

# Stanovení alantoinu, ukazatele oxidačního stresu, pomocí LC/MS

VITATOX 2020

Michal Kopčil  
Univerzita Pardubice

# Antioxidační ochrana lidského těla

## Reaktivní formy kyslíku ROS

- Volné radikály –  $\cdot\text{OH}$ ;  $\text{ROO}\cdot$ ;  $\text{O}_2^{\cdot-}$
- Neradikálové formy -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $\text{HClO}$

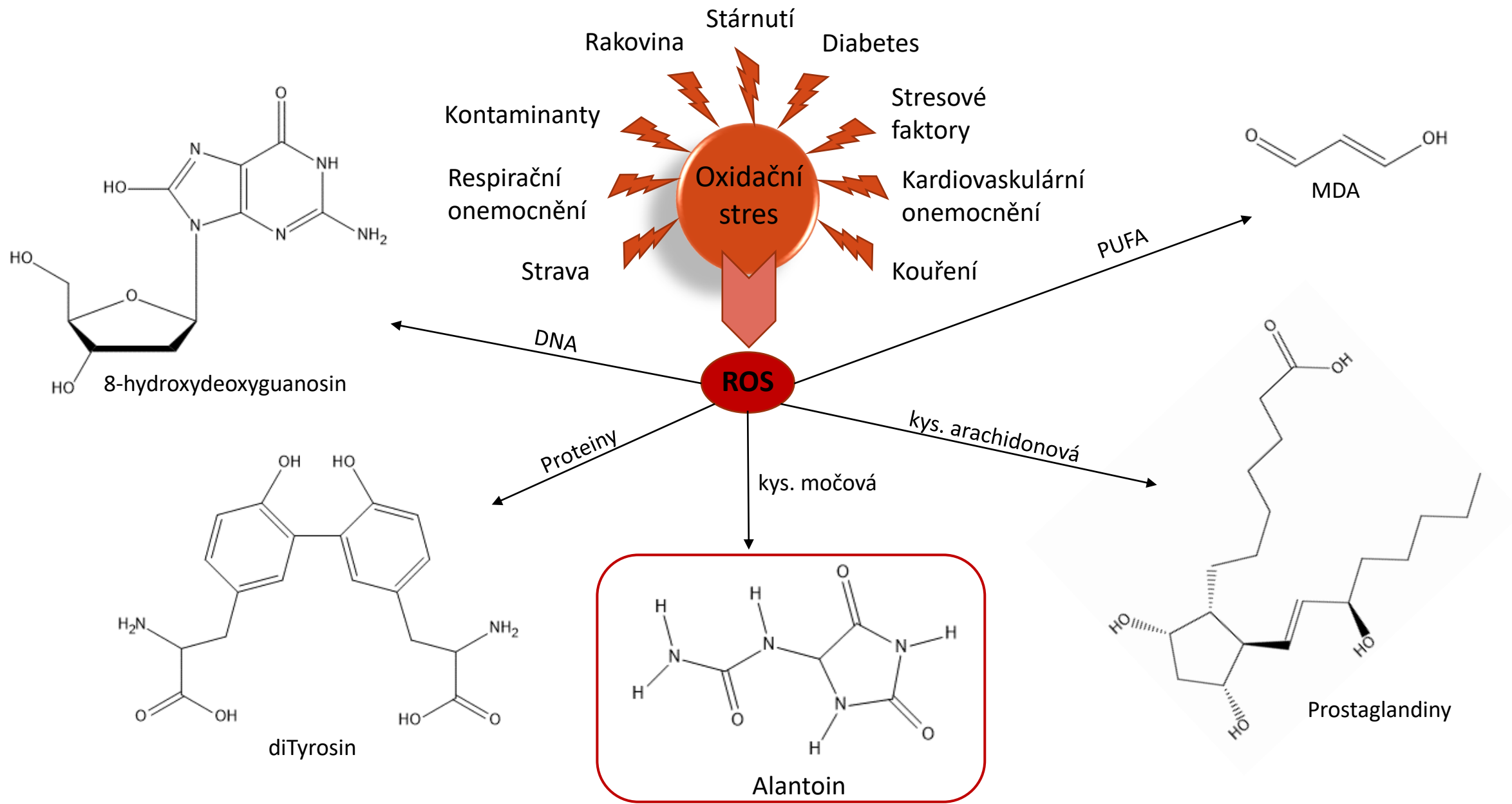
Prospěšnost

X

Škodlivost

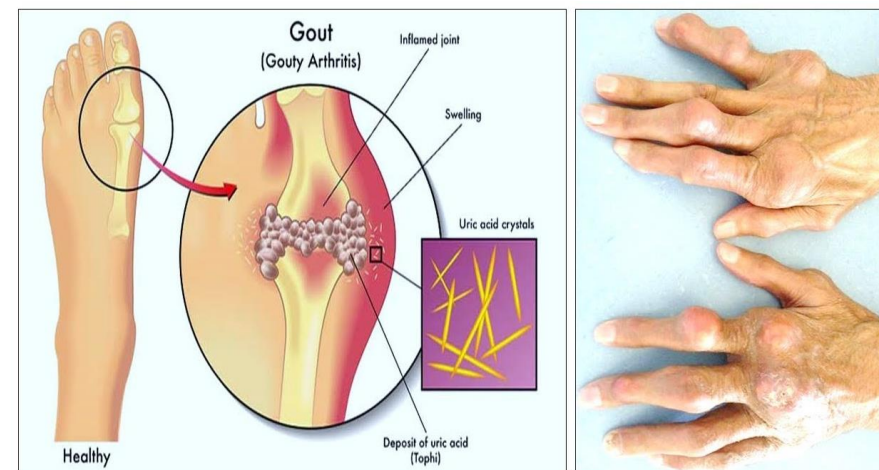
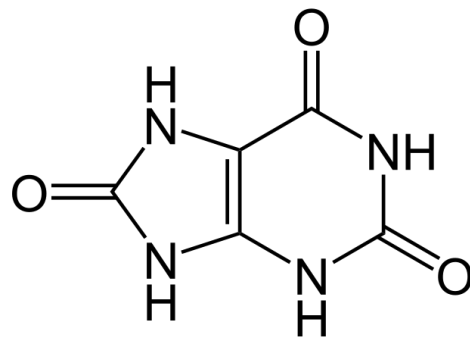
## Antioxidační ochrana

- Enzymy:
  - Superoxiddismutáza
  - Glutathionperoxidáza
  - Kataláza
- Endogenní antioxidanty:
  - Vysokomolekulární:  
transferin, feritin, haptoglobin
  - Nízkomolekulární:  
**kyselina močová**, askorbát,  
koenzym Q, tokoferol, bilirubin



## Kyselina močová

- Referenční hodnoty:
  - Muži 200 – 420  $\mu\text{mol/L}$
  - Ženy 140 – 360  $\mu\text{mol/L}$
- Konečný produkt metabolismu purinů u lidí
- Hlavní antioxidant plazmy
- Chronická hyperurikémie
  - dna, hypertenze, onemocnění ledvin



## Alantoin

- Referenční hodnoty: do 2  $\mu\text{mol/L}$
- Produkt oxidace kys. močové a konečný produkt metabolismu purinů
- Marker oxidačního stresu
- Terapeutické účinky
  - Zklidnění kožního podráždění
  - Stimulace růstu zdravé tkáně
  - Produkty na regeneraci pokožky



# Stanovení alantoinu

## Původní metoda

- Velký objem vzorku (300  $\mu$ L)
- Složitá příprava vzorku
  - Precipitace
  - SPE extrakce
  - Převedení na alantoát
  - Derivatizace DNPH
- LC
  - Gradientová eluce (C18) 45 min
  - UV detekce
- Pouze alantoin

## Nová metoda

- Menší objem vzorku a jednodušší odběr
- Jednodušší příprava vzorku
- Rychlejší metoda
- Simultánní stanovení kyseliny močové a alantoinu



