu štandardnú odchýlku $RSD=10$ %.

Limit detekcie použitím 20 μl dávkovaného objemu plazmy bol vypočítaný z pomeru signál:šum ($S/N=3$) analytického signálu píku (plocha píku) k maximálnym zmenám požadovanej odozvy počas analýzy ($n=10$) vzorky blanku plazmy a signálu vzorky plazmy spikovanej so známou koncentráciou analytu.

Robustnosť metódy

Robustnosť metódy je jej schopnosť udržať sa nezmenená aj pri malých zmenách v chromatografických parametroch, ku ktorým by mohlo dochádzať počas aplikácie

metódy (ako napr. percentuálny obsah organického modifikátora a pH mobilnej fázy; koncentrácia tlmivého roztoku a dávkovaný objem). Príkladom kritéria robustnosti je, že účinky nasledovných zmien v chromatografických podmienkach môžu byť stanovené: obsah organického modifikátora v mobilnej fáze upravený o ± 2 % pôvodného obsahu; pH mobilnej fázy upravené o $0,1$ pH jednotiek skutočnej optimálnej hodnoty. Retenčný faktor a zmeny v selektivite zapríčinené vplyvom matrice boli merané po objemových prírastkoch 20 μl dávkovanej vzorky plazmy až k celkovému objemu 2000 μl (100 dávkovaní). Hodnoty CV a RE boli nižšie ako 5 %.

Výťažnosť analytov

Výťažnosť CYS, GSH, HCY a MET boli stanovené na troch úrovniach koncentrácií. Absolútne výťažnosti boli vypočítané ako percentuálny rozdiel medzi plochami píkov extrahovaných štandardov z plazmy a pôvodnými štandardmi (neextrahovanými) vo vode v príslušnom rozsahu koncentrácie.

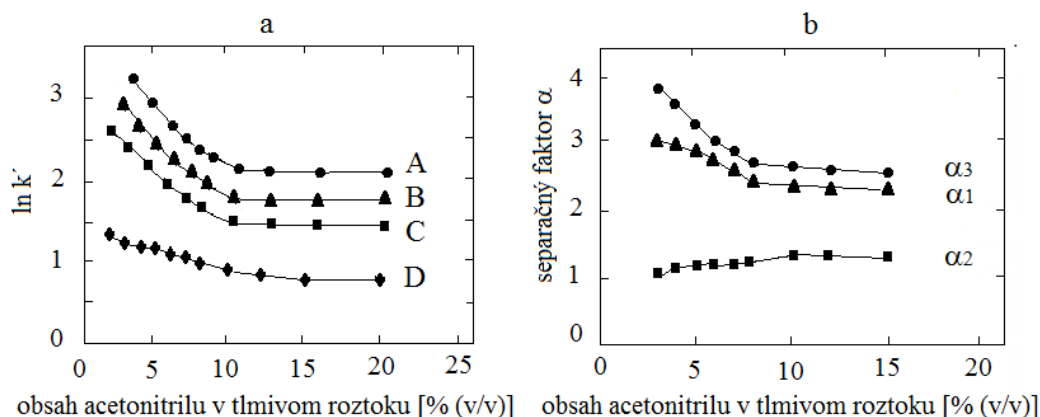
Výsledky a diskusia

Experimenty s analytickou kolónou Purospher STAR C18

Retencia v reverzne-fázovej chromatografii je ovplyvnená veľkým počtom premenných v systéme. Tieto premenné môžu byť rozdelené do troch skupín. Prvá skupina zahŕňa zmeny týkajúce sa stacionárnej fázy, napríklad materiál stacionárnej fázy, priemer a dĺžka kolóny. Druhá skupina zahŕňa zmeny fyzikálnych parametrov, ako sú zmeny teploty, tlaku a prietoku mobilnej fázy. Tretia skupina zahŕňa zmeny, ktoré definujú zloženie mobilnej fázy. V ión-párovej chromatografii je známe, že prídavok vhodného párového iónu minimalizuje chvostovanie píkov látok obsahujúcich amino skupinu (vrátane aminotiolov), pravdepodobne v dôsledku zníženia sekundárnych interakcií medzi kationmi zlúčenín a voľnými silanolovými skupinami na povrchu silikagélu.

