

ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ

SOŇA SECHOVCOVÁ^a, PAVLA KRÁLOVCOVÁ^a, KAREL VENTURA^b a ROMAN KANDĀR^a

^a Katedra biologických a biochemických věd, ^b Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice
roman.kandar@upce.cz

Došlo 10.2.16, přijato 23.2.16.

Klíčová slova: kyselina lipoová, antioxidant, metody stanovení

Obsah

1. Úvod
2. Biologické funkce, metabolismus a terapeutické účinky kyseliny lipoové
3. Analytické metody pro stanovení kyseliny lipoové v biologických vzorcích
 - 3.1. Plynová chromatografie
 - 3.2. Kapalinová chromatografie
 - 3.3. Kapilární elektroforéza
4. Závěr

1. Úvod

Kyselina lipoová (LA) je silný antioxidant, který se čím dál častěji používá jako podpůrný prostředek v léčbě řady onemocnění, která jsou úzce spjata s oxidačním stresem. Stanovení LA v biologickém materiálu, potravinách a doplňcích stravy je v současné době důležité zejména v rámci studií zkoumajících biochemické reakce LA, farmakodynamických studií nebo pro sledování úspěšnosti léčby řady onemocnění. Speciálně pro klinickou praxi je nutné posoudit také farmakokinetiku LA. V posledních letech význam LA v diagnostice a léčbě nemocí roste, proto je zapotřebí, aby laboratoře měly k dispozici dostatečně citlivou, selektivní, rychlou a levnou metodu pro stanovení LA v biologických vzorcích.

Tento přehledný článek se zabývá metodami stanovení LA a její redukované formy, kyseliny dihydroliipoové (DHHLA), v různých biologických materiálech.

2. Biologické funkce, metabolismus a terapeutické účinky kyseliny lipoové

Kyselina lipoová, známá také jako thiooktanová, či 1,2-dithio-3-pentanová kyselina, je disulfidická sloučenina, která se přirozeně vyskytuje v eukaryotických i prokaryotických organismech. Obsahuje jedno chirální centrum, tudíž může vytvářet dva stereoizomery, *R*- a *S*-isomer. Avšak pouze *R*-isomer je syntetizován v těle a hraje klíčovou úlohu v energetickém metabolismu. Je esenciálním kofaktorem řady komplexů, které katalyzují oxidativní dekarboxylace. Přednostně působí v dehydrogenasovém systému α -ketokyselin, kde slouží jako přenašeč acylové skupiny z jednoho místa enzymového komplexu na jiné. V tkáních je karboxylová skupina LA vázaná kovalentně k ϵ -aminoskupině lysinového zbytku^{1,2}.

Kompletní cesta biosyntézy LA *de novo* nebyla dosud zcela objasněna, nicméně experimentální izotopové studie ukazují, že jako prekurzor 8-uhlíkatého řetězce mastné kyseliny slouží kyselina oktanová a zdrojem síry může být aminokyselina cystein³. Kyselina lipoová je v malém množství syntetizována v játrech a zdá se, že už tato *de novo* syntéza poskytuje nezbytné množství pro její potřebu v intermediárním metabolismu. Dále je také přijímána v potravě z rostlinných či živočišných zdrojů. Kyselina lipoová získaná z potravy nebo z doplňků stravy se lehce vstřebává, metabolizuje se a vylučuje zejména močí, a proto se pouze zanedbatelné množství volné LA uchovává ve tkáních^{3,4}. Nejvyšší množství LA, vázané v proteinech, obsahují ledviny, srdce a kosterní svalovina⁵. Po aplikaci doplňků stravy dochází k přechodnému zvýšení koncentrace nevázané LA uvnitř všech buněk těla, zejména srdce, mozku a jater⁶. Orálně podávaná LA je po transportu do tkání enzymaticky redukována na DHHLA. Redukci LA katalyzuje mitochondriální dihydroliipoamiddehydrogenasa, která je složkou pyruvátdehydrogenasového komplexu^{7–10}.

