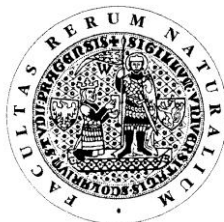


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie



**REFRAKTOMETRICKÁ STUDIE  
LIPOPROTEINU O VELMI NÍZKÉ  
HUSTOTĚ (VLDL)**

Refractometric study of very low density  
lipoprotein (VLDL)

Bakalářská práce  
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2011

Simona Šinglárová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 28. srpna 2011

.....

## **Abstrakt**

Znalost chemického složení lipoproteinů má široký význam. Při stanovení velikosti částic lipoproteinových frakcí je nutná předběžná separace pomocí ultracentrifugace v hustotních roztocích. Obvykle se samotné stanovení provádí elektroforeticky či gelovou filtrací s vhodnou detekcí, která výsledek zkresluje. Lepší řešení nabízí nový detektor, tzv. Light Scattering Detector, který detekuje ohyb laserového paprsku na molekulách či částicích v roztoku. Pro výpočet velikosti částic vyžaduje závislost indexu lomu na koncentraci  $dn/dc$ . Koncentrace je stanovena gravimetricky a indexy lomu metodou refraktometrickou. Závislosti nejlépe vyhovuje polynomická funkce. Zda koreluje s chemickým složením lipoproteinu VLDL je možné určit na základě studia většího počtu vzorků.

## **Abstract**

Knowledge of the chemical composition of lipoproteins has a broad meaning. In determining lipoprotein particle size fractions is necessary to preliminary separation by ultracentrifugation in density solutions. Usually the determination is performed by electrophoretic or gel filtration with a suitable detection, which distorts the results. A better solution offers a new detector, called Light Scattering Detector, which detects the bend of laser beam on molecules or particles in solution. To calculate the required particle size dependence on the concentration of the refractive index  $dn/dc$ . Concentration is determined gravimetrically and refractive indices by refractometric method. Dependence suits polynomial function. If it correlates with the chemical composition of VLDL lipoprotein can be determined by studying a larger number of samples.

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část .....	9
2.1 Refraktometrie .....	9
2.1.1 Historie.....	9
2.1.2 Index lomu .....	10
2.1.3 Závislost indexu lomu na hustotě látky .....	11
2.1.4 Princip metody měření indexu lomu.....	12
2.1.5 Využití v klinické biochemii.....	13
2.1.6 Refraktometr Abbeova typu.....	13
2.2 Lipoproteiny .....	15
2.2.1 Obecná charakteristika lipoproteinů .....	15
2.2.2 Lipoproteiny a jejich dělení .....	15
2.2.3 Stanovení lipidů v tělních tekutinách.....	17
2.2.4 Separace lipoproteinů .....	19
3. Cíl práce.....	21
4. Experimentální část.....	22
4.1 Přístroje .....	22
4.2 Použité roztoky.....	22
4.3 Práce se vzorky .....	23
4.4 Měření indexu lomu na Abbeho refraktometru.....	23
5. Výsledky a diskuze .....	24
6. Závěr .....	30
7. Literatura.....	31



## Seznam symbolů a zkratek

ADP	adenosindifosfát
Apo	apolipoprotein (apoprotein)
ATP	adenosintrifosfát
$c$	rychlost světla ve vakuu
CB	celková bílkovina
E	endotel
$f(n)$	funkce indexu lomu
G	Golgiho aparát
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LLSD	Laser Light Scattering Detector
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
N	absolutní index lomu (kapitola 2.1.2)
N	jádro (kapitola 2.2.2)
$N_v$	absolutní index lomu vzduchu
$n_{21}$	relativní index
$\bar{n}$	průměr indexů lomu
ot/min	otáčky za minutu
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
$R_s$	specifická refrakce
RER	drsné endoplasmatické retikulum
SER	hladké endoplasmatické retikulum
SD	Disseův prostor
TAG	triacylglyceroly
TC	celkový cholesterol
$v$	rychlost světla v hmotném prostředí
VHDL	lipoproteiny o velmi vysoké hustotě
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
$\rho$	hustota
$\varphi$	objemový zlomek

# 1. Úvod

Lipoproteiny jsou komplexní makromolekuly, které v krevním oběhu představují transportní formu jednotlivých lipidů. Jejich chemické složení – zastoupení specifických proteinů, cholesterolu, jeho esterů, triacylglycerolů a fosfolipidů – je charakteristické pro různé poruchy metabolismu lipidů. Toto chemické složení slouží jako základ pro diagnostiku těchto poruch, poslední vývoj však naznačil i další cesty výzkumu. Jedním z požadavků je stanovení velikosti částic jednotlivých lipoproteinových tříd, které lze provést elektroforeticky na gradientu polyakrylamidu, nebo gelovou filtrací s vhodným způsobem detekce.

Pro obě metody je třeba předběžná separace jednotlivých lipoproteinových tříd od malých molekul přítomných v krevní plasmě pomocí preparativní ultracentrifugy a postupně zvyšované hustoty roztoku. Lipoproteiny nelze detailně studovat bez předchozí separace v hustotních roztocích, a zároveň je nelze separovat, aniž by došlo k určitým konformačním změnám v koncentrovaném roztoku soli. Nelze ani stoprocentně zaručit, že po odstranění přebytku soli dialýzou se struktura částice zcela navrátí do původní formy. Problémem je i kalibrace – prakticky jediným vyhovujícím způsobem je použití vlastních separovaných lipoproteinových tříd, jejichž částice byly změřeny pomocí elektronového mikroskopu.