Počas optimalizácie zloženia mobilnej fázy sme v našej štúdií vychádzali z publikácie Melnyka a spol.³³, kde pôvodné zloženie mobilnej fázy X bolo $50,0$ mmol l^{-1} dihydrogénfosforečnanu sodného, $1,0$ mmol l^{-1} OSA, 2 % (v/v) acetonitrilu, pH bolo upravené pomocou 85% kyseliny fosforečnej na hodnotu 2,7.

Počas výberu optimálnych podmienok pre stanovenie aminotiolov sme študovali závislosť retencie analytov od rôznych premenných zloženia mobilnej fázy. Táto skutočnosť je veľmi dôležitá pre chromatografickú analýzu, pretože významne ovplyvňuje retenciu a charakter analytického signálu. V tejto práci sme testovali dve reverzne-fázové analytické kolóny, Purospher STAR C18 ($250 \times 4,6$ mm, 5 μm , Merck, Darmstadt, Nemecko) a NBS C18 ($150 \times 4,6$ mm, 5 μm , MCM, Tokio, Japonsko) a systematicky študovali vybrané HPLC parametre



Obr. 1. a) Vplyv obsahu acetonitrilu na retenčný mechanizmus metionínu (A), homocysteínu (B), redukovaného glutatiónu (C) a cysteínu (D) v analytickej kolóne Purospher STAR C18. b) Závislosť separačného faktora α od % (v/v) acetonitrilu v mobilnej fáze. Separáčny faktor α_2 medzi redukovaným glutatiómom a homocysteínom; separáčny faktor α_1 medzi cysteínom a redukovaným glutatiómom; separáčny faktor α_3 medzi homocysteínom a metionínom;

Chromatografické podmienky: Analytická kolóna Purospher STAR C18, 250 × 4,6 mm I.D., 5 μ m. Predkolóna LiChrospher C18, 4 × 4 mm I.D., 5 μ m. Mobilná fáza X 50 mmol l⁻¹ dihydrogénfosforečnan sodný 1,0 mmol l⁻¹, 1-oktánsulfónová kyselina, pH 2,60 upravené s 85% kyselinou fosforečnou. Prietok 0,8 ml min⁻¹. Detekcia coulochemická, potenciály analytickej cely E1 = +650 mV, E2 = +900 mV, E ochrannej cely +1400 mV

(retenčný a separáčny faktor) vo vzťahu k rôznym organickým modifikátorm (acetonitril alebo metanol) a ich obsahu v mobilnej fáze.

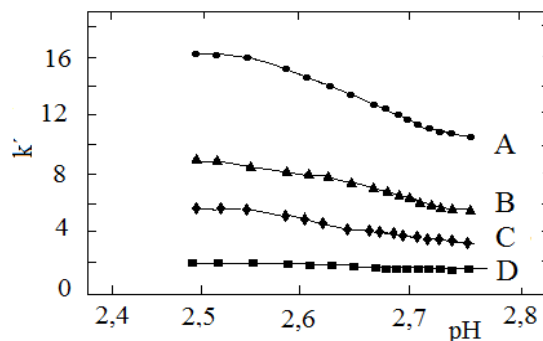
Obsah organického modifikátora bol zmenený v rozsahu 2–15 % pre acetonitril a 2–20 % pre metanol na separáciu nasledovných analytov: 200,0 μ mol l⁻¹ CYS, 5,0 μ mol l⁻¹ GSH, 5,0 μ mol l⁻¹ HCY a 25,0 μ mol l⁻¹ MET. Nebola dosiahnutá separácia HCY a GSH pri obsahu 2 % acetonitrilu, ani pri 2 % metanolu.

Ako vidieť na obr. 1a, zvýšenie percentuálneho obsahu acetonitrilu spôsobilo zníženie retenčného faktora k' (kratší čas analýzy), zlepšenie separácie a len mierny nárast separáčného faktora α (obr. 1b). Pre CYS a MET sa dosiahla hodnota separáčného faktora v rozmedzí 1,6 < α < 2,8. Vyšší podiel acetonitrilu nespôsobil degradáciu separácie ani v prípade obsahu 20 % (v/v). Zvýšenie percentuálneho obsahu acetonitrilu bolo najefektívnejšie pre posledný eluovaný analyt metionín, pretože jeho retenčný čas sa znížil z 30 min na 15 min.