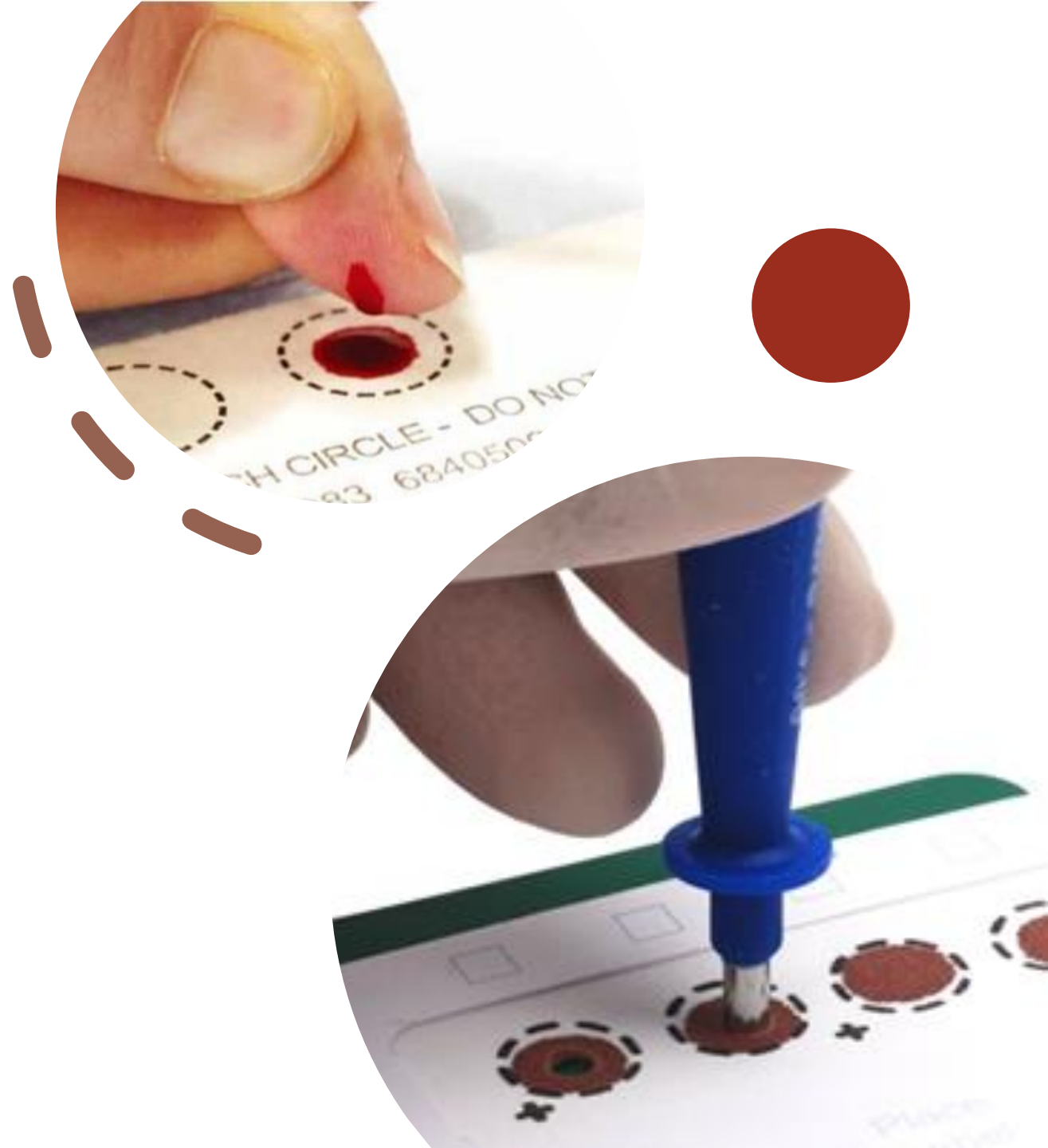
# Stanovení kyseliny močové

- Rutinní stanovení v biochem. laboratořích
  - urikázová metoda
  - sérum před plazmou – EDTA, citrát, oxalát inhibují urikázu
  - interference redukujících látek: glukosa, bilirubin, kys. askorbová
- Správnější a citlivější metody
  - LC s UV nebo MS detekcí
  - GC-MS s isotopovým zředováním



# Technika suché kapky

- 10 až 30  $\mu\text{L}$  biologického materiálu (plná krev, plasma, sérum, moč, sliny, mateřské mléko)