Dosud využívané detekční metody jsou založeny na sledování charakteristických absorbancí pro bílkoviny nebo barevných sloučenin vzniklých tzv. post-kolonovou reakcí z cholesterolu nebo triacylglycerolů. Tento způsob detekce však zkresluje zastoupení jednotlivých frakcí podle toho, která složka je právě detekována (např. velmi malý obsah bílkoviny v lipoproteinu o velmi nízké hustotě vedle velkého obsahu triacylglycerolů). Nejlepším řešením je nový typ detektoru, tzv. Laser Light Scattering Detector, který detekuje ohyb laserového paprsku na molekulách či částicích v roztoku. Tento detektor je obvykle zapojen v sérii s detektorem UV-VIS a refraktometrickým detektorem. Pro výpočet velikosti molekuly či částice je třeba pro celý systém znát závislost indexu lomu na koncentraci sledované látky. Změření této závislosti pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě odlišného chemického složení je cílem této práce.<sup>2,10,11,13</sup>



## 2. Teoretická část

### 2.1 Refraktometrie

#### 2.1.1 Historie

Refraktometrii lze považovat za nejstarší optickou metodu použitou v chemickém výzkumu. Již Newton ve svém díle Optika podal výklad o „schopnosti lomu“, pozorované u řady látek podle tehdy existujících představ o jejich chemické povaze. Ze známých hodnot indexu lomu a hustoty látek vyvodil Newton zajímavé závěry o struktuře solí, ethanolu a diamantu, jehož příbuznost s organickými látkami předpověděl dávno předtím, než byla dokázána chemicky.

V polovině 18. století se tehdejší významní vědci v čele s Leonardem Eulerem zabývali zákonitostmi indexů lomu a disperze u různých látek v souvislosti s vývojem achromatických čoček. Rozsáhlý program Lomonosovových fyzikálně chemických výzkumů zahrnoval „pokusy týkající se lomu v kapalinách“, kterými se badatel zabýval v roce 1756 a později. Lomonosov konstruoval a zdokonaloval v letech 1752 až 1762 úhloměr, což byl jeden z prvních refraktometrů.

Intenzivní rozvoj refraktometrie jako pomocné metody v chemickém výzkumu začíná v druhé polovině 19. století. Je využívána pro objasnění závislosti vlastností látek na jejich složení a struktuře a jako jednoduchá a pohodlná analytická metoda potřebná v rozvíjejícím se chemickém průmyslu. V tomto období profesori Abbe a Pulfrich z Jeny vyvinuli vhodné konstrukce refraktometrů, které se v širokém měřítku používají dodnes. Jejich následovník Löwe se zasloužil o popularizaci metod technické analýzy, sestavení vhodných refraktometrů a o zavedení interferometrů do chemických a průmyslových laboratoří.

K širokému rozšíření refraktometrie jako jedné z nejdůležitějších fyzikálních metod analýzy přispělo to, že velmi výhodně spojuje vysokou přesnost, technickou jednoduchost a přístupnost. Index lomu je jednou z mála fyzikálních konstant, které lze změřit s mimořádně vysokou přesností v krátkém čase, i když je k dispozici jen malé množství látky.<sup>5</sup>

## 2.1.2 Index lomu

Refraktometrie se používá především pro měření indexu lomu kapalin, případně pevných látek. Index lomu je fyzikální veličina, jejíž hodnota je charakteristickou vlastností každé látky. Měřením indexu lomu jednotlivých látek nebo jejich směsi lze identifikovat nebo zjišťovat termodynamické vlastnosti stavu, v jakém se měřená látka nachází, či posoudit jejich čistotu. Jestliže světelný paprsek monochromatického záření prochází rozhraním dvou transparentních prostředí, mění se jeho rychlost a směr (láme se). Směr paprsku se mění podle zákona lomu, formulovaném v 17. století. Podle tohoto zákona má poměr sinů úhlů dopadu  $\alpha_1$  a lomu  $\alpha_2$  konstantní hodnotu.

$$n_{21} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} \quad (1.1)$$

$n_{21}$  se nazývá relativní index neboli koeficient lomu látky 2 vzhledem k látce 1. Vlnová teorie světla vyjadřuje jednoduchý vztah mezi indexem lomu a rychlostí šíření světelných vln ve dvou prostředích.

$$n_{21} = \frac{v_1}{v_2} \quad (1.2)$$

Poměr rychlosti světla ve vakuu k rychlosti světla v hmotném prostředí se nazývá absolutní index lomu  $N$ .

$$N = \frac{c}{v} \quad (1.3)$$

Rychlost světla ve vakuu je blízká rychlosti světla ve vzduchu, tudíž se index lomu vztahuje na vzduch a označuje se pouze index lomu  $n$ . Protože je rychlost světla ve vzduchu vždy větší než rychlost světla v hustších prostředích, jsou indexy lomu látek čísla větší než 1 (např. voda  $n = 1,33262$ , diamant  $n = 2,4173$ ). Relativní index lomu  $n_{12}$  se rovná poměru absolutních indexů lomu látek 1 a 2.

$$n_{21} = \frac{N_2}{N_1} \quad (1.4)$$

Při měření indexů lomu kapalných a tuhých vzorků se obvykle stanovují jejich relativní indexy lomu ve vztahu ke vzduchu v laboratoři. Mezi absolutním indexem lomu a indexem lomu vztaženému ke vzduchu platí vztah

$$N = N_v \cdot n \quad (1.5)$$

K získání absolutního indexu lomu tedy stačí vynásobit naměřené hodnoty  $n$  absolutním indexem lomu vzduchu. Při atmosférickém tlaku a laboratorní teplotě

$$N_v = 1,00027$$

a po dosazení této hodnoty do vzorce (1.5) dostaneme obecný vztah

$$N = 1,00027 \cdot n \quad (1.6)$$

Vztah (1.6) je přibližný, protože přehlíží závislost absolutního indexu lomu vzduchu na tlaku, teplotě a vlhkosti. V případě, že nevyžadujeme větší absolutní přesnost měření  $n$  než  $1 \cdot 10^{-4}$ , je takové zjednodušení přípustné. Index lomu určité látky je charakteristický, ale závisí na vnějších podmínkách (především na teplotě) a vlnové délce světla. Teplota se vyznačuje horním indexem vpravo a vlnová délka dolním indexem vpravo. Např.  $n_{480}^{25}$  označuje index lomu při 25 °C pro modrou čáru kadmia o vlnové délce 480 nm. U často užívaných spektrálních čar se obvykle vlnová délka nahrazuje písmeny.<sup>5-7,15-17</sup>

### 2.1.3 Závislost indexu lomu na hustotě látky

Změny hustoty látky jsou vždy provázeny změnou jejího indexu lomu. Teoretické výzkumy vztahu mezi hustotou látky a jejím indexem lomu potvrzují experimentální údaje a ukazují na lineární závislost funkce indexu lomu,  $f(n)$ , na hustotě  $\rho$ .

$$f(n) = R_s \cdot \rho \quad (1.7)$$

Veličina  $R_s$  se nazývá specifická refrakce a je charakteristická pro každou látku. Nezávisí na vnějších podmínkách ani na skupenství látky. Přesněji, specifická refrakce se mění velmi nepatrně. Newton předpokládal, že k lomu světla dochází působením látky na světelné částice a usuzoval, že  $f(n) = n^2 - 1$ . Laplace podal matematické odvození této funkce a vztah pro specifickou refrakci

$$R_s = \frac{n^2 - 1}{\rho} \quad (1.8)$$

se nazývá Newton – Laplaceův vztah.