Pri experimentoch s metanolom ako organickým modifikátorm sa predĺžil čas analýzy, preto bol pre ďalšie experimenty zvolený acetonitril. Najpriaznivejšia hodnota separáčného faktora (a je približne 1,25) bola dosiahnutá pri obsahu 5–8 % acetonitrilu. Percentuálny obsah acetonitrilu vyšší ako 8 % je vhodný pre separáciu HCY a GSH, ale nedostatočný pre odstránenie interferujúcich zložiek komplexnej matrice plazmy eluujúcich v blízkosti pík CYS a MET. Pre ďalšie experimenty bol zvolený optimálny obsah acetonitrilu 6 % (v/v).

Ďalším testovaným parametrom bol vplyv zmeny pH mobilnej fázy na retenciu a separáciu analytov. Najčastej-

šie používaným pH pre separáciu aminotiolov je 2,60 a 2,70 (cit.^{33,34}). Analytická kolóna bola testovaná v rozmedzí pH 2,50–2,75. Zníženie pH spôsobilo zvýšenie retenčného faktora a čas analýzy bol predĺžený, pričom boli pozorované len slabé zmeny v hodnotách separáčného faktora. V rozmedzí pH 2,50–2,60 a 2,70–2,75 boli pozorované len nepatrné zmeny retencie (10 %) pre všetky analyty (obr. 2). Po zvýšení pH z 2,60 na 2,70 bol pozorovaný najvýraznejší pokles retenčného faktora (25–30 %) pre HCY. Najmä zmena pH ($\pm 0,02$ jednotiek pH)



Obr. 2. Závislosť retenčného faktora k' od pH pre metionín (A), homocysteín (B), redukovaný glutatión (C) a cysteín (D) so 6% acetonitrilom v mobilnej fáze; chromatografické podmienky ako na obr. 1

v oblasti hodnoty 2,70 spôsobila významné zmeny v retencii analytov, a preto hodnota pH 2,60 bola vybraná ako najpriateľnejšia hodnota pre ďalšie experimenty.

Experimenty s analytickou kolónou NBS C18

V práci Melnyka a spol.³³ bola pre analýzu aminotiolových látok použitá reverzne-fázová kolóna NBS C18. Vybrali sme túto kolónu pre porovnanie s vyššie uvedenou testovanou analytickou kolónou. Proces testovania bol rovnaký ako pre kolónu Purospher STAR C18. Nebola dosiahnutá separácia HCY a GSH pri obsahu 2 % acetonitrilu a metanolu. Zvýšenie obsahu acetonitrilu spôsobilo zvýšenie separačného faktora, ale vzhľadom na rozmer kolóny (150 × 4,6 mm, ID) boli jednotlivé analýzy veľmi krátke a nedosiahla sa účinná separácia analytov od interferujúcich zložiek plazmy. Zmenou organického modifikátora na metanol sa dosiahla účinnejšia separácia analytov; zvýšenie pH spôsobilo skrátenie času analýzy a neboli pozorované významné zmeny v selektivite.

Vzhľadom na dosiahnuté výsledky s jednotlivými testovanými kolónami vyjadrené selektivitou a stabilitou, analytická kolóna Purospher STAR C18 bola zvolená pre analýzu HCY a jeho metabolitov. Optimálne zloženie mobilnej fázy pozostávalo z 50,0 mmol l⁻¹ dihydrogénfosforečnanu sodného, 1,0 mmol l⁻¹ kyseliny oktánsulfónovej, 6 % acetonitrilu, pH 2,60 bolo upravené 85% (v/v) kyselinou fosforečnou.

Aplikácia na reálne vzorky

Vzhľadom k tomu, že väčšina aminotiolov v plazme je kovalentne viazaná k ostatným tiolom vo forme disulfidov, redukcia tejto väzby v kyslom prostredí a uvoľnenie voľnej frakcie HCY pred detekciou patrí medzi najkritickejší krok v úprave vzorky. Najčastejšie používanými redukčnými činidlami sú borohydrid sodný a fosfín (ako ditiotretitol, merkaptoetanol, tri-*n*-butylfosfín, tris (2-karboxyetyl) fosfín). V našej štúdií sme použili borohydrid sodný pre redukciu disulfidických väzieb a kyselinu perchlórúvú pre precipitáciu proteínov.

