

Stanovenie α -tokoferolu (vitamín E) v sére kvapalinovou chromatografiou s trojitým kvadrupólom (LCMSMS)

RNDr. Jana Varhačová, RNDr. Renáta Šmilňáková

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Košice

Cieľom práce bolo vyvinúť metódu stanovenia α -tokoferolu (vitamín E) na kvapalinovom chromatografe s trojitým kvadrupólom. Východiskový objem vzorky použitý na analýzu bol 50 μ l séra. Ióny boli detegované v pozitívnom móde vysoko špecifickou a citlivou technikou – multiple reaction monitoring (MRM). Limit detekcie pre α -tokoferol bol 0,01 μ mol.l⁻¹.

Kľúčové slová: α -tokoferol (vitamín E), sérum, LC-MS-MS, LOD, LQD.

Determination of α -tocopherol (vitamin E) in serum of chromatography method with triple quadrupole

The aim of this work was to develop a liquid chromatography method with triple quadrupole detection for the determination of α -tocopherol (vitamin E). Initial volume of sample used for analysis was 50 μ l serum. Ions were detected in a positive mode by using multiple reaction monitoring (MRM). The detection limit of α -tocopherol was 0,01 μ mol.l⁻¹.

Key words: α -tokoferol (vitamin E), serum, LC-MS-MS, LOD, LQD.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 28–30

Úvod

Vitamíny rozpustné v tukoch sú látky potrebné na správne fungovanie organizmu. Spolu s proteínmi, tukmi a sacharidmi patria k základným zložkám našej potravy. Vitamíny z tejto skupiny pôsobia pri metabolických procesoch (katabolizmus, anabolizmus) ako katalyzátory. Vďaka ich rozpustnosti v tukoch majú spoločný absorpčný mechanizmus z GIT-u ako tuky. Ich nedostatok môže byť spôsobený zníženým príjmom potravy s obsahom tukov alebo poruchou vstrebávania (malabsorpcia) tukov.

Vitamín E tvoria analógy tokoferolu (α -, β -, γ -, δ -) a ich príslušné nenasýtené tokotrienoly. Vitamín E je silný antioxidant významne účinný v kombinácii s inými rastlinnými antioxidantmi. Je známe, že spomaľuje proces starnutia buniek, chráni tkanivo kože, očí, pečene. Monitorovanie statusu vitamínu E významne pomáha pri odhaľovaní nedostatočného príjmu vitamínov z potravy. Taktiež pri nedostatku α -tokoferol transportného proteínu, ktorý pomáha zabudovať α -tokoferol do lipoproteínových častíc (VLDL) v pečeni.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

Všetky chemikálie potrebné na prípravu mobilnej fázy a prípravu vzorky boli HPLC analytickej čistoty. Metanol, etanol a voda boli zakúpené z firmy Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko). Štandardný roztok α -tokoferolu (vitamín E), butylovaný hydroxytoluén (BHT) boli zakúpené z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), certifikovaný referenčný materiál pre vitamín α -tokoferol – CRM ClinChek® Control bol zakúpený z firmy Recipe (Nemecko).

Odber a príprava vzoriek

Vzorky pacientov boli po odbere centrifugované a sérum uskladnené pri teplote -20 °C až do ďalšieho spracovania. Vzorky boli spracované v polypropylénových skúmavkách (eppendorf), 50 μ l séra bolo precipitované pridaním 100 μ l etanolu (vychladený na 4 °C) obsahujúceho stabilizátor BHT (1 %). Takto pripravená vzorka bola 5 minút premiešavaná na trepačke a následne centrifugovaná (8 000 x g, 5 minút). Do HPLC bolo injektovaných 20 μ l supernatantu.

Chromatografická technika a doplnkový materiál

Merania boli realizované na kvapalinovom chromatografe HPLC Agilent 1260 série (Agilent Technologies, Singapur). Na detekciu bol použitý 6410 Agilent trojitý kvadrupól s elektrosprejom (ESI). Ióny boli detegované v pozitívnom móde vysoko špecifickou a citlivou technikou – multiple reaction monitoring (MRM). Retenčný čas, prekurzorový a produktový ión, rovnako ako iné parametre analytu, sú uvedené v tabuľke 1. Údaje na kvantitatívne stanovenie vitamínu boli vyhodnocované cez MassHunter Workstation Software (Agilent). Na chromatografickú analýzu bola použitá analytická kolóna Kinetex C18 100A 4,6 x 50 mm, 2,6 μ m (Phenomenex, CA, USA) a predkolóna Security Guard Cartridge C18 4,0 x 3,0 mm.