Kyselina lipoová je jedním z nejsilnějších přirozeně se vyskytujících antioxidantů. Nachází se v buněčných membránách, cytosolu i extracelulárním prostoru a snadno může přecházet přes hematoencefalickou bariéru. Na rozdíl od ostatních antioxidantů je výjimečná tím, že vykazuje hydrofobní i hydrofilní vlastnosti a zachovává si své antioxidantní vlastnosti v obou svých stavech, jak v oxidovaném, tak v redukovaném. Bylo prokázáno, že obě formy mají schopnost „zhášat“ různé volné radikály, jako např. hydroxylový či peroxylový radikál. Několik studií poukazuje na schopnost LA nepřímo působit na udržení buněčného antioxidantního stavu. Toho se docílí buď přímo zvýšením příjmu, či syntézy nízkomolekulár-

ních endogenních antioxidantů nebo zvýšením množství enzymů, nezbytných pro jejich syntézu^{11–13}. Kyselina lipoová v buňkách, jako jsou erytrocyty, lymfocyty a gliální buňky, výrazně zvyšuje hladiny intracelulárního glutathionu. Předpokládá se, že redukovaná forma LA redukuje cystin na cystein, který je limitujícím substrátem pro syntézu glutathionu. Navíc také může LA zvýšit hladinu buněčného cysteinu zvýšením příjmu cystinu z krevní plasmy a následně jej redukovat. Kyselina lipoová může tedy zabránit poklesu glutathionu v myokardu, který je spjat s rostoucím věkem, zvýšením dostupnosti cysteinu. Navíc má LA schopnost regenerovat endogenní antioxidanty^{14–16}.

Kyselina lipoová jako významný antioxidant a induktor endogenních antioxidantů může tedy sloužit k léčbě řady onemocnění, jako jsou katarakta, onemocnění jater, kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní nemoci či AIDS. Je účinným chelátorem řady kovů, a proto se hojně využívá v léčbě otravy těžkými kovy. Navíc nedávné studie poukazují na schopnost LA indukovat apoptózu u některých rakovinných buněčných linií. Proto je již dostupná ve formě komerčně dodávaných preparátů obsahujících racemickou směs *R*- a *S*-enantiomerů v koncentračním rozmezí 50–600 mg (cit.^{17–24}). Nejvíce je však v současnosti využívána při léčbě *diabetes mellitus* s cílem zabránit vzniku jeho četných komplikací. Kyselina lipoová je schopna aktivovat dvě molekuly signální dráhy umožňující vstup glukosy do buněk, insulin receptorový substrát (IRS-1, z angl. insulin receptor substrate) a fosfatidylinositol-3-kinasu (PI3K, z angl. phosphoinositide 3-kinase). Výsledkem je zvýšení počtu glukosových transportérů GLUT-4. Těmito mechanismy LA přispívá ke vstupu glukosy do buněk a reguluje tím hladinu glukosy v krvi, čímž brání vzniku pozdních důsledků diabetu, jako je např. diabetická nefropatie či neuropatie. U diabetické neuropatie dochází k velmi časným změnám, které jsou důsledkem zvýšeného přestupu glukosy do nervových buněk. Kyselina lipoová podle některých studií zlepšuje rychlost vedení vzruchu v motorických nervech a chrání periferní nervstvo před ischemicko-reperfúzním onemocněním^{18,24–29}. Patel a spol.²⁷ studovali na zvířecích modelech vzájemný účinek LA s vitamínem E. Výsledky studie naznačují, že adekvátní antioxidační terapie umožňuje zabránit rozvoji kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s diabetem II. typu. Kombinovaná léčba LA a vitamínu E způsobila u zvířecího modelu normalizaci glukosové tolerance, hypertenze a ukládání kolagenu v kardiomyocytech.

3. Analytické metody pro stanovení kyseliny lipoové v biologických vzorcích

Biologické vzorky obsahují velké množství interferujících látek, které by mohly rušit stanovení. Proto je nutné vzorek před vlastní analýzou upravit. Vhodnými způsoby úpravy jsou deproteinace a extrakce. Při přípravě vzorku

pro stanovení LA lze použít extrakci kapalina-kapalina nebo extrakci na tuhé fázi^{30,31}.

Jelikož je v biologickém materiálu majoritní část LA ve vazbě na proteiny, je nutné ji před vlastní analýzou z této vazby uvolnit. K tomu se využívá kyselá, bazická a především šetrná enzymatická hydrolyza. Vianey Liaud a spol.³² hydrolyzovali vzorek 6 mol l⁻¹ kyselinou chlorovodíkovou při teplotě 120 °C po dobu 2–6 hodin a uvolněnou LA extrahovali do dichlormethanu. Výťažnost LA z plasmy byla pouze 30 %, navíc během hydrolyzy docházelo k nežádoucí oxidaci LA.

Shih a Steinsberger³³ hydrolyzovali vzorek 6 mol l⁻¹ kyselinou sírovou při teplotě 125 °C po dobu 6 hodin a LA extrahovali do benzenu. Výťažnost LA u této metody byla 34 %.