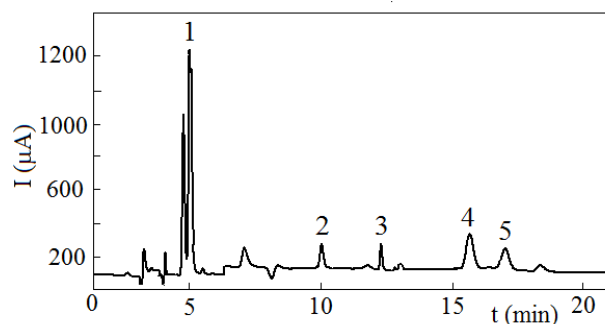
Validovaná HPLC metóda bola aplikovaná pre stanovenie HCY a jeho metabolitov v plazme v pilotnej štúdií

Tabuľka II

Koncentrácie aminotiolov v plazme pred suplementáciou, po 2 mesačnej suplementácii a po 2 mesačnom „wash-out“ u probandov

Koncentrácia [μmol l ⁻¹]	Pred konzumáciou (1)	Po dvojmesačnej konzumácii (2)	Po dvojmesačnej „wash-out“ (3)
Cystein	226,1±2,6	216,1±3,1*	219,2±2,8**
Redukovaný glutatión	4,8±1,2	5,2±1,2	4,9±1,3
Homocystein	14,2±0,8	11,4±0,6*	10,4±0,5*
Metionin	29,4±1,1	22,9±0,7*	22,5±0,8*

Výsledky boli vyjadrené ako priemer ±RSD; *(2), (3) vs. (1) * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$



Obr. 3. Reprezentatívny chromatogram stanovenia cysteínu (221,9 μmol l⁻¹) (1), redukovaného glutatiónu (6,0 μmol l⁻¹) (2), homocysteínu (8,9 μmol l⁻¹) (3) a metionínu (33,6 μmol l⁻¹) (5) vo vzorke reálnej plazmy po konzumácii sušienok. (4) interný štandard penicilamínu (170,0 μmol l⁻¹); chromatografické podmienky ako na obr. 1

pre pozorovanie vplyvu kvercetínu obsiahnutého v cibulovej sušienke na zmeny koncentrácie HCY v ľudskej plazme. Reprezentatívny chromatogram stanovenia aminotiolov v reálnej vzorke plazmy je na obr. 3.

Koncentrácie aminotiolov boli merané pred konzumáciou cibulovej sušienky, po dvojmesačnej konzumácii a po jednomesačnej prestávke po skončení štúdie (tzv. wash-out). Výsledky sú uvedené v tab. II. Bolo pozorované významné zníženie koncentrácie CYS, HCY ako aj MET ($P < 0,001$). Naopak, zvýšenie koncentrácie GSH po suplementácii nebolo štatisticky významné.

Záver

V prezentovanej štúdií bol skúmaný vzťah medzi koncentráciou HCY a ostatnými aminotiolmi v ľudskej plazme a suplementáciou kvercetínu v potravině obohatenej cibulou.

Popísaná HPLC metóda použitím coulochemickej detekcie umožňuje simultánne stanovenie koncentrácií jednotlivých analytov: homocysteínu, cysteínu, redukovaného glutatiónu a metionínu v plazme. Štúdium bolo za-

merané na testovanie vplyvu obsahu organického modifikátora (acetonitril, metanol) a pH na retenciu a separáciu analytov.

Acetonitril bol vybraný ako vhodný organický modifikátor (obj. 6 %) a optimálne pH bolo upravené na hodnotu 2,60. Navrhnutá metóda bola validovaná vzhľadom na linearitu, presnosť, správnosť a robustnosť metódy. Dosiahnuté výsledky poukazujú na to, že HPLC metóda s coulochemickou detekciou je stabilná a presná. Okrem toho je vhodná pre klinické štúdie, ako aj metóda využívaná v rámci epidemiologických štúdií alebo štúdií u populácie so špeciálnymi stravovacími návykmi, ako napr. vegetáriáni, kde je predpoklad vyššej expozície skúmanými analytmi.

Výsledky pilotnej štúdie poukazali na fakt, že konzumácia cibuľových sušenok (so zvýšeným obsahom kvercetínu) a pitie zeleného čaju počas 2 mesiacov spôsobila zníženie koncentrácie homocysteínu o 18 %. Nebola pozorovaná žiadna korelácia medzi kvercetínom a skúmanými parametrami. Preto nie je možné jednoznačne povedať, že zníženie koncentrácie homocysteínu bolo spôsobené len vplyvom kvercetínu. Problém vyžaduje komplexnejší náhľad na individuálne zistenia a budú objektom detailnejšieho výskumu.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu "Výskum zdravotných efektov rastlinnej potravy a možnosti redukcie zdravotných rizík", ITMS č. 26240220022, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Podakovanie patrí aj občianskemu združeniu Rozum a zdravie, o.z. za čiastočnú finančnú podporu.