- Aplikátorem nebo přímo do předdefinovaných kruhů
- Schnutí alespoň 3 hodiny
- Vyražení terčíku  
(6 mm v průměru  $\sim$  10  $\mu\text{L}$  krve)



# Suchá kapka krve

## Výhody

- Rychlý a neinvazivní odběr vzorku
- Zjednodušený odběr vzorku, transport a uskladnění
- Homogenní matrice
- Zvýšení stability
- Možnost automatizace

## Nevýhody

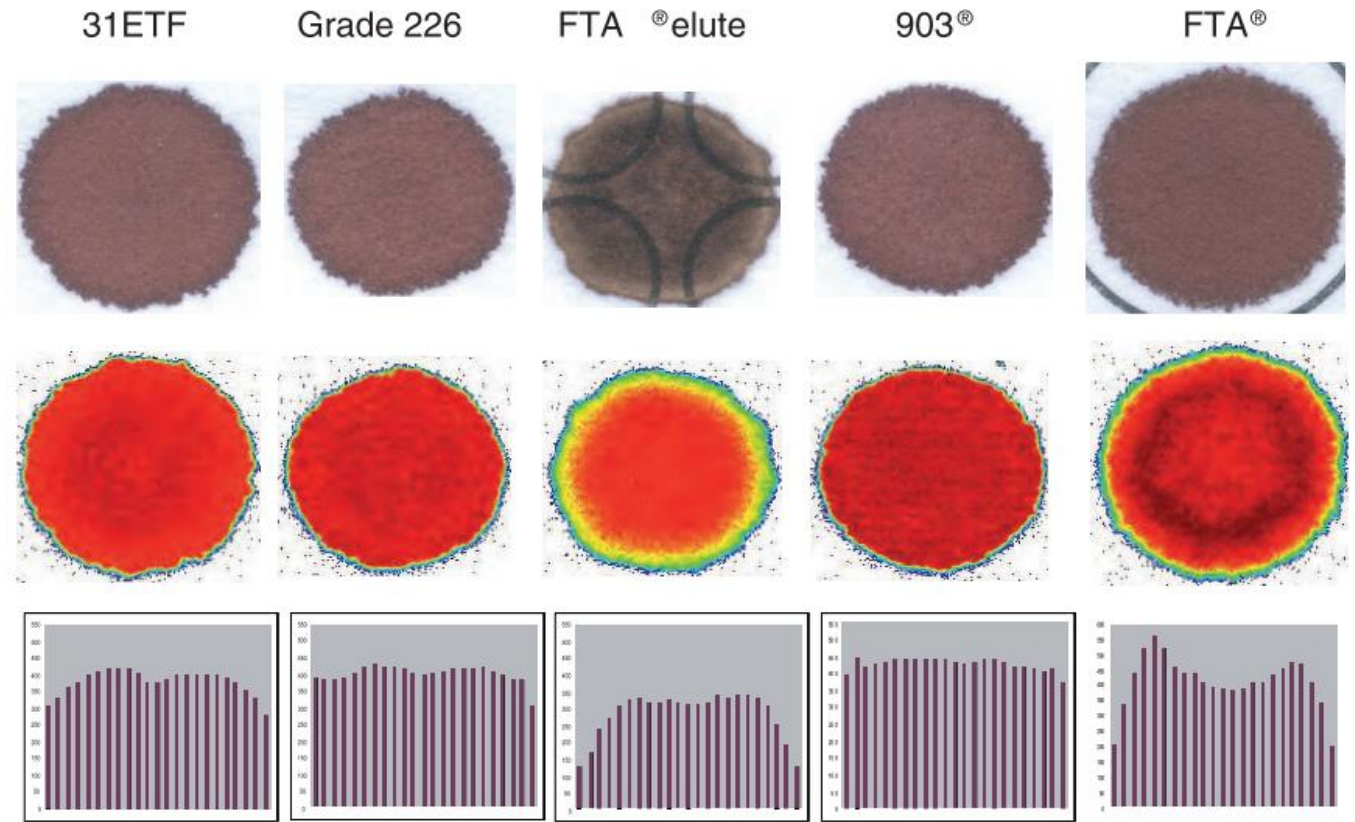
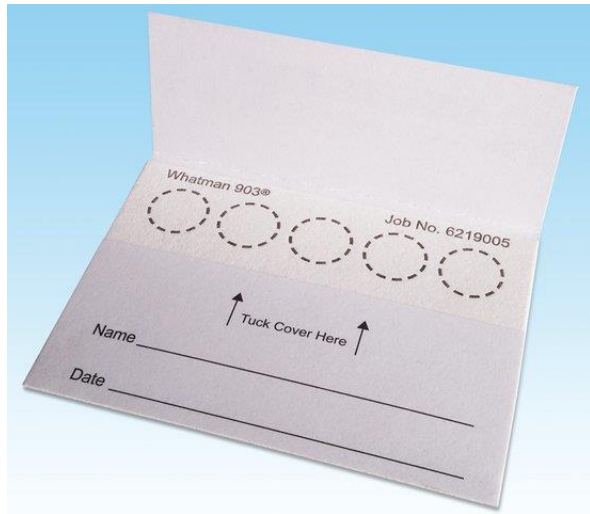
- Nízká koncentrace analytu
- Velmi malý objem vzorku
- Limitovaný počet opakování analýzy