Teichert a Preiss³⁰ publikovali studii, kde zkoumali účinky několika proteas k uvolnění LA z vazby na bílkovinu. Výťažnost LA z plasmy při použití termofilní proteasy, alkalasy a subtilisinu byla 70, 80 a 82 %.

3.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) má široké uplatnění v analýze těkavých látek. Je relativně jednoduchá s vysokou rozlišovací schopností či citlivostí. Kyselinu lipoovou a její metabolity nelze stanovovat přímo, je nutná derivatizace. Nejčastějšími deriváty LA jsou methylester, *S,S*-dibenzylmethylester či *S,S*-diethoxykarbonylmethylester.

GC s plamenově ionizačním detektorem

Shih a Steinsberger³³ separovali a stanovili LA a její metabolity z kuřecích jater plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem. Jako derivatizační činidlo pro metylaci LA použili diazomethan. Natraj a spol.³⁴ a Vianey Liaud a spol.³² používali jako methylační činidlo směs methanolu a kyseliny chlorovodíkové a roztok fluoridu boritého v methanolu. V biologickém materiálu je stanovení LA touto metodou obtížné, neboť část LA tvoří směs disulfidů, které musí být redukovány na thioly a pak derivatizovány vhodnými činidly. Jako redukční činidlo se používá např. tetrahydridboritan sodný.

GC s hmotnostním detektorem

Pratt a spol.³⁵ a Jackman a spol.³⁶ detegovali methylester LA hmotnostním detektorem s elektronovou ionizací (EI-MS) sledováním fragmentu iontu s *m/z* 123 a molekulárního iontu s *m/z* 220.

White³⁷ stanovoval LA jako *S,S*-dibenzylmethylester metodou GC/EI-MS, monitoroval ionty s *m/z* 311 a 137, které vznikají při štěpení vazby mezi uhlíky C7 a C8. Dále testoval některá činidla, jako např. dinitrofluorbenzen a 2,2-dimethoxypropan pro derivatizaci DHLA, nicméně, vzniklé deriváty nebyly vhodné pro stanovení metodou GC-MC díky své nízké těkavosti, nestabilitě a složité přípravě.

3.2. Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v dnešní době nejpoužívanější metodou pro analýzu LA a příbuzných sloučenin. Je používána v kombinaci s řadou typů detektorů, jako je např. ultrafialový, fluorescenční, chemiluminiscenční, hmotnostní a především elektrochemický.

Ultrafialový detektor

UV detekce nenašla při stanovení LA velké uplatnění. Hlavní příčinou je skutečnost, že LA neobsahuje silný chromofor, takže je nezbytná derivatizace. Kyselina lipoová může být detegována při vlnové délce 330 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu dithiolového kruhu. Citlivost této detekce je velmi nízká. Howard a McCormick³⁸ separovali LA a příbuzné sloučeniny metodou HPLC /UV v systému obrácených fází s gradientovou elucí. Detekční limit této metody byl 15 mg. Campos a spol.³⁹ vyvinuli metodu pro stanovení LA ve vzorku kůže metodou HPLC/UV, HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC/ED) a HPLC s odpařovacím detektorem rozptylu světla (HPLC/ELSD, z angl. evaporative light scattering detector). Srovnáním parametrů metod, využívajících rozdílné typy detektorů, došli k názoru, že metoda HPLC/UV poskytuje sice poměrně dobrou přesnost v celém koncentračním rozmezí, ale nízkou citlivost z důvodu absence chromoforu. Tato metoda může být použita ke sledování stability LA ve vzorku kůže pouze ve středních koncentračních hladinách. Detekční limit této metody byl 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Fluorescenční detektor

Kyselina lipoová neobsahuje ve své molekule ani fluorofor, tudíž je před HPLC analýzou s fluorescenční detekcí opět nutná derivatizace. Příkladem derivatizačního činidla je 2-bromacetyl-6-methoxynaftalen, monobromobiman či 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol. Výhodou tohoto typu detekce je vysoká citlivost a linearita ve velkém rozsahu koncentrací. Nevýhodou je složitá a zdlouhavá příprava vzorku.

Satoha a spol.⁴⁰ provedli simultánní stanovení LA a DHLA. DHLA byla derivatizována 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazolem. Kyselina lipoová byla redukována tris(2-karboxyethyl)fosfinem na DHLA, která byla derivatizována s 7-fluorobenzofurazan-4-sulfátem. Vzniklé deriváty byly separovány v systému obrácených fází a detegovány při vlnové délce 510 nm (excitace při 380 nm). Limit detekce byl 0,3 pmol.