Počátkem 19. století byly provedeny pokusy, které prověřily použitelnost Newtonova – Laplaceova vztahu pro plyny. Výsledky byly uspokojivé.

V roce 1863 Gladstone a Dale prokázali, že při ohřívání kapalin nezůstává hodnota Newtonovy – Laplaceovy specifické refrakce zcela konstantní. Naměřeným údajům mnohem lépe odpovídal Gladstoneův – Daleův vztah

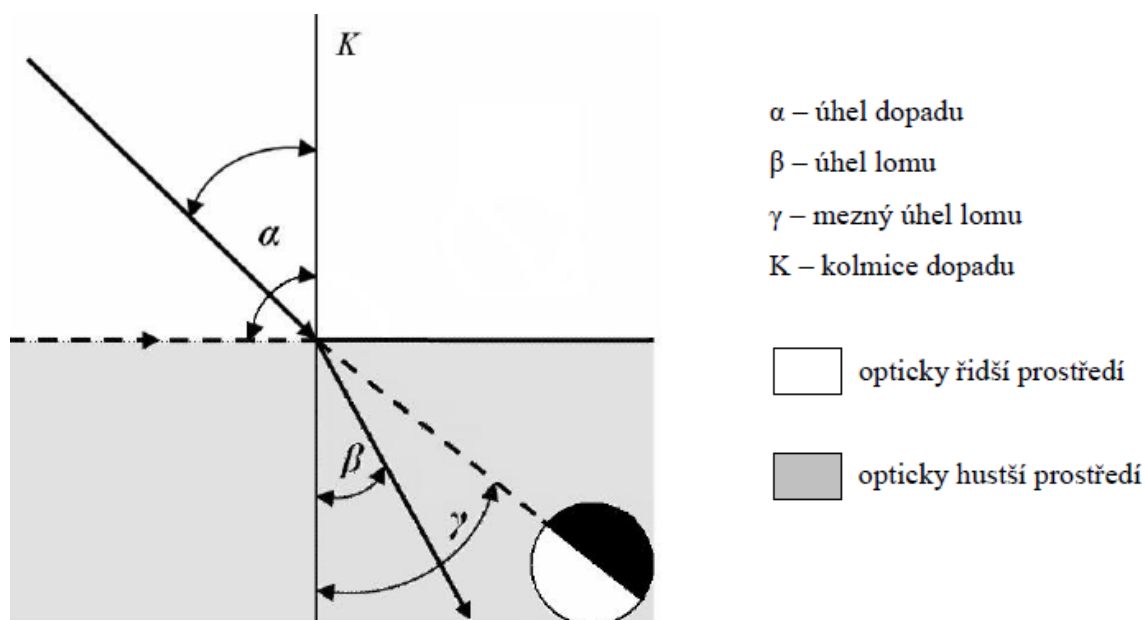
$$R_s = \frac{n-1}{\rho} \quad (1.9)$$

V roce 1880 G.A. Lorentz a o něco dříve L. Lorenz dospěli nezávisle na sobě k závěru, že funkce  $f(n)$  lze přepsat přesněji vztahem  $= n_2 - 1 / n_2 + 2$ , odtud Lorentzův – Lorenzův vztah

$$R_s = \frac{n^2-1}{n^2+2} \frac{1}{\rho} \quad (1.10).^5$$

## 2.1.4 Princip metody měření indexu lomu

Měření indexu lomu je založeno na určování mezního (kritického) úhlu. Paprsek, který dopadá na rozhraní dvou prostředí s indexy lomu  $n_1 < n_2$  pod úhlem  $\alpha$ , se láme pod úhlem  $\beta$ . Paprsek, který přichází rovnoběžně s rozhraním (tedy pod úhlem  $= 90^\circ$ ), se láme pod mezním úhlem  $\gamma$ . Je to největší úhel lomu, do prostoru za ním už se žádné paprsky nedostanou a toto prostředí zůstává temné.<sup>6</sup>



Obrázek 1. Lom světla na rozhraní dvou prostředí<sup>8</sup>

### 2.1.5 Využití v klinické biochemii

Převážně se využívají refraktometry Abbeova typu, díky jednoduché konstrukci bez pohyblivých a elektrických součástí. Používají se ke stanovení koncentrace celkového proteinu v séru. Ke stanovení je potřeba cca 50 µl séra. Měření vychází z předpokladu, že koncentrace elektrolytů a malých organických molekul v séru je u pacientů stálá a jejich vliv na index lomu je zanedbatelný vzhledem k nesrovnatelně větší hmotnosti sérových proteinů. Kalibrace refraktometrů je na standardní sérum a koncentrace proteinu lze odečíst přímo ze stupnice. U některých sér (hyperglykemické, uremické, hyperbilirubinemické, hyperlipidemické, hemolytické) se může objevit pozitivní interference.

Dále jsou využívány ke stanovení specifické hustoty moče. Index lomu je přímo úměrný specifické hustotě neboli celkové hmotnosti rozpuštěných látek v moči.

Refraktometry se složitější konstrukcí mohou sloužit jako detektory u HPLC analyzátorů.<sup>3</sup>

### 2.1.6 Refraktometr Abbeova typu

Abbeho refraktometr je pro svoji všestrannou použitelnost označován jako refraktometr univerzální. Zvláštnosti jeho konstrukce jsou ve speciálním provedení měřicího hranolu, měření při bílém (denním či elektrickém) světle, zvláštní konstrukcí stupnice a použitím doplňujícího (tzv. osvětlovacího) hranolu.