## Whatman 903

- Plná krev
- Novorozenecký screening



Ren X. Bioanalysis. 2010, 2: 1469-1475.

## Whatman FTA

- Plná krev nebo homogenát
- Nukleové kyseliny
  - Lýze buňky, denaturace proteinů, ochrana nukleových kyselin před oxidací a UV zářením





# Problémy

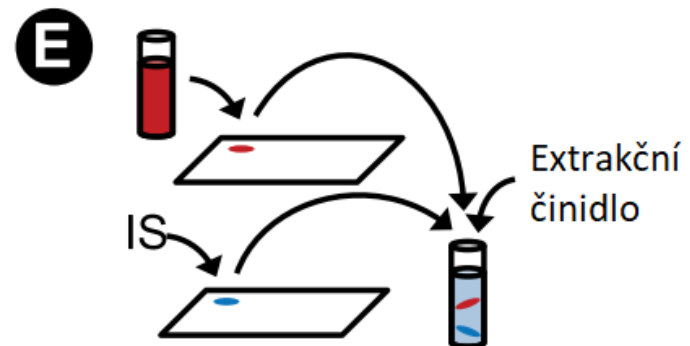
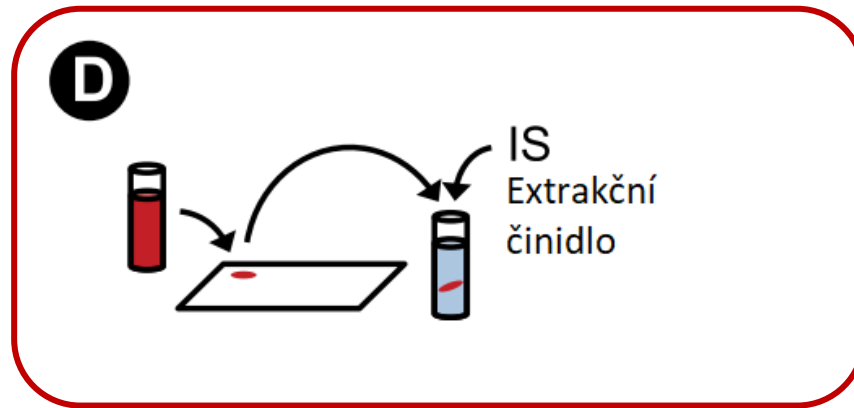
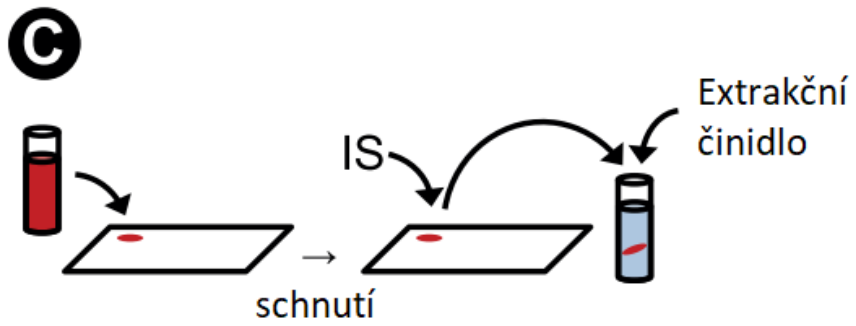
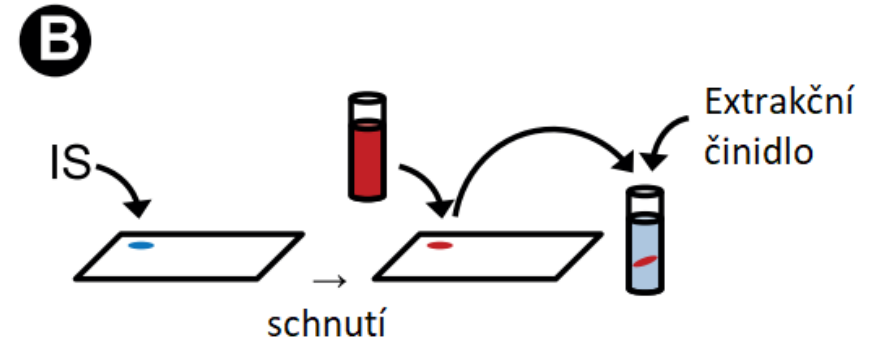
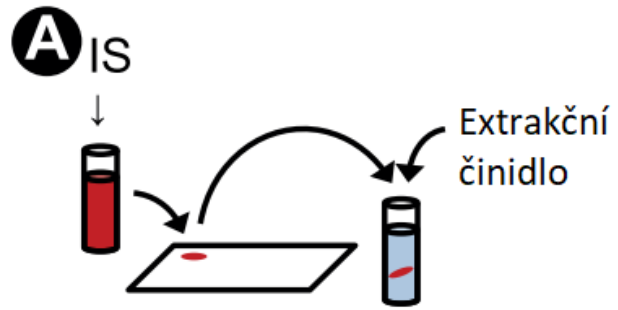
Malý objem vzorku