Haj-Yehia a spol.⁴¹ vyvinuli metodu HPLC s fluorescenční detekcí (HPLC/FD) pro simultánní stanovení LA a DHLA v plasmě a moči. Derivatizačním činidlem byl 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol. Před derivatizací bylo nutné blokovat thiolové skupiny DHLA ethylchlorformiátem, aby nedošlo k jejich oxidaci. Vzniklé deriváty byly isokraticky separovány v systému obrácených fází a detegovány fluorescenčním detektorem ($\lambda_{\text{excitace}} = 343 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emise}} = 423 \text{ nm}$). Kalibrační závislost byla lineární v širokém koncentračním rozmezí, detekční limit byl

0,1 ng ml^{-1} pro LA a 0,5 ng ml^{-1} pro DHLA.

Niebach a spol.⁴² vyvinuli stereoselektivní metodu pro analýzu *R*- a *S*-enantiomerů. Jako derivatizační činidlo použili *o*-ftalaldehyd v přítomnosti *D*-fenylalaninu. Detekční limit byl 3 ng ml^{-1} .

Witt a spol.⁴³ popsali ve své práci metodu pro stanovení LA v plasmě a tkáních. Metoda je založená na selektivní předkolonové derivatizaci thiolů s monobromobimananem. Po extrakci diethyletherem byl dithiolový kruh otevřen po redukci tetrahydridoboritanem sodným. Vzniklé deriváty byly detegovány při vlnové délce 470 nm (excitace při 385 nm). Detekční limit byl 4 ng ml^{-1} .

Hmotnostní detektor

Chen a spol.⁴⁴ vyvinuli metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a ionizací elektrosprejem (LC-ESI-MS) pro stanovení LA v lidské plasmě po suplementaci, kterou úspěšně použili pro farmakokinetické studie LA u 10 zdravých dobrovolníků. Vnitřní standard naproxen a LA byly z plasmy extrahovány acetonitrem. Separace byla provedena na koloně Zorbax SB-C18, mobilní fází byla směs acetonitrilu a 0,1% kyseliny octové v poměru 65:35 (v/v). Detekční limit byl 2 ng ml^{-1} .

Chang a spol.⁴⁵ vyvinuli metodu kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS) pro stanovení hladiny perorálně podávané LA ve vzorcích krve a mozku krys. Mobilní fází byla směs acetonitrilu a 0,1% kyseliny octové o pH 4,0. Kyselina valproová (vnitřní standard) a LA byly extrahovány acetonitrem. Výtěžnost metody byla v rozmezí 92 až 115 %, detekční limit byl 0,1 ng ml^{-1} .

Elektrochemický detektor

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení LA je HPLC/ED. Tento typ detekce vykazuje vysokou citlivost a selektivitu. Navíc nevyžaduje vysoké nároky na přípravu vzorku ve srovnání s ostatními metodami, kde je nutná derivatizace. Nevýhodou této detekce je užší lineární dynamický rozsah a jistá obtížnost spojení tohoto detektoru s gradientovou elucí. Je nutné používat vodivé mobilní fáze, pracuje se tedy se systémy s obrácenými fázemi. Kyselinu lipoovou a DHLA je možno oxidovat vložením vhodného elektrického potenciálu, a proto je tento typ detektoru vhodný pro stanovení obou forem. Citlivost a selektivita této metody je určena volbou typu přístroje, elektrod a složením mobilní fáze.

Teichert a spol.⁴⁶ vyvinuli metodu pro stanovení LA v lidské plasmě po suplementaci. Tato metoda zahrnuje hydrolyzu vzorku k uvolnění LA z proteinů, extrakci na pevné fázi a kvantifikaci HPLC/ED. Detekční limit této metody je 1 ng ml^{-1} . V popsané práci nebyli schopni současně stanovit LA a DHLA, neboť nedokázali zabránit rychlé oxidaci DHLA. Provedli hydrolyzu vzorků plasmy koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a uvolněnou LA (DHLA) extrahovali směsí hexanu a chloroformu. Výtěžnost této metody byla pouze 30 %. Testovali také hydrolyzu enzymem alkalasa, následovanou extrakcí na pevné fázi. V tomto případě byla výtěžnost 80 %.