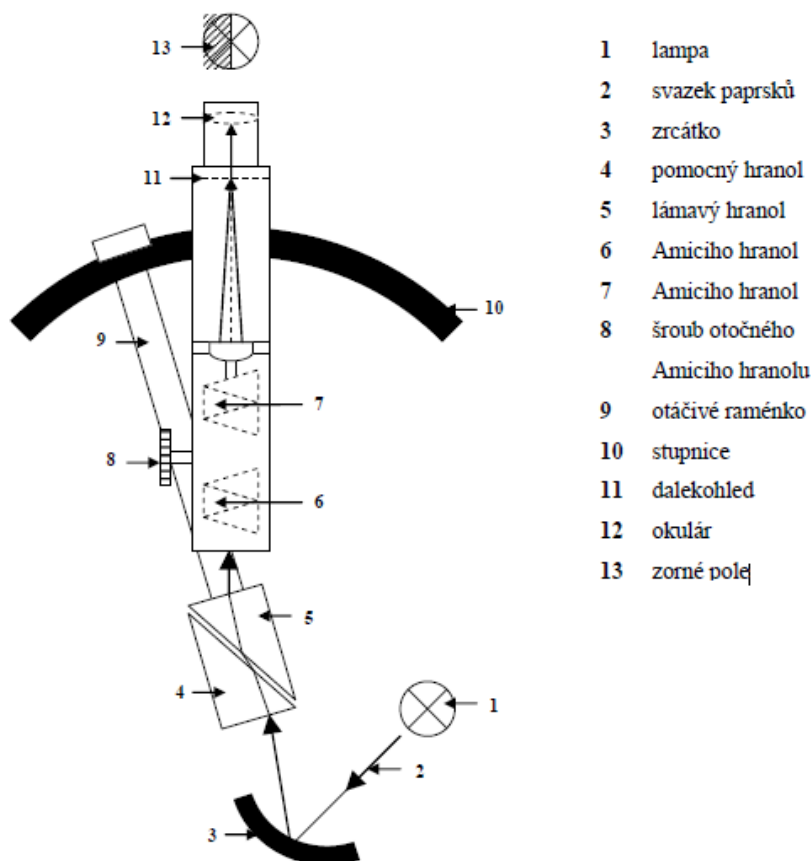
Měřicí hranol je z těžkého flintového skla. Oba hranoly jsou zabudovány v kovových pouzdrech, které mají antikorozi úpravu (vrstva niklu, zlata, palladia). V pouzdrech může cirkulovat temperovaná voda a jsou spojená kloubem; tvoří „hranolvý blok“, což je nejdůležitější část Abbeho refraktometru. „Hranolvý blok“ umožňuje svou konstrukcí přesné měření a spolehlivé termostatování i malého množství kapalin (až 0,05 ml).

Druhou zvláštností je měření při bílém světle. Při pozorování úplného odrazu v bílém světle dostaneme v důsledku disperze světla neostré duhové rozhraní místo ostrého. K odstranění toho efektu slouží kompenzátor, který je umístěn před objektivem dalekohledu. Hlavní částí kompenzátoru je Amiciho hranol, složený ze tří částí: dva krajní hranoly z korunového skla a prostřední z flintového.

Stupnice Abbeho refraktometru je dělena v hodnotách indexu lomu  $n$ . Nejsou nutné žádné výpočty, díky čemuž je měření velmi rychlé.

Měření je omezeno indexy lomu hranolů. Lze měřit indexy lomu pevných látek a kapalin. Při měření indexu lomu kapaliny nanese se kapku na vstupní plochu hranolu a přitlačíme pomocným (osvětlovacím) hranolem. Mezi plochami hranolů tak vznikne tenká vrstva kapaliny, která se chová jako destička pevné látky. Světlo z pomocného hranolu projde vrstvou kapaliny, láme se na rozhraní kapaliny a měřicího hranolu, poté na hranici měřicí hranol-vzduch a dopadá do dalekohledu. Přeponová plocha osvětlovacího hranolu se zhotovuje matová, aby hledání rozhraní nebylo rušeno zobrazováním předmětů, které se nacházejí v blízkosti zdroje světla.

Nedostatky tohoto refraktometru jsou následující: nelze použít kapaliny, které špiní nebo leptají skla hranolů, práce s těkavými kapalinami je nepohodlná, nevelká přesnost měření disperze, nutnost kontroly hodnot stupnice a kompenzátoru pro dosažení maximální přesnosti měření.<sup>5,6,8,9,17</sup>



Obrázek 2. Schéma Abbeho refraktometru<sup>8</sup>

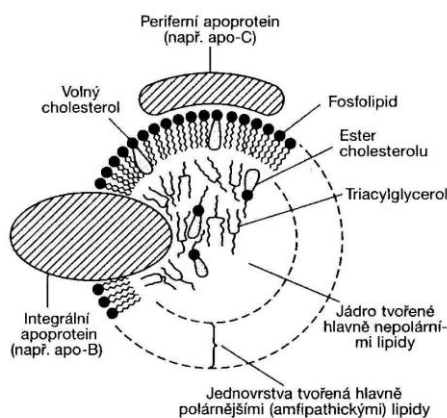
## 2.2 Lipoproteiny

### 2.2.1 Obecná charakteristika lipoproteinů

Termín lipid pochází z řeckého slova *lipos* = tuk a používá se obecně pro všechny přírodní nepolární sloučeniny. Lipidy jsou jednou ze tří hlavních složek živé hmoty (vedle bílkovin a sacharidů). Představují velmi rozmanitou skupinu látek, lišících se navzájem chemickým složením a biologickou aktivitou, které jsou pro každý živočišný druh i pro jednotlivé orgány charakteristické a lze je podle toho identifikovat. Proteiny, skládající se z aminokyselin, jsou komplexní biomolekuly, které poskytují organismu oporu, zabezpečují jeho integritu, zprostředkují transport látek krevním oběhem a jejich pohyb dovnitř a vně buňky, látkovou přeměnu a obranu těla.<sup>1-3</sup>

### 2.2.2 Lipoproteiny a jejich dělení

Lipoproteiny jsou micelární částice transportující cholesterol a triacylglyceroly v krevní plazmě. V prostoru zaujímají přibližně kulovitý tvar. Na povrchu mají monovrstvu složenou z molekul fosfolipidů a cholesterolu, uspořádaných tak, že jejich hydrofilní části jsou orientovány vně a hydrofobní dovnitř částice. Proteinová složka je známá pod názvem apolipoprotein či apoprotein (apo). Molekuly apoproteinů jsou uloženy na povrchu částice, nebo jsou do něho zanořeny a jejich hydrofilní část je orientována do vodného prostředí. Jádro částice tvoří nepolární triglyceridy a estery cholesterolu.