Malá rozpustnost KM

Polarita analytů

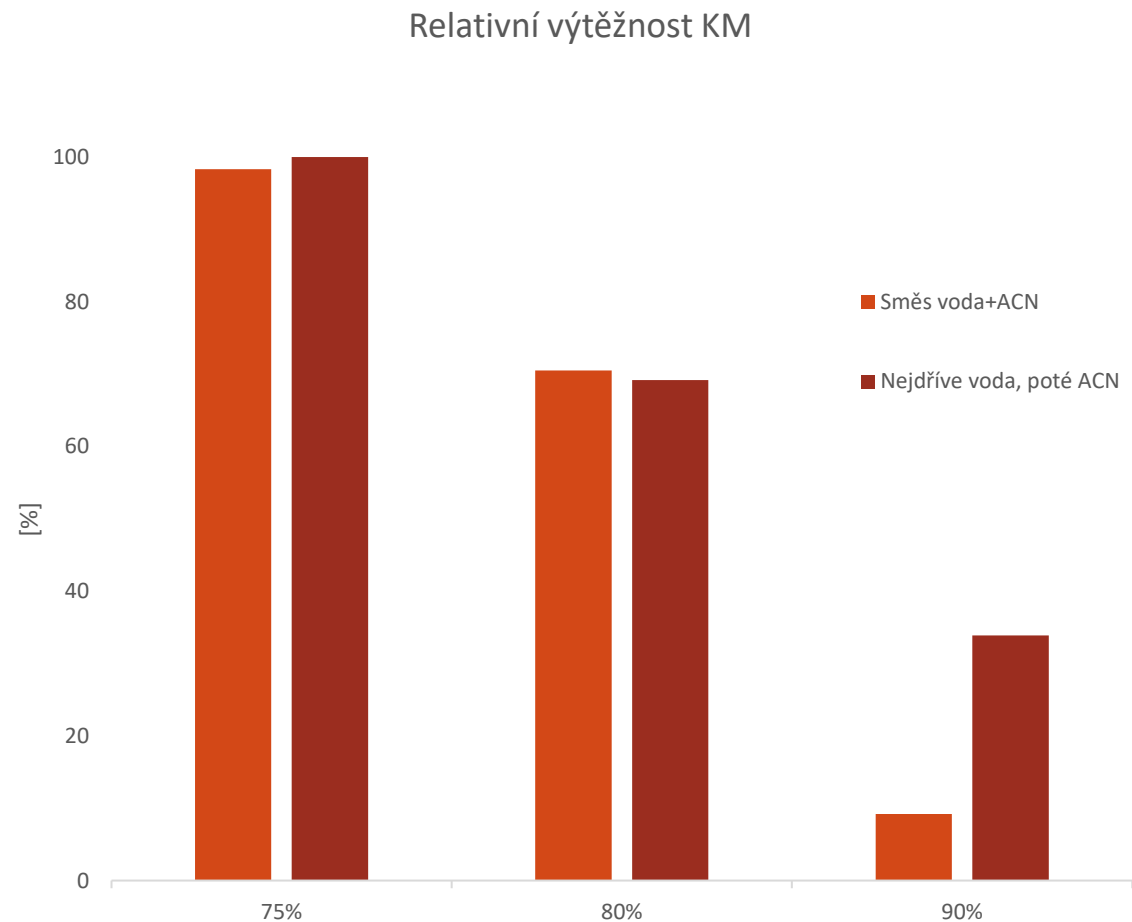
ISTD

Extrakce



# Příprava vzorku

- Vyražení terčíku + ISTD
- Extrakce
  - směs vody a ACN
- Ultrazvuk
- LC-MS



## Kapalinová chromatografie

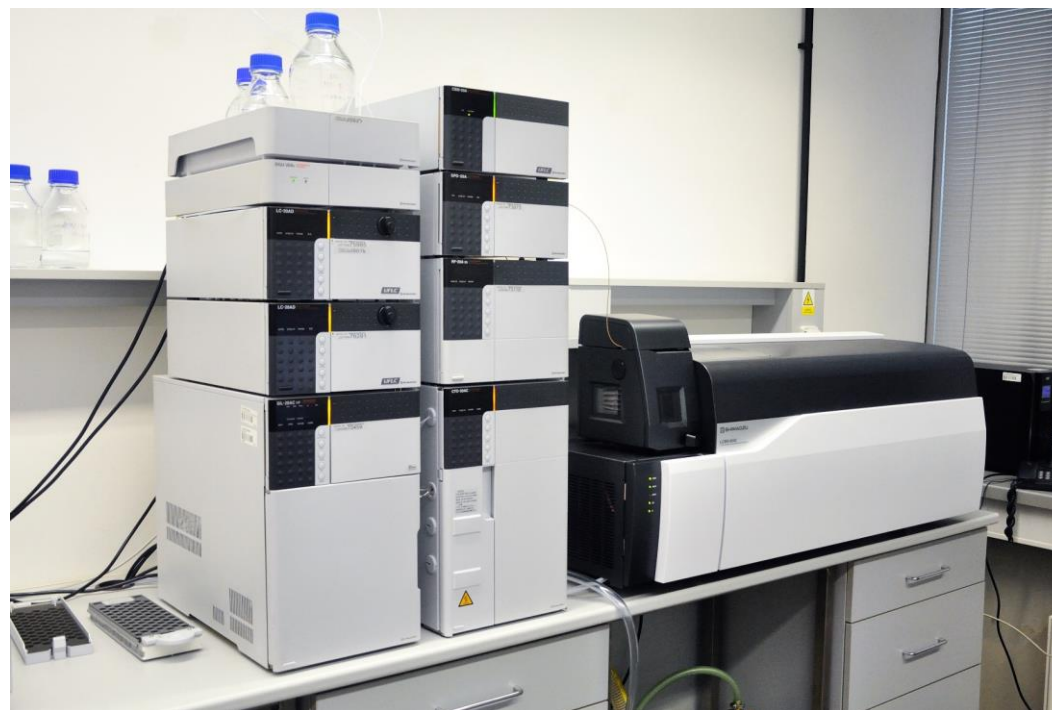
### LC-20 (Shimadzu)

- Kolona: Discovery HS-F5 (Supelco)  
3  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm, 37°C
- Isokratická eluce:  
10% ACN ve vodě + 0,1% FA
- Průtok: 0,2 ml/min
- Délka analýzy: 3 min

## Hmotnostní spektrometrie

### LCMS 8045 (Shimadzu)

- Negativní mód
- ESI (-3000V, 300°C)