Tabulka I
Přehled analytických metod pro stanovení lipoové kyseliny a příbuzných sloučenin

Metoda	Vzorek	Analyt ^a	Derivatizace ^b	Limit detekce	Lit.
GC/FID	kuřecí játra	LA	CH ₂ N ₂	–	33
GC/FID	kryší játra, ledviny	LA	HCl-MeOH	–	34
GC/FID	pšeničná zrna	LA	BF ₃ -MeOH	20 ng	32
GC/MS	<i>E. coli</i>	LA	CH ₂ N ₂	–	35
GC/MS	játra, ledviny	LA	CH ₂ N ₂	–	36
HPLC/UV	standardní roztok	LA, LAM	–	15 mg	37, 38
HPLC/UV	doplňěk stravy	LA	–	4,4 µg ml ⁻¹	51
HPLC/ED	plasma	LA, DHLA	ABD-F, SBD-F	0,3 pmol	39
HPLC/ED	plasma, moč	LA, DHLA	ABT-M	0,1 ng ml ⁻¹ , 0,5 ng ml ⁻¹	40
HPLC/ED	plasma	R,S LA	OPA-D-Phe	3 ng ml ⁻¹	41
HPLC/ED	plasma	LA	mBBr	4 ng ml ⁻¹	42
HPLC/ED	plasma	R,S LA	ABD-F	17 µg ml ⁻¹	56
LC/MS	plasma	LA	–	2 ng ml ⁻¹	43
LC/MS/MS	kryší krev	LA	–	0,1 ng ml ⁻¹	44
HPLC/ED	plasma	LA	–	1 ng ml ⁻¹	45
HPLC/ED	plasma, moč	LA	–	p:4,6 ng ml ⁻¹ , m:103 ng ml ⁻¹	46
HPLC/ED	doplňěk stravy	LA, LAM	–	LA: 0,05 ng, LAM: 0,1 ng	5
HPLC/ED	tkáňová kultura	LA, DHLA	–	LA: 10 ng, DHLA: 2 ng	47, 48
HPLC/ED	plasma	LA	–	0,2 ng ml ⁻¹	31
HPLC/ED	plasma	LA, DHLA	–	LA: 0,5 ng ml ⁻¹ , DHLA: 3 ng ml ⁻¹	49
DPV/ED	sérum	LA	–	0,02 ng ml ⁻¹	50
CE/UV	plná krev	LA, LAM	–	–	52
CE/UV	doplňěk stravy	LA	–	0,8 µg ml ⁻¹	53
CE/UV	buněčná kultura	LA	–	0,1 µg ml ⁻¹	54
CE/UV	doplňěk stravy	R,S LA	–	34 µg ml ⁻¹	55

^a LAM, lipoamid; R,S LA, R,S-enantiomer; ^b CH₂N₂, diazomethan; HCl-MeOH, směs methanolu a kyseliny chlorovodíkové; BF₃-MeOH, roztok fluoridu boritého v methanolu; ABD-F, 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3,-benzoxadiazol; SBD-F, 7-fluorobenzofurazan-4-sulfát; ABT-M, 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol; OPA, *o*-ftalaldehyd; D-Phe, D-fenylalanin; mBBr, monobromobiman

Stejný kolektiv autorů v roce 2002 stanovil LA a jejích 5 metabolitů v lidské plasmě a v moči, rovněž u suplementovaných pacientů⁴⁷. Tato práce také zahrnuje hydrolyzu vzorku k uvolnění LA z proteinů a extrakci na pevné fázi. Výtěžnost metody byla pro plasmu 90 % a moč 82,5 %. Limit kvantifikace uvádějí 4,6 ng ml⁻¹ v případě plasmu a 103 ng ml⁻¹ v případě moče. Tvrdí, že tyto metody jsou vhodné pro stanovení exogenních hladin LA a posouzení její farmakokinetiky, avšak nejsou použitelné pro měření endogenních hladin LA^{30,46,47}.

Kamata a Akiyama⁵ ve své studii uvádí, že LA a její lipoamid mohou být simultánně analyzovány metodou HPLC/ED při použití argentochloridových elektrod. Detekční limit byl 0,05 ng (LA) a 0,1 ng (lipoamid).

Handelman a spol.⁴⁸ a Han a spol.⁴⁹ použili ve své

práci pro stanovení LA a DHLA alternativní elektrochemický systém, duální Hg-Au elektrodu. V tomto systému jedna z elektrod působí jako generátor a druhá jako detektor určitých částic, přičemž LA je redukována na DHLA při vysokém záporném potenciálu na generátorové elektrodě a detegována jako DHLA na následné elektrodě. Detekční limit byl 10 ng (LA) a 2 ng (DHLA).