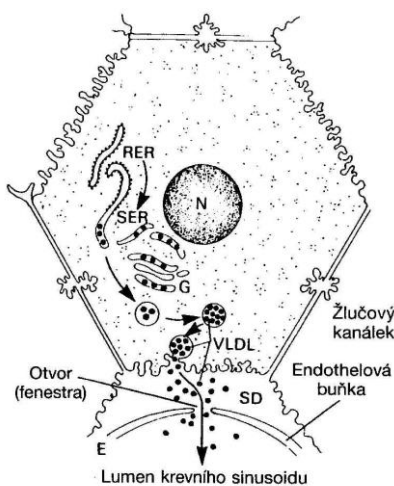
Obrázek 3. Obecná struktura plasmatického lipoproteinu<sup>2</sup>

Z praktických důvodů se používají názvy charakterizující lipoproteinové částice na základě jejich hustoty, podle níž jsou izolovány ultracentrifugací v hustotním gradientu na lipoproteiny:

- o vysoké hustotě (high density lipoproteins HDL)
- o nízké hustotě (low density lipoproteins LDL)
- o střední hustotě (intermediate density lipoproteins IDL)
- o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins VLDL).<sup>2</sup>

### Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)

Jsou to transportní prostředky triacylglycerolů z jater do mimojaterních tkání. Většina plasmatických VLDL má jaterní původ (parenchymové buňky). Obsahují hydrofobní jádro složené převážně z triacylglycerolů a na jejich povrchu je fosfolipidová obálka, ve které jsou zakotveny proteiny Apo B-100, Apo E a všechny subtypy Apo C.



Obrázek 4. Tvorba a sekrece VLDL jaterními buňkami<sup>4</sup>

N – jádro, RER – drsné endoplasmatické retikulum, SER – hladké endoplasmatické retikulum, G – Golgiho aparát, SD – Disseův prostor obsahující krevní plasmu, E – endotel

Apolipoprotein B se syntetizuje na ribozomech drsného endoplasmatického retikula (RER) a zabudovává se do lipoproteinů v hladkém endoplasmatickém retikulu (SER), které je hlavním místem syntézy triacylglycerolu.

Lipoproteiny prochází Golgiho aparátem (G), kde probíhá vazba sacharidových zbytků na lipoproteiny. VLDL se uvolní z jaterní buňky fúzí sekreční vakuoly s buněčnou membránou do Disseova prostoru a poté do jaterních sinusoidů.<sup>3,4</sup>



### 2.2.3 Stanovení lipidů v tělních tekutinách

Pro získání spolehlivých výsledků pro zhodnocení stavu lipidového metabolismu je třeba nezanedbat důležité faktory jako příprava pacienta a odběr vzorků. Pro dosažení optimálních výsledků by pacient měl být nejméně 3 týdny na obvyklé dietě, kdy by nemělo docházet k velkým změnám hmotnosti. Před odběrem by měl naposledy konzumovat jídlo maximálně 12 hodin, alkohol by neměl konzumovat dva dny (zvyšuje hladinu triacylglycerolů). Také některé léky (antikoncepce, antihypertensiva) a vitaminy mohou ovlivňovat hodnoty lipidů. Existuje celá řada preanalytických faktorů, které mohou významně ovlivnit výsledek, proto by se neměl dělat definitivní závěr o lipidovém metabolismu na základě jednoho výsledku. Především u hraničních hodnot by se testy měly opakovat s odstupem 2 - 4 týdnů.<sup>3</sup>

#### Triacylglyceroly (TAG)

Pro všechna stanovení TAG enzymovou metodou jsou společné první dvě reakce. Nejdříve se provede hydrolýza TAG působením lipasy s přidavkem proteolytického enzymu. Následuje fosforylace glycerolu katalyzovaná glycerolkinasou.

V metodě podle Bucola a Davida ADP z glycerolkinasové reakce pokračuje do pyruvátkinasové reakce, kde s fosfoenolpyruvátém (v nadbytku) vzniká pyruvát a ATP. Pyruvát se dále stanovuje v laktátdehydrogenasové reakci jako úbytek NADH spektrofotometricky při 340 nm.

Jiné metody jsou založeny na stanovení glycerol-3-fosfátu. Ten reaguje s  $\text{NAD}^+$  za vzniku  $\text{NADH} + \text{H}^+$  a vznik NADH je spektrofotometricky stanoven při 340 nm. Jiná metoda využívá reakce s  $\text{O}_2$  za vzniku peroxidu vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který je stanoven peroxidasovou reakcí s 4-chlorfenolem a 4-aminofenazonem za vzniku červeného barevného produktu, který je stanoven spektrofotometricky při 550 nm.<sup>3</sup>

## Cholesterol

Při analýze celkového cholesterolu je třeba brát v úvahu, že cholesterol se nachází ve dvou formách. Jedna třetina je ve formě volného sterolu a dvě třetiny ve formě esterů cholesterolu. Při kolorimetrických reakcích dávají estery intenzivnější zabarvení.

Chemické metody stanovení cholesterolu jsou z hlediska nákladů levné, ale nejsou příliš přesné a specifické, a využívají nebezpečné reagentie (silné kyseliny). Nejjednodušší je přímá a jednokroková metoda podle Liebermanna-Burchardta. Estery i volný cholesterol jsou dehydratovány a oxidovány směsí kyseliny sírové a acetanhydridu za vzniku zeleně zbarvené kyseliny cholestahexaensulfonové, která má absorpční maximum při 440 nm. Falešně zvýšené hodnoty mohou způsobit hemoglobin a bilirubin, které v této oblasti silně absorbují.

Enzymatické metody jsou spolehlivější, přesnější, bezpečnější a dražší. Společným principem je počáteční hydrolýza esterů cholesterolu na cholesterol a mastné kyseliny za účasti enzymu cholesterolesterázy. Následuje cholesterol-oxidásová reakce s  $O_2$  za vzniku cholest-4-en-3-on a  $H_2O_2$ , který je substrátem indikátorové peroxidásové reakce, při které se mění indikátor z redukované do oxidované formy.