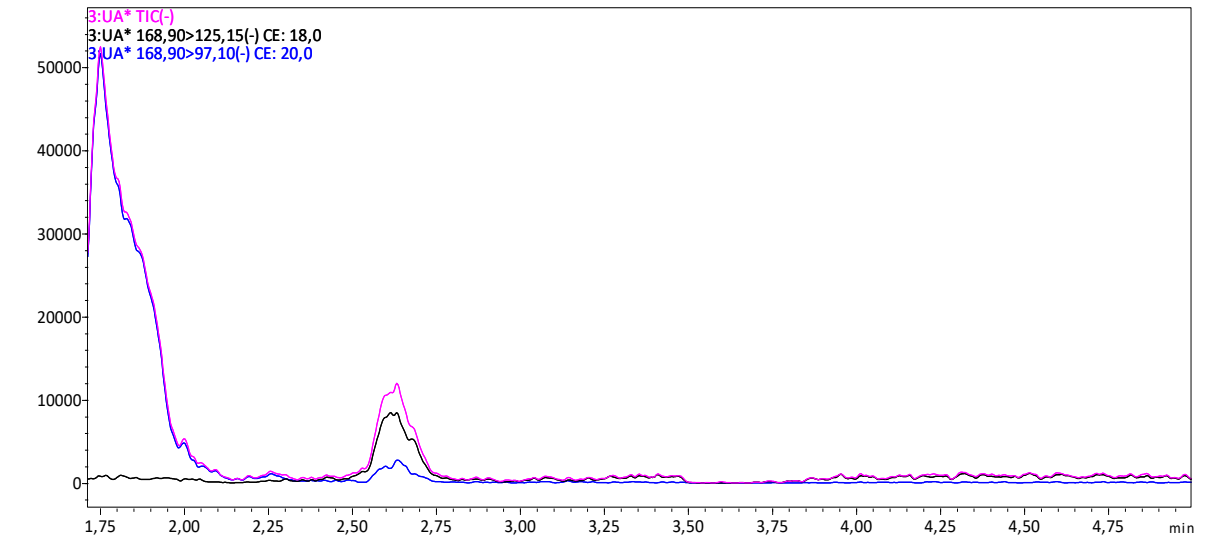
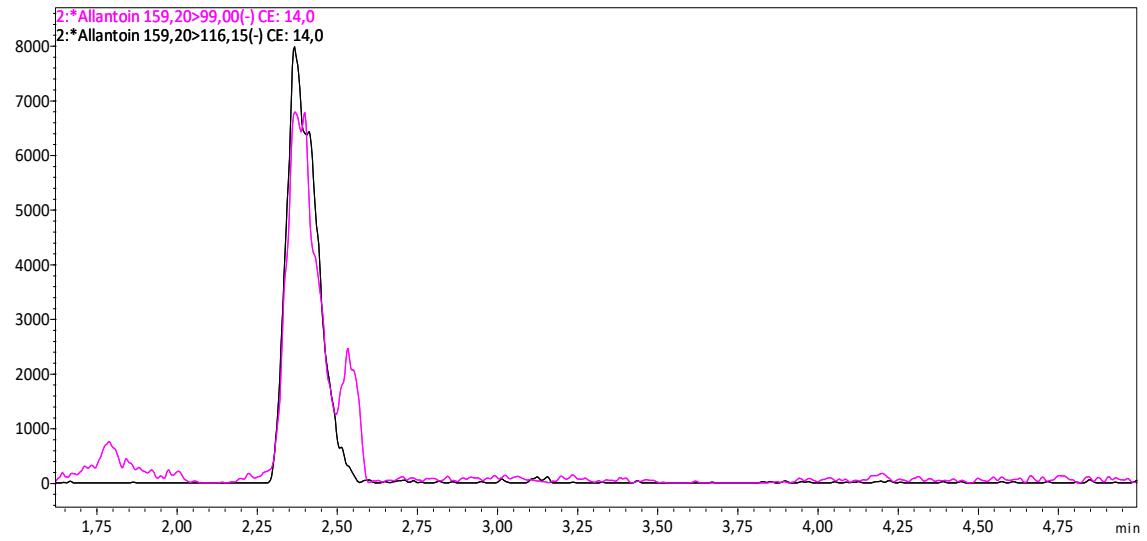