Tabuľka 1. Optimalizácia MS/MS krokov na kvantitatívne stanovenie vitamínu E

Analyt	t_r (min)	Prekurzorový ión MS1	Produktový ión MS2	CE (V)	Polarita
α -tokoferol	3,2	431	165	20	pozitívna

Vysvetlivky: t_r – retenčný čas, CE – kolízna energia

Tabuľka 2. Optimalizácia chromatografickej metódy stanovenia vitamínu E

Parametre	Rozsah testovania	Optimum
prietok	0,5 – 1,0 ml/min-1	0,8 ml/min-1
teplota kolóny	40 – 55 °C	48 °C
mobilná fáza	metanol, acetonitril, voda, etanol	metanol : voda (97 : 3,v/v)

Tabuľka 3. Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť stanovenia vitamínu E metódou LC-MS-MS

analyt	v sérii (n = 15) priemer ± SD μmol/l ⁻¹	CV %	medzi sériami (n = 6) priemer ± SD μmol/l ⁻¹	CV %
α-tokoferol	25,3 ± 0,21 57,1 ± 0,04	3,6 4,0	26,7 ± 0,61 50,2 ± 1,11	5,4 5,1

Výsledky a diskusia

Príprava a stabilita vzoriek

Štandardné roztoky boli stabilizované BHT (1g.l⁻¹) a skladované pri -20 °C. Vzorky pacientov po odbere boli centrifugované v chladenej centrifúge a po centrifugovaní zmrazené pri -20 °C. Stabilita vzoriek za takýchto podmienok bola 3 mesiace.

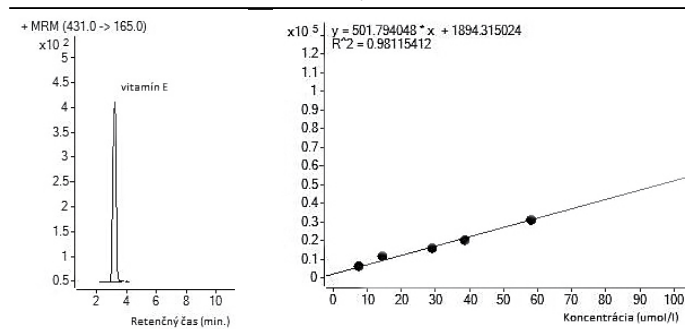
Chromatografická analýza

Pri separácii vitamínu E bola použitá analytická kolóna s reverznou fázou. Pri výbere kolóny, mobilnej fázy a iných parametrov sa postupovalo tak, aby sme v krátkom čase dosiahli čo najlepšiu separáciu analytu. V tabuľke 2 sú uvedené testované parametre a optimálne podmienky separácie vitamínu E. Koncentrácia vitamínu v sére bola vypočítaná z externej kalibračnej krivky. Zo zásobného roztoku 2,32 mmol.l⁻¹ α-tokoferolu v metanole bol pripravený pracovný roztok 232 μmol.l⁻¹. Z pracovného roztoku boli riedením s BHT (1g.l⁻¹) pripravené štandardné kalibračné roztoky α-tokoferolu v rozsahu (7,25; 14,5; 29,0; 38,6 a 58,0 μmol.l⁻¹) (obrázok 1). V tomto rozsahu kalibračných štandardných roztokov bola testovaná linearita metódy. Medza detekcie (LOD) bola stanovená ako koncentrácia analytu vo vzorke, ktorá v použitom detekčnom systéme vykazovala zvolenú hodnotu pomer signál/šum > 5. Hodnota medze detekcie pre α-tokoferol bola 0,01 μmol.l⁻¹. Medza stanovenia (LOQ) bola vypočítaná ako dvojnásobok LOD.

Pri validácii parametrov metódy (opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, výťažnosť) bol použitý referenčný materiál CRM ClinChek® Control od Recipe (Nemecko). Opakovateľnosť bola stanovená pätnásťnásobným opakovaným stanovením kontrolného séra pri dvoch hladinách v jeden deň. Z tabuľky 3 vyplýva, že opakovateľnosť pre α-tokoferol vyjadrená variačným koeficientom (CV) neprekročila 5,0 %. Reprodukovateľnosť bola stanovená opakovaným stanovením kontrolného séra pri dvoch hladinách počas šiestich dní. Získané hodnoty variačného koeficientu boli 5,4 % a 5,1 %.