Pro stanovení volného a esterifikovaného cholesterolu můžeme použít oba metodické přístupy. Volný cholesterol je extrahován 2-propanolem, precipitován digitoninem a stanoven. Esterifikovaný cholesterol se pak vypočte odečtením volného cholesterolu od celkového cholesterolu.

Stanovení HDL-cholesterolu (HDL-C) využívá rychlé precipitační metody. Precipitace probíhá v přítomnosti směsi kyseliny fosfowolframové s hořečnatou solí, vysráží se lipoproteinové frakce VLDL a LDL, v supernatantu zůstane pouze frakce HDL, kde se stanoví cholesterol běžným způsobem.

Obsah LDL-cholesterolu je možné vypočítat podle empirického vzorce dle Friedewalda:

$$\text{LDL-C (mmol/l)} = \text{TC (mmol/l)} - \text{HDL-C} - \text{TAG (mmol/l)/2,2.}^3$$

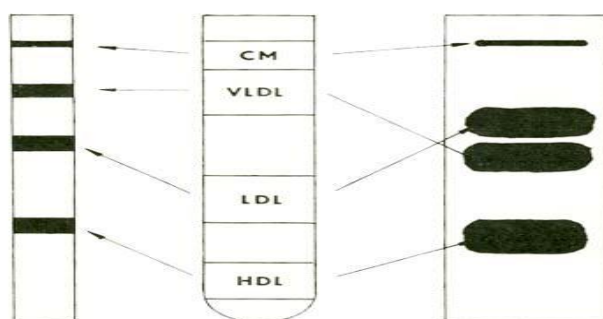
## 2.2.4 Separace lipoproteinů

Lipoproteinové komplexy lze dělit elektroforeticky na principu jejich rozdílného elektrického náboje. Detekce je specifická pro lipidy, nejčastěji se používá barvivo Oil Red 7B. HDL má největší pohyblivost a je nazýván  $\alpha$ -lipoprotein, LDL je  $\beta$ -lipoprotein a VLDL je pre- $\beta$ -lipoprotein nebo  $\alpha_2$ -lipoprotein.

Další separační metodou je ultracentrifugace, kdy v gravitačním poli ultracentrifugy jednotlivé lipoproteinové třídy sedimentují nebo flotují v závislosti na hustotě prostředí. Jejich chování je charakterizováno tzv. Swedbergovou flotační konstantou  $S_f$ . Obecně tato konstanta roste s relativní molekulovou hmotností  $M_r$ . Lipoproteiny jsou vzhledem k tomuto pravidlu výjimkou, jejich lipidová složka je lehčí než voda a hodnota  $S_f$  je menší, než by se očekávalo podle jejich  $M_r$ . Centrifugací v roztoku NaCl o různé hustotě (1,006 – 1,21g/ml) je možné lipoproteiny rozdělit na jednotlivé frakce, jak ukazuje tabulka 1.<sup>3,14</sup>

Tab. 2.1: Přehled dělení lipoproteinů ultracentrifugou<sup>14</sup>

Hustota prostředí [g/ml]	Flotuje	Sedimentuje	Rychlost flotace ( $S_f$ )
1,006	VLDL	LDL, HDL, VHDL	20-400 (VLDL)
1,063	VLDL, LDL	HDL, VHDL	0-20 (LDL)
1,210	VLDL, LDL, HDL	VHDL	-



elektroforéza      ultracentrifugace      elektroforéza na agarose  
na polyakrylamidu

Obrázek 5. Srovnání elektroforetické mobility lipoproteinů na polyakrylamidovém gelu a na agaróze s dělením ultracentrifugou<sup>14</sup>

## **Separace lipoproteinů gelovou filtrací**

Pro detailnější diagnostiku i základní výzkum má význam stanovení velikosti částic jednotlivých lipoproteinů. K tomuto účelu lze využít buď elektroforesu na gradientu akrylamidu, která je velmi pracná i časově náročná, anebo gelovou filtrací. Gelová filtrace (angl. synonyma gel permeation chromatography, GPC, size-exclusion chromatography, SEC, nebo molecular sieve chromatography, MSC) je separační technika, kterou jsou separovány látky podle velikosti a tvaru molekul a velikosti a tvaru pórů stacionární fáze. Jako stacionární fáze slouží silikagel nebo methakrylátové pryskyřice s definovanou velikostí pórů, případně i Sepharosa, jako mobilní fáze slouží obvykle fyziologický roztok pufrovaný fosfátem. Velké molekuly se nedostanou do pórů a jsou eluovány první v pořadí; menší molekuly, které vstoupí do pórů, jsou v nich zadržovány podle své velikosti. Separační rozmezí kolony je určeno velikostmi separovatelných molekul, a platí pro ně lineární závislost logaritmu molekulové váhy (velikosti molekuly či částice) na elučním objemu (čase). K detekci se využívá buď charakteristická vlnová délka pro bílkoviny v UV oblasti (280 nm) nebo post-kolonová reakcecholesterolu či triacylglycerolů na barevné sloučeniny a jejich detekce ve viditelné oblasti (550 nm, event. 340 nm).

Vzhledem k velkým rozdílům v obsahu lipidů a bílkovin v jednotlivých lipoproteinových třídách nejsou výše popsané metody detekce příliš výhodné (např. ve velkém objemu hmoty VLDL je jen velmi málo proteinu detekovatelného při 280 nm). V posledních letech byl vyvinut speciální detektor, který je pro tento účel nejvhodnější, tzv. Laser Light Scattering Detector (LLSD), který měří rozptyl laserového paprsku na molekulách, ev. částicích v roztoku. Velikost částic lze určit na základě kalibrace kolony. Jelikož jsou standardy velikosti částic pro lipoproteiny nedostupné, je třeba tuto kalibraci provést na vlastních separovaných frakcích, jejichž velikost byla stanovena pomocí elektronového mikroskopu.<sup>10-13</sup>

### **3. Cíl práce**

Cílem této práce je získání závislosti indexu lomu na koncentraci neboli změnu indexu lomu na změně koncentrace  $dn/dc$  různých vzorků lipoproteinové frakce VLDL. Za tímto účelem je třeba změřit indexy lomu vhodně naředěných vzorků a také vysušení známého objemu vzorku pro získání hodnoty koncentrace. Dále je třeba vyhodnotit výsledky a určit požadovanou kalibrační závislost, která je nezbytná pro další práci.