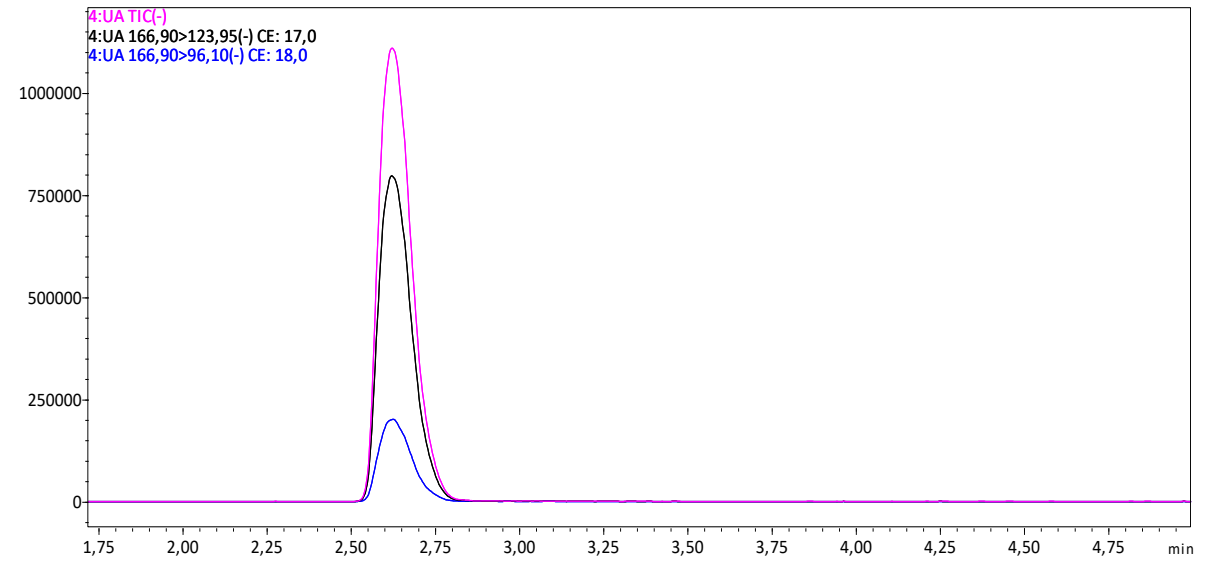
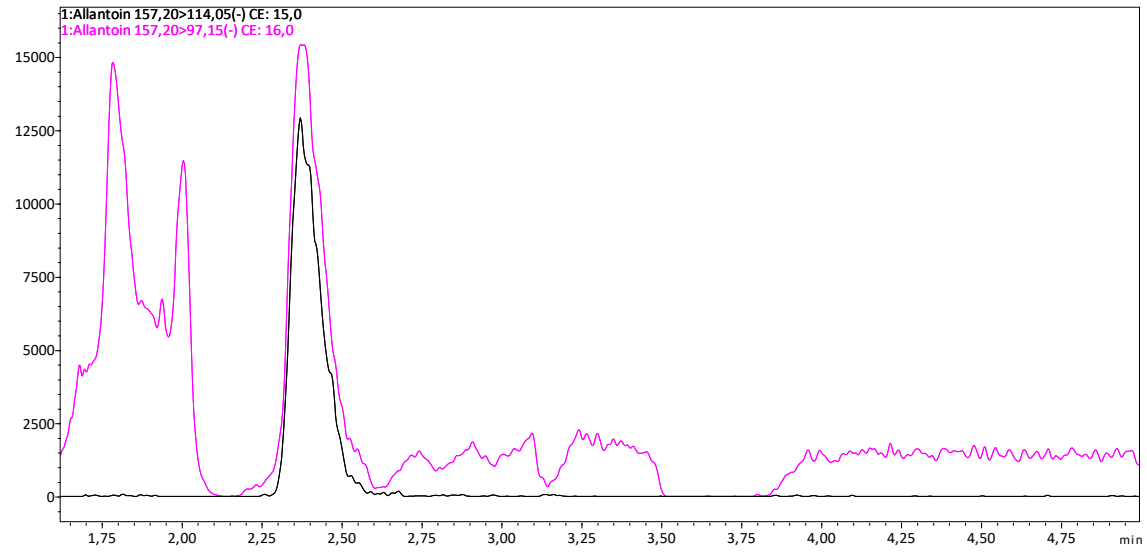