V roce 2010 Khan a spol.³¹ ve své práci prezentovali HPLC/ED metodu pro stanovení LA v lidské plasmě. Jako vnitřní standard použili naproxen, LA a vnitřní standard extrahovali jedнокrokovou extrakcí kapalina-kapalina a extrakci na pevné fázi. Extrakčním činidlem byl v obou případech dichlormethan. Výtěžnost LA při extrakci kapalina-kapalina byla 95–99 % a 97–102 % v případě extrakce na pevné fázi. Detekční limit této metody byl 0,2 ng ml⁻¹.

O rok později stejný tým autorů prezentuje HPLC/ED metodu pro simultánní stanovení LA a DHLA⁵⁰. Jako vnitřní standard použili opět naproxen a LA spolu s DHLA extrahovali dichlormethanem v systému kapalina-kapalina. Výťažnost metody byla 93–97 %. Detekční limit pro LA byl 0,5 ng ml⁻¹ a 3 ng ml⁻¹ pro DHLA.

V roce 2014 Marin a spol.⁵¹ popsali ve své práci voltametrické stanovení LA v lidském séru platinovou elektrodou v acetátovém pufru. Všechna elektrochemická měření byla provedena přístrojem Autolab PGSTAT 302N. Vliv chloridových iontů na elektrochemickou oxidaci LA byl zjišťován cyklickou a diferenční pulsní voltmetrií na platinové elektrodě a elektrodě ze skelného uhlíku. Platinová elektroda vykazovala lepší elektrokatalytickou aktivitu pro oxidaci LA. Elektrochemická oxidace LA na platinové elektrodě je ireversibilní proces, závislý na pH a zahrnující přenos jednoho elektronu a protonu. Jelikož tato elektroda jevila nejlepší elektrokatalytickou aktivitu při pH 4,5, musely být vzorky lidského séra zředěny acetátovým pufrem. Vlivem ředění vzorků a nízké koncentraci LA v séru byla citlivost detekce nízká a bylo nutné ke vzorkům séra přidávat standardní přídavek LA o koncentraci 0,05–0,5 ng ml⁻¹. Tato metoda je tedy vhodná pouze pro stanovení LA v lidském séru po suplementaci. Detekční limit je 0,02 ng ml⁻¹.

Na našem pracovišti používáme pro stanovení LA po suplementaci modifikovanou Teichertovu metodu^{46,47}. Venózní krev je odebírána do EDTA zkumavek a plasma je co nejrychleji oddělena od krvinek. Pokud nemůže být plasma ihned zpracována, uchovává se při teplotě –80 °C. Po hydrolyze, katalyzované enzymem alkalasa, a deproteinaci plasmy je provedena extrakce na pevné fázi. Eluát je odpařen v proudu dusíku, odparek rozpuštěn ve směsi acetonitril/voda a dávkován na kolonu s vázanou reverzní fází. Mobilní fází je směs dihydrogenfosforečnanu sodného a acetonitrilu. K detekci je použit coulometrický elektrochemický detektor. Na ochranné cele je nastaven potenciál 750 mV a LA je detegována na analytické cele ($E_1 = 450$ mV a $E_2 = 590$ mV). Detekční limit metody je 0,4 ng ml⁻¹.

3.3. Kapilární elektroforéza

Ve srovnání s HPLC je kapilární elektroforéza (CE) schopna dosáhnout lepší účinnosti separace, minimalizuje se spotřeba organických činidel a zároveň se snižuje množství vzorku potřebného k analýze. Migrační vlastnosti ionizovaných látek závisí na několika faktorech, jako je např. pH a koncentrace pufru, teplota kapiláry či síla elektrochemického pole.

Panak a spol.⁵² použili micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC) k separaci LA, lipoamidu a GSH, v prostředí 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru a 30 mmol l⁻¹ dodecylsiranu sodného pH 7. Detekce byla UV (214 nm), s detekčním limitem ve femtomolech. Sitton a spol.⁵³ popisují ve své práci stanovení LA v doplňcích stravy kapilární zónovou elektroforézou (CZE), v prostředí fosfátového pufru (pH 7) a s přídatkem methanolu, který brání nežá-

doucí adsorpci LA na vnitřní stěnu kapiláry. Detekční limit je 0,8 µg ml⁻¹. V roce 2014 Li a spol.⁵⁴ použili alternativní CE k měření obsahu LA v buněčné kultuře. Separace probíhala v prostředí borátového pufru (pH 9,1) a detekční limit byl 0,1 µg ml⁻¹. Kodama a spol.⁵⁵ separovali *R*- a *S*-enantiomery z doplňků stravy metodou CE/UV, za použití trimethyl-β-cyklohextrinu, jako chirálního selektoru, s detekčním limitem 34 µg ml⁻¹.