## **4. Experimentální část**

### **4.1 Přístroje**

Laboratorní úprava vody Direct Q 3 UV, Millipore, Praha, Česká republika

Ultracentrifuga Optima L-100 XP, Beckman Coulter s.r.o, Praha, Česká republika

Analytické váhy Sartorius Analytic AC 120 S, Goettingen, Německo

Koncentrátor vzorků Thermovap TV10+, Ecom, Praha, Česká republika

Abbeův refraktometr, Krüs, Hamburg, Německo

Vodní termostat Haake 5, Haake DC 10, Thermo electron corporation, Waltham, USA

### **4.2 Použité roztoky**

Ultračistá voda 18,2 M $\Omega$ .cm

Hustotní roztok NaCl  $\rho = 1,0062$  g/ml

Vzorky VLDL po stočení na ultracentrifuze byly uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C

### 4.3 Práce se vzorky

Do zkumavek objemu 8 ml, obsahujících EDTA jako antikoagulans, byly odebrány vzorky krve od 5 dobrovolných dárců. Plasma byla separována centrifugací (10 min, 3000 rpm). Do ultracentrifugační zkumavky bylo odpipetováno 1,5 ml hustotního roztoku NaCl ( $\rho = 1,0062 \text{ g/ml}$ ) a 3 ml plasmy. Ultracentrifugace probíhá 20 hod při 38 000 ot/min a 10 °C. Po stažení se odebere 1,5 ml supernatantu (vzorek ke stanovení VLDL). Obsah vzorku, který zůstane v ultracentrifugační zkumavce, se může dále použít k získání frakce LDL.

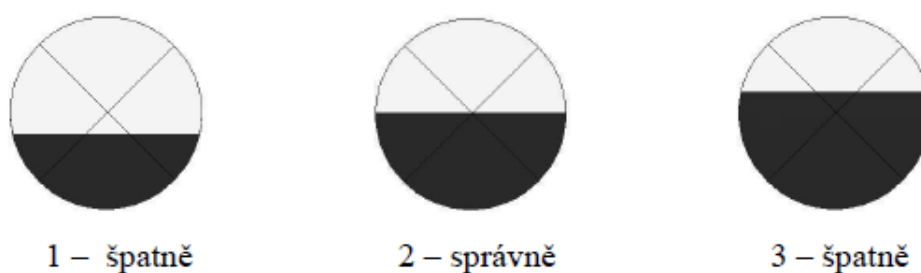
V odebrané frakci VLDL byl stanoven celkový cholesterol, TAG a celkové bílkoviny rutinními biochemickými metodami.

Vzorek se použije k měření indexu lomu na Abbeho refraktometru, jak neředěný (100%), tak ředěný hustotním roztokem NaCl na požadovanou koncentraci.

### 4.4 Měření indexu lomu na Abbeho refraktometru

K Abbeho refraktometru se připojí vodní termostat, aby se zajistila konstantní teplota 25 °C.

Na měřicí hranol refraktometru se nanese 50  $\mu\text{l}$  vzorku, přiklopí se pomocný hranol. V pravém okuláru dalekohledu se nastaví světelné rozhraní na nitkovitém kříži dle obrázku.



Obrázek 6. Světelné rozhraní na nitkovitém kříži<sup>8</sup>

V levém okuláru se odečte hodnota indexu lomu a zaznamená. Pomocný i měřicí hranol se omyje roztokem mýdla a poté destilovanou vodou. Přístroj je připraven pro další vzorek.

## 5. Výsledky a diskuze

Stanovení molekulové hmotnosti pomocí detektoru rozptylu světla je založeno na rovnici:

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \left[ 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2(\theta/2) + \dots \right] + 2A_2c$$

$R(\theta)$  je intenzita světla rozptýleného pod úhlem  $\theta$ ,  $K^*$  je optický parametr, který vyjadřuje rovnice:

$$K^* = [4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2] / (\lambda_0^4 N_A)$$

V této rovnici je  $n$  index lomu,  $c$  koncentrace v mg/ml,  $\lambda_0$  vlnová délka světla ve vakuu,  $N_A$  Avogadrova konstanta. V původní rovnici je dále  $M$  vážený průměr molekulové hmotnosti,  $r_g$  poloměr rotace,  $A_2$  druhý viriální koeficient (při nízkých koncentracích, obvyklých u kolonové chromatografie, je tato veličina zanedbatelná).<sup>18</sup>

Pro aplikaci detektoru rozptylu je nutné znát závislosti  $n$  na koncentraci.

### Měření indexu lomu frakce VLDL

Tab. 5.1: Přehled indexů lomu různých látek, které jsme proměřili

Měřená látka	Index lomu
destilovaná voda	1,3318
fyziologický roztok NaCl ( $\rho = 1,0062$ g/ml)	1,3320
ředěný vzorek 1:1	1,3340



Měření závislosti  $n$  jako funkce  $c$  pro následující vzorky:

B... žena 37 let

T... žena 66 let

J... muž 30 let

S... žena 22 let

K... žena 22 let

B+J... směs frakce VLDL vzorku B a J

Veškerá měření byla prováděna při konstantní teplotě 25 °C.

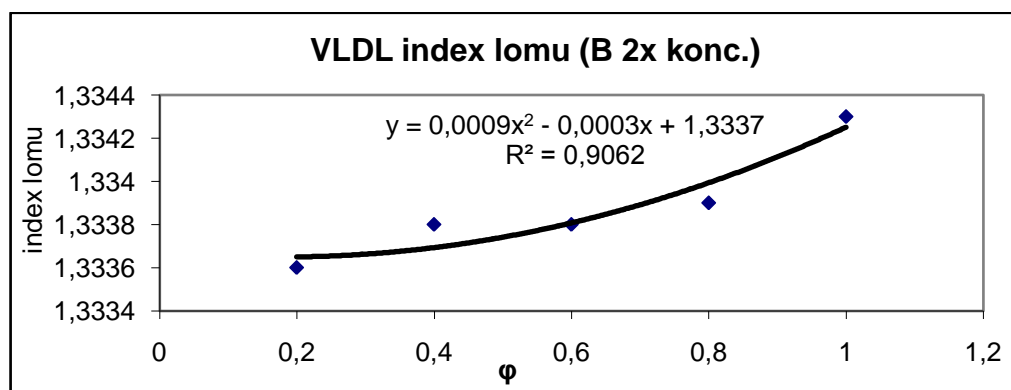
Frakce VLDL získaná ultracentrifugací byla naředěna na požadovanou koncentraci, výsledný objem byl vždy 200  $\mu$ l a byl proměřen index lomu.

