

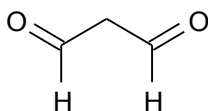
Využití HPLC při stanovení malonyldialdehydu ve vzorcích krevní plazmy

Teorie:

HPLC (high performance liquid chromatography) je separační metoda, která slouží k rychlé separaci především nízkomolekulárních látek, i když v poslední době se HPLC využívá i k separaci malých proteinů. Z hlediska uspořádání se HPLC nejčastěji dělí na normální a reverzní fázi. Při využití normální fáze je jako stacionární fáze použita polární látka (nejčastěji různé silikáty) a jako mobilní fáze se uplatňuje nepolární rozpouštědlo, například hexan. Naproti tomu u reverzní fáze (RP HPLC) jsou ve stacionární fázi vázány nepolární alifatické zbytky (podle délky se potom označují jako C8, C18, atd.). Jako mobilní fáze se při RP HPLC využívají polární rozpouštědla (methanol, acetonitrilem atd). Pro zcela specifické účely se při HPLC používají i iontoměničové kolony, kdy jako mobilní fáze slouží roztoky solí například NaCl. Volba uspořádání závisí na typu sloučenin, které hodláme separovat.

Dělní pomocí normální fáze se využívá například při studiu sacharidů. Naproti tomu pro stanovení sekundárních metabolitů u rostlin, například fytoalexinů, se nejčastěji využívána reverzní fáze. Při molekulárně-biologických experimentech se pro stanovení délkových fragmentů DNA používá iontoměničová HPLC.

V rámci tohoto cvičení budeme provádět stanovení hladiny malonyldialdehydu (MDA) ve vzorku krevní plazmy.



Malonyldialdehyd

MDA

Zvýšená hladina malonyldialdehydu v krvi souvisí s nadměrnou produkcí volných radikálů kyslíku i dusíku, která v těle způsobuje oxidační stres. Původcem tohoto oxidačního stresu bývá zpravidla působení různých faktorů jako např. onemocnění, dlouhodobá psychická zátěž a pod. Organismus se brání těmto „stresovým faktorům“

pomocí tzv. nespecifické obranné reakce, kdy neutrofilní NADPH-oxidasa produkuje superoxidový radikál, který je v organismu dále přeměňován na celou řadu reaktivních forem kyslíku a dusíku. Působení těchto radikálů má za následek poškození buněčných struktur (fosfolipidy membrán, proteiny, DNA).

K poškození lipidů dochází prostřednictvím jejich peroxidace (lipoperoxidace), což je většinou neenzymatický proces přeměny lipidů probíhající hlavně v biologických membránách a lipoproteinech. Při tomto procesu volné radikály obvykle napadají mastné kyseliny s větším počtem dvojných vazeb (nenasyčené polyenové kyseliny, např. kyseliny arachidonová). Vznikají tak hydroxymastné kyseliny, které jsou dále v organismu rozkládány na konečný produkt tohoto metabolismu, MDA. Tato látka je nejstabilnějším produktem oxidativního poškození volnými radikály a proto se používá k detekci a slouží jako marker lipoperoxidace. Pro jeho stanovení se využívá nejčastěji derivatizace pomocí reakce s kyselinu thiobarbiturovou, se kterou tvoří stabilní adukt (MDA-TBA). Vzhledem k tomu, že se MDA v krvi nachází jednak volný a jednak vázaný na proteiny, je proto prvním krokem při stanovení hladiny celkového MDA jeho hydrolyza. Vlastní HPLC-stanovení slouží především k oddělení nespecifických TBA-adtů na aldehydicke skupiny látek, které se mohou nacházet v plazmě.

Postup:

Příprava plazmy:

Do 1.5ml-mikrozkumavek: 50 μ l 5nM EDTA

+ 50 μ l krve

Centrifuga – 2000 g 10 min (4 °C).

Odebere se 60 μ l plazmy na pokus.

Stanovení MDA:

60 μ l plazmy + 6 μ l 0,2% BHT + 3 μ l 10 N NaOH

Umístit na třepačku na 30 min 60°C

+ 360 μ l 0,44M TCA obsahující 1% KI,

→ 10 min do ledu

Centrifuga – 12 000 g 10 min

200 µl supernatantu + 120 µl 0,6% TBA

- 95 °C 30 min
- ochlazení
- vialky - HPLC

EDTA.....kyselina ethylendiamintetraoctová

BHT.....butylovaný hydroxytoluen

TCA.....kyselina trichloroctová

TBA.....kyselina thiobarbiturová

Analýza bude prováděna pomocí HPLC s použitím kolony Supelcosil LC-18-DB izokratickou elucí. Jako mobilní fáze bude použit 35% methanol s 5 mM KH_2PO_4 při průtoku 0,7 ml/min po dobu 10minut. Teplota kolony je 30°C.

Detekce bude provedena pomocí DAD (diode array detector). Absorbance komplexu MDA-TBA bude měřena při vlnových délkách 532 ± 4 nm. Referenční vlnová délka bude 650 ± 50 nm.

Vyhodnocení:

Na výsledném chromatogramu bude vyhodnocena plocha píku komplexu MDA-TBA a srovnána s kalibrační přímkou.