Přehled metod pro stanovení obsahu LA a jejich příbuzných sloučenin v různých materiálech je uveden v tab. I.

4. Závěr

V současné době existuje několik metod vhodných pro stanovení LA v biologickém materiálu, potravinách či doplňcích stravy. Z dosavadních publikací je patrné, že endogenní hladiny LA jsou prakticky nedetegovatelné a smyslem většiny prací je stanovení LA po suplementaci. Nejširší uplatnění zde mají chromatografické metody, zvláště ve spojení s elektrochemickou detekcí. Existují i citlivější metody jako je LC/MS či GC/MS, které by mohly určit referenční rozmezí endogenních hladin LA, ale jedná se o velmi nákladné měření a tudíž nevhodné pro klinickou praxi. Navíc se nepředpokládá, že takto nízké hladiny LA, ve srovnání s hladinami ostatních antioxidantů, významně ovlivňují kardiovaskulární systém či antioxidační ochranu organismu.

LITERATURA

1. Fujiwara K., Okamura K., Motokawa Y.: *J. Biol. Chem.* 271, 12932 (1996).
2. Reed J. L.: *Protein Sci.* 7, 220 (1998).
3. Harrison E. H., McCormick D. B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 514 (1974).
4. Biewenga G. P., Haenen G. R., Bast A.: *Gen. Pharmacol.* 29, 315 (1997).
5. Kamata K., Akiyama K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8, 453 (1990).
6. Peinado J., Sies H., Akerboom T. P. M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 389 (1989).
7. Constantinescu A., Pick U., Handelman G. J., Haramaki N., Han D., Podda M., Tritschler H. J., Packer L.: *Biochem. Pharmacol.* 50, 253 (1995).
8. Biewenga G. P., Dorstijn M. A., Verhagen J. V., Haenen G. R., Bast A.: *Biochem. Pharmacol.* 51, 233 (1996).
9. Haramaki N., Han D., Handelman G. J., Tritschler H. J., Packer L.: *Free Radical Biol. Med.* 22, 535 (1997).
10. Jones W., Li X., Qu Z.C., Perriotti L., Whitesell R. R., May J. M.: *Free Radical Biol. Med.* 33, 83 (2002).
11. Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J.: *Free Radical Biol. Med.* 19, 227 (1995).
12. Devasagayam T. P., Subramanian M., Pradhan D. S., Sies H.: *Chem.-Biol. Interact.* 86, 79 (1993).