LITERATÚRA

- Duthi G.G., Bellizzi M.C.: *Brit. Med. Bull.* 55, 568 (1999).
- Walle T.: *Free Radical Biol. Med.* 36, 829 (2004).
- Cao J., Zhang Y., Chen W., Zhao X.: *Br. J. Nutr.* 103, 249 (2010).
- Shi J., Pohorly J.E., Kakuda Y.: *J. Med. Food* 6, 291 (2003).
- Schalinske K. L., Smazal A. L.: *Adv. Nutr.* 3, 755 (2012).
- Wald D. S., Law M., Morris, J. K.: *Br. Med. J.* 325, 1202 (2002).
- Weis N., Hilg R., Hoffman U.: *Vasa* 33, 191 (2004).
- Gupta M., Sharma P., Garg G., Kaur K., Bedi G.K., Vij A.: *Clin. Chim. Acta* 352, 121 (2005).
- Narin F., Narin N., Halici C., Oner A. O., Dogan H., Karakucuk M.: *Ann. Saudi Med.* 24, 186 (2004).
- Bowron A., Scott J., Stansbie D.: *Ann. Clin. Biochem.* 42, 459 (2005).
- Genser D., Prachar H., Hauer R., Halbmayer W.-M., Mlczech J., Elmadfa I.: *Ann. Nutr. Metab.* 50, 413 (2006).
- Bissé E., Epting T., Kögel G., Obeid R., Gempel K., Huzly D., Fuhrmann K., Rolinski B., Herrmann W., Wieland H.: *Clin. Biochem.* 40, 739 (2007).
- Angelova E. A., Minkova G. D., Tsvetkova T. Z.: *Clin. Lab.* 52, 527 (2006).
- Matsuyama N., Yamaguchi M., Toyosato M., Takayama M., Mizuno K.: *Clin. Chem.* 47, 2155 (2001).
- Bayle C., Caussé E., Couderc F.: *Electrophoresis* 25, 1457 (2004).
- Ivanov A. V., Virus E. D., Luzyanin B. P., Kubatiev A. A.: *J. Chromatogr. B* 1004, 30 (2015).
- Valerio A., Baldo G., Tessari P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 561 (2005).
- Doncheva N., Penkov A., Velcheva A., Boev M., Popov B., Niagolov Y.: *Ann. Nutr. Metab.* 51, 82 (2007).
- Ducros V., Demuth K., Sauvant M.-P., Quillard M., Causse E., Candito M., Read M. H., Drai J., Garcia I., Gerhardt M.-F.: *J. Chromatogr. B* 781, 207 (2002).
- Isokawa M., Kanamori T., Funatsu T., Tsunoda M.: *J. Chromatogr. B* 964, 103 (2014).
- Głowacki R., Bald E.: *J. Chromatogr. B* 877, 400 (2009).
- Kuśmierk K., Chwatko G., Głowacki R., Bald E.: *J. Chromatogr. B* 877, 3300 (2009).
- Benkova B., Lozanov V., Ivanov I. P., Todorova A., Milanov I., Mitev V.: *J. Chromatogr. B* 870, 103 (2008).
- Guo X. F., Wang H., Guo Y. H., Zhang Z. X., Zhang H. S.: *J. Chromatogr. A* 1216, 3874 (2009).
- McMenamin M. E., Himmelfarb Nolin T. D.: *J. Chromatogr. B* 877, 3274 (2009).
- Ichinose S., Nakamura M., Maeda M., Ikeda R., Wada M., Nakazato M., Ohba Y., Takamura N., Maeda T., Aoyagi K., Nakashima K.: *Biomed. Chromatogr.* 23, 935 (2009).
- Cevasco G., Piątek A. M., Scapolla C., Thea S.: *J. Chromatogr. A* 1217, 2158 (2010).
- Ferina R., Pavã M. L., Baptista J.: *J. Chromatogr. B* 911, 15 (2012).
- Rafii M., Elango R., House J. D., Courtney-Martin G., Darling P., Fisher L., Pencharz P. B.: *J. Chromatogr. B* 877, 3282 (2009).
- Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y.: *Talanta* 77, 1279 (2009).
- Bártl J., Chrástina P., Krijt J., Hodík J., Pešková K., Kožich V.: *Clin. Chim. Acta* 437, 211 (2014).
- Gopu C. L., Hari P. R., George R., Harikrishnan S., Sreenivasan K.: *J. Chromatogr. B* 939, 32 (2013).
- Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I., Hine R. J., James S. J.: *J. Nutr. Biochem.* 10, 490 (2013).
- Houze P., Gamra S., Madelaine I., Bousquet B., Gourmel B.: *J. Clin. Lab. Anal.* 15, 144 (2001).
- Martin S. C., Tsakas-Ampatzis I., Barlett W. A., Jones A. F.: *Clin. Chem.* 45, 150 (1999).
- Khan M. I., Iqba Z.: *J. Chromatogr. B* 879, 2567 (2011).
- Zhang M., Pfeiffer C. M.: *Clin. Chim. Acta* 340, 195 (2004).