# Hmotnostní spektrometrie

- Optimalizace MRM přechodů pomocí standardů

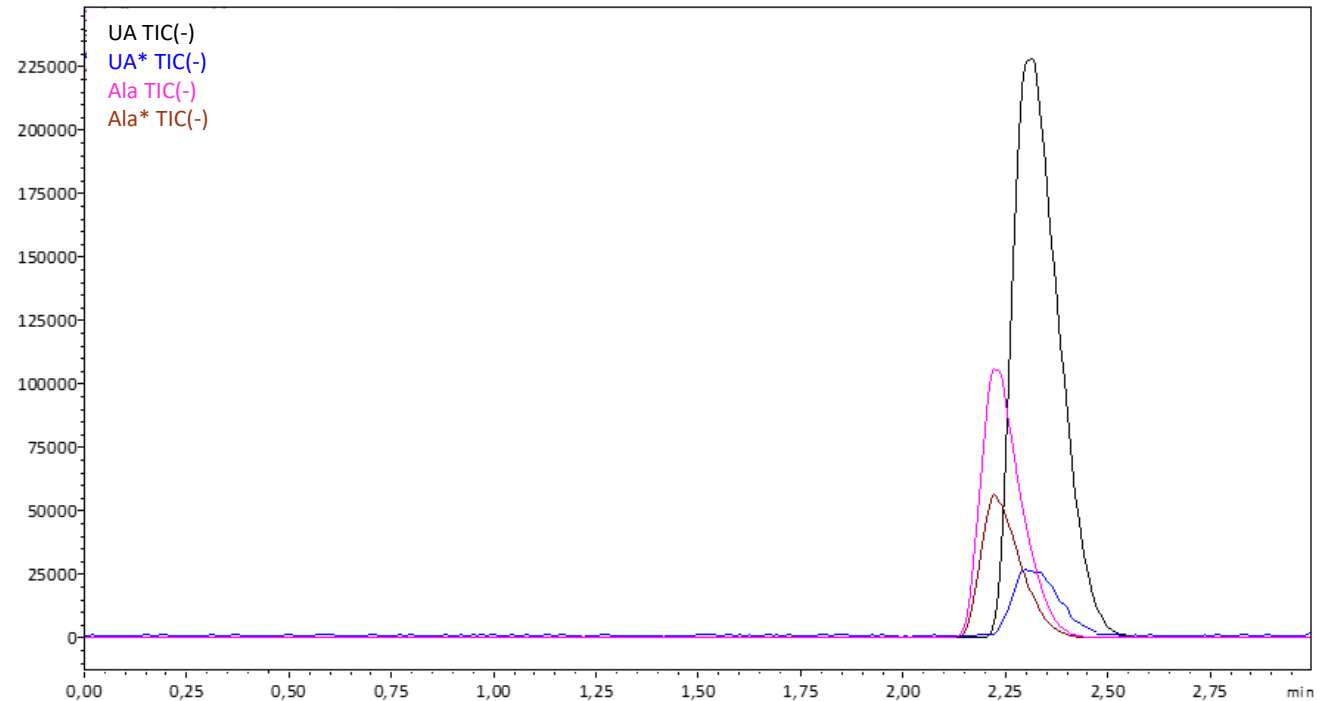
| Analyt            | Prekurzor [m/z] | Produkt [m/z] | Kolizní energie [V] |
|-------------------|-----------------|---------------|---------------------|
| Alantoin          | 157             | 114           | 15                  |
|                   |                 | 97,1          | 16                  |
| Alantoin* (IS)    | 159,2           | 116           | 14                  |
|                   |                 | 99            | 14                  |
| Kys. močová       | 166,9           | 123,9         | 17                  |
|                   |                 | 96,1          | 18                  |
| Kys. močová* (IS) | 168,9           | 125,1         | 18                  |
|                   |                 | 97,1          | 20                  |

Problém u reálného vzorku – interference matrice



# Optimalizace LC

- Test 2 různých kolon
  - **Discovery HS-F5**
  - Ascentis C18
- Test různých průtoků
  - 0,25; **0,20**; 0,15 ml/min
- Optimalizace mobilní fáze  
(pH, druh rozpouštědla)
  - Tvar píků, S/N
  - Lineární odezva
  - Reprodukovatelnost






# Cíle do budoucna

- Validace metody
- Porovnání výsledků s jinou nezávislou metodou
- Aplikace metody na klinické studie





Děkuji za  
pozornost!