13. Suzuki Y. J., Tsuchiya M., Packer L.: Free Radical Res. Commun. 15, 255 (1991).
14. Han D., Handelman G., Marcocci L., Sen C. K., Roy S., Kobuchi H., Tritschler H. J., Flohe L., Packer L.: BioFactors 6, 321 (1997).
15. Suh J. H., Wang H., Liu R. M., Liu J., Hagen T. M.: Arch. Biochem. Biophys. 423, 126 (2004).
16. Moreau R., Zhang W. J., Hagen T. M., v knize: *Handbook of antioxidants* (Cadenas E., Packer L., ed.). Dekker, New York 2002.
17. Akiba S., Matsugo S., Packer L., Konishi T.: Anal. Biochem. 258, 299 (1998).
18. Packer L., Kraemer K., Rimbach G.: Nutrition 17, 888 (2001).
19. Navari-Izzo F., Quartacci M. F., Sgherri C.: Plant Physiol. Biochem. 40, 463 (2002).
20. Lodge J. K., Traber M. G., Packer L.: Free Radical Biol. Med. 25, 287 (1998).
21. Muller L., Menzel H.: Biochim. Biophys. Acta 1052, 386 (1990).
22. Anuradha P., Varalakshmi P.: Pharmacol. Res. 39, 67 (1999).
23. Zhang S. J., Ge Q. F., Guo D. W., Hu W. X., Liu H. Z.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 3078 (2010).
24. Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K. J., Meissner H. P., Lobish M., Schutte K., Gries F. A.: Diabetologia 38, 1425 (1995).
25. Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K. J., Hasche H., Lobish M., Schutte K., Kerum G., Malessa R.: Diabetes Care 22, 1296 (1999).
26. Kamenova P.: Hormones 5, 251 (2006).
27. Patel J., Matnor N. A., Iyer A., Brown L.: J. Evid. Based Complementary Altern. Med. 2011, 1.
28. Yi X., Nিকেleit W., James L. R., Maeda N.: J. Diabetes Complications 25, 193, (2011).
29. Ziegler D., Nowak H., Kempler P., Vargha P., Low P. A.: Diabet. Med. 21, 114 (2004).
30. Teichert J., Preiss R.: J. Chromatogr. B 672, 277 (1995).
31. Khan M. I., Khan M. I., Iqbal Z., Ahmad L., Shah Y., Watson D. G.: J. Chromatogr. B 878, 2782 (2010).
32. Vianey Liaud N., Kobrehel K., Sauvaire Y., Wong J. H., Buchanan B. B.: J. Agric. Food Chem. 42, 1110 (1994).
33. Shih J. C. H., Steinsberger S. C.: Anal. Biochem. 116, 65 (1981).
34. Natraj C. V., Gandhi V. M., Menon K. K. G.: J. Biosci. 6, 37 (1984).
35. Pratt K. J., Carles C., Carne T., Janson M. J., Stevenson K. J.: Biochem. J. 258, 749 (1989).
36. Jackman S. A., Hough D. W., Danson M. J., Stevenson K. J., Oppendoes F. R.: Eur. J. Biochem. 193, 91 (1990).
37. White R. H.: Anal. Biochem. 110, 89 (1981).
38. Howard S. C., McCormick D. B.: J. Chromatogr. B 208, 129 (1981).
39. Campos P. M., Praca F. S., Bentley M. V.: J. Chromatogr. B (2015) jchromb.2015.07.029 (v tisku).
40. Satoha S., Toyo'oka T., Fukushima T., Inagaki S.: J. Chromatogr. B 854, 109 (2007).
41. Haj-Yehia A., Assaf P., Nassar T., Katzhendler J.: J. Chromatogr. A 870, 381 (2000).
42. Niebch G., Buechele B., Biome J., Grieb S., Brandt G., Kampa P., Rafel H. H., Borbe H. O., Nubert I., Fleischhauer I.: Chirality 9, 32 (1997).
43. Witt W., Rustow B.: J. Chromatogr. B 705, 127 (1998).
44. Chen J., Jiang W., Cai J., Tao W., Gao X., Jiang X.: J. Chromatogr. B 824, 249 (2005).
45. Chang H. T., New L. S., Neo A. H., Goh C. W., Browne E. R., Chan E. C. Y.: J. Pharm. Biomed. Anal. 51, 754 (2010).
46. Teichert J., Preiss R.: J. Chromatogr. B 769, 269 (2002).
47. Teichert J., Preiss R.: Methods Enzymol. 279, 159 (1997).
48. Handelman G. J., Han D., Tritschler H., Packer L.: Biochem. Pharmacol. 47, 1725 (1994).
49. Han D., Handelman G. J., Packer L.: Methods Enzymol. 251, 315 (1995).
50. Khan M. I., Iqbal Z., Watson D. G., Khan A., Khan I.: J. Chromatogr. B 879, 1725 (2011).
51. Marin M., Lete C., Manolescu B. N., Lupu S.: J. Electroanal. Chem. 729, 128 (2014).
52. Panak K. C., Ruiz O. A., Giorgier S. A., Dioz L. E.: Electrophoresis 17, 1613 (1996).
53. Sitton A., Schmid M. G., Gubitz G., Aboul-Enein H. Y.: J. Biochem. Biophys. Methods 61, 119 (2004).
54. Li H., Kong Y., Feng Z., Chang N., Liu J., Long J.: Chromatographia 77, 145 (2014).
55. Kodama S., Taga A., Aizawa S. I., Kemmei T., Honda Y., Suzuki K., Yamamoto A.: Electrophoresis 33, 2441 (2012).
56. Keith D. J., Butler J. A., Bemer B., Dixon B., Johnson S., Garrard M., Sudakin D. L., Christensen J. M., Pereira C., Hagen T. M.: Pharmacol. Res. 66, 199 (2012).

S. Sechovcová^a, P. Královcová^a, K. Ventura^b, and R. Kand'ár^a (^a Department of Biological and Biochemical Sciences, ^b Department of Analytical chemistry, University of Pardubice, Pardubice): **Analytical Methods for the Determination of Lipoic Acid**

Lipoic acid is powerful antioxidant which is used as a dietary supplement to treat a lot of disorders associated with the oxidative stress and was found to be useful in patients with diabetes and cardiovascular diseases. The article deals with analytical methods used for the determination of lipoic acid in various samples.