Výťažnosť (správnosť) metódy bola overená tak, že k referenčnému materiálu (CRM ClinChek® Control 1 a 3) boli pridávané štandardy so známou koncentráciou α-tokoferolu (0,68; 1,29 μmol.l⁻¹). Výťažnosť bola následne vypočítaná podľa vzťahu:

$$\text{Výťažnosť} = \frac{[c] \text{ nameraná} - [c] \text{ CRM ClinChek® Control}}{[c] \text{ pridaného štandardu}} \times 100 \%$$

Obrázok 1. Externá kalibračná krivka pre α-tokoferol

Výťažnosť α-tokoferolu pri nízkej koncentračnej hladine bola 95 %, pri vyššej koncentračnej hladine 99 %. Metóda bola otestovaná na skupine pacientov (n = 30) náhodne vybraných z denného súboru analyzovaných vzoriek. Vekové rozpätie vybraných pacientov bolo 43 – 69 rokov, z toho 40 % žien. Stanovené koncentrácie vitamínu E boli v rozsahu deklarovaných referenčných hodnôt 11,6 – 34,8 μmol.l⁻¹.

Záver

Vyvinutá metóda stanovenia vitamínu E v sére je založená na princípe LCMSMS. Metóda spĺňa požadované validačné charakteristiky, je spoľahlivá, citlivá a špecifická. Vzhľadom na uvedené skutočnosti je možné metódu zaviesť v klinických laboratóriách ako alternatívu stanovenia vitamínu E v rutinej diagnostike.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta carotene and other carotenoids as antioxidant. *Am J Clin Nutr.* 1995;(62):1315S–21S.
2. Rino Y, Suzuki Y, Kuroiwa Y, et al. Vitamin E malabsorption and neurological consequences after gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(78):1858–61.
3. Pekmezci D. Vitamin E and immunity. *Vitam Horm.* 2011;(86):179–215.
4. Chatzimichalakis PF, Damanidou VF, Papadopyannis IN. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid –phase extraction. *Journal of Chromatography B.* 2004;(805): 289–296.
5. Andreoli R, Manini P, Poli D, et al. Development of simplified method for the simultaneous determination of retinol, α-tocopherol, and β-carotene in serum by liquid chromatography-Tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal Bioanal Chem.* 2004;(378):98–994.
6. Ding JS, Schoenmakers I, Jones K, et al. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010;(398):779–789.
7. Moreno P, Salvadó V. Determination of eight water – and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2000;(870):207–215.
8. Abahusain MA, Wright J, Dickerson JWT, et al. Determination of Retinol, α-Tocopherol, and β-Carotene by direct Extraction of Human Serum Using High Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography.* 1998;(12):89–93.
9. Capote FP, Jimnez JR, Granados JM, Castro ML. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007;(21):1745–1754.

10. Midttun Ø, Ueland PM. Determination of vitamins A, D, E in a small volume of human plasma by high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011;(25):1942–1948.
11. Grimmelt DH, Zheng Q, et al. *Comprehensive MRM Analysis of Fat Soluble Vitamins including 25 (OH) – Vitamin D3: Sensitivity and Selectivity by ESI LC/MS/MS*. Ionics mass Spectrometry Group Inc.
12. David A, Armbruster TP. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008;(29):S49–52.
13. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. Geneva: ICH-Q2B; 1996.
14. Siong TE, Choo KS. Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol by high pressure liquid chromatography in micro-volumes of serum. *Mal J Nutr.* 1999;(5):21–30.
15. Talwar D, Ha TKK, Cooney J, et al. Routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol, and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clinica Chimica Acta.* 1998;(270):85–100.
16. Li J, Wang Y. *Fat-Soluble Vitamins Analysis on an Agilent ZORBAX Eclipse PAH Polymeric C18 Bonded Column*. Application Note from Agilent Technologies (Shanghai) Co. Ltd.
17. Szczesniowski A. *Rapid Analysis of Vitamin D in Serum Using Triple Quadrupole LC/MS*, Application Note from Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara), CA USA.
18. Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Shah Y, Ahmad L, Watson DG. An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-retinol (vitamin A) and alpha-tocopherol (vitamin E) in human serum, Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. *J. Chromatogr. B.* 2010;878:2339–2347.



RNDr. Jana Varhačová

Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
jana.varhacova@medirex.sk