38. Petrlova J., Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: *J. Sep. Sci.* 29, 1166 (2006).
39. Huertas-Pérez J. F., Moreno-González D., AiradoRodríguez D., Lara F. J., García-Campaña A. M.: *TrAC* 75, 35 (2015).
40. Cevasco G., Mumot A. M., Scapolla C., Thea S.: *Clin. Chem.* 53, 2221 (2007).
41. Steele M. L., Ooi L., Münch G.: *Anal. Biochem.* 429, 45 (2012).
42. Mukai Y., Togawa T., Suzuki T., Ohata K., Tanabe S.: *J. Chromatogr. B* 767, 263 (2002).
43. Carducci C., Birarelli M., Nola M., Antonozzi I.: *J. Chromatogr. A* 846, 93 (1999).
44. Accini R., Bartesaghi S., De Leo G., Cursano C. F., Acilli G., Loaldi A., Cellerino C., Parodi O.: *J. Chromatogr. A* 896, 183 (2000).
45. Adebamowo C. A., Cho E., Sampson L., Katan M. B., Spiegelman D., Willett W. C., Holmes M. D.: *Int. J. Cancer* 114, 628 (2005).
46. Sesso H. D., Gaziano J. M., Liu S., Buring J. E.: *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1400 (2003).
47. Wang L., Lee I.-M., Zhang S. M., Blumberg J. B., Buring J. E., Sesso H. D.: *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 905 (2009).
48. Slimestad R., Fossen T., Vagen I. M.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 10067 (2007).
49. Ekström A. M., Serafini M., Nyren O., Wolk A., Busetto C., Bellocchio R.: *Ann. Oncol.* 22, 438 (2011).
50. Madaric A., Kadrabova J., Madaric J.: Úrad priemyselného vlastníctva Slovenskej Republiky, úžitkový vzor č.4137 „Cereálna potravina vysoko obohatená cibuľou a ďalšími rastlinnými polyfenolmi a vlákninami“, Vestník UPV SR č: 6/2005
51. Hertog M. G., Sweetnam P. M., Fehily A. M., Elwood P. C., Kromhout D.: *Agric. Food Chem.* 40, 1591 (1992).

C. Mišpanová and M. Hutta (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava*): **Optimization of HPLC-Coulochemical Method for Determination of Homocysteine and Selected Metabolites in Plasma after Supplementation with Functional Food**

The HPLC method with coulochemical detection, used for the determination of selected aminothiols compounds (homocysteine, cysteine, reduced glutathione, methionine) in human plasma after quercetin supplementation by consuming cereal onion biscuits, was optimized. The effects of changes of organic modifier (acetonitrile and methanol in phosphate buffer) in the mobile phase and the pH value of the mobile phase on the retention and separation factors were studied. According to the results obtained, mobile phase containing 6 % acetonitrile (v/v) in 50 mmol L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate solution at pH 2.6 was found to be the most suitable for the separation of selected compounds. The method was validated with respect to linearity, precision, and accuracy. Results showed that the method was sufficiently reliable, sensitive, and suitable for application to real plasma samples in clinical or epidemiological studies. Results of the pilot study pointed to the fact that the consumption of onion biscuits (with increased content of quercetin) and simultaneous drinking of green tea during two months caused decrease of homocysteine level by about 18 %. However, there were no simple correlations between quercetin and investigated parameters observed.