Obsah VLDL v původních vzorcích byl stanoven gravimetricky vysušením známého objemu vzorku.

Tab. 5.2: Indexy lomu vzorku B (2x koncentrovanější)

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3342	1,3343	1,3344	1,3343	$0,8 \cdot 10^{-4}$
0,8	1,3339	1,3338	1,3341	1,3339	$12 \cdot 10^{-4}$
0,6	1,3338	1,3339	1,3338	1,3338	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,4	1,3340	1,3338	1,3337	1,3338	$12 \cdot 10^{-4}$
0,2	1,3336	1,3336	1,3337	1,3336	$0,5 \cdot 10^{-4}$

Obrázek 5.1: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci

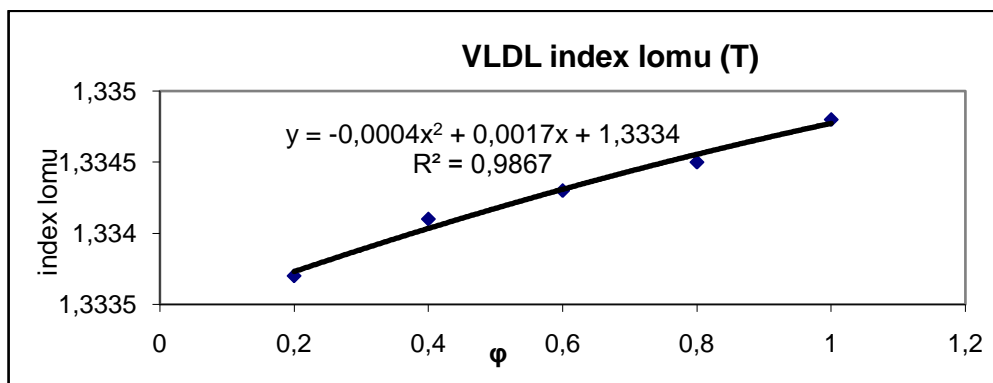


$\varphi = 1$  odpovídá 16,2 mg/ml

Tab. 5.3: Indexy lomu vzorku T

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3348	1,3349	1,3347	1,3348	$0,8 \cdot 10^{-4}$
0,8	1,3345	1,3344	1,3346	1,3345	$0,8 \cdot 10^{-4}$
0,6	1,3343	1,3342	1,3345	1,3343	$12,10^{-4}$
0,4	1,3340	1,3343	1,3341	1,3341	$12,10^{-4}$
0,2	1,3338	1,3337	1,3335	1,3337	$12,10^{-4}$

Obrázek 5.2: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci

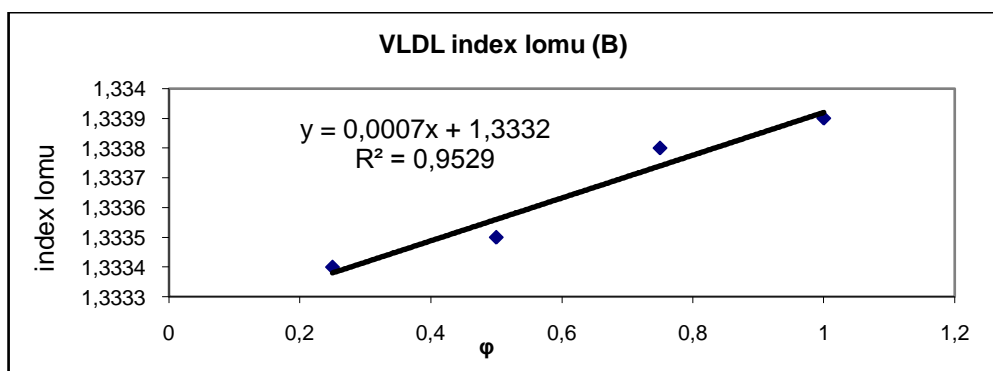


$\varphi = 1$  odpovídá 18,4 mg/ml, biochemické parametry: TC = 0,79; TAG = 1,53; CB = 0,1 [g/l]

Tab. 5.4: Indexy lomu vzorku B

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3338	1,3339	1,3339	1,3339	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,75	1,3338	1,3339	1,3338	1,3338	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,5	1,3335	1,3335	1,3336	1,3335	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,25	1,3334	1,3334	1,3333	1,3334	$0,5 \cdot 10^{-4}$

Obrázek 5.3: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci

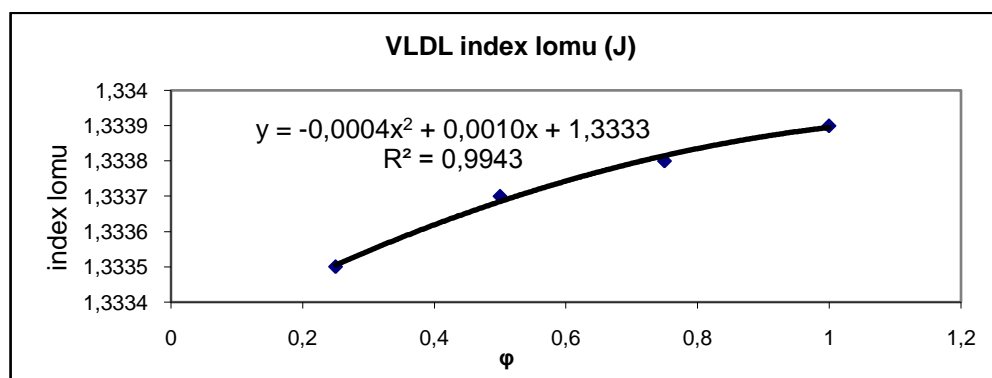


$\varphi = 1$  odpovídá 13,4 mg/ml

Tab. 5.5: Indexy lomu vzorku J

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3339	1,3340	1,3339	1,3339	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,75	1,3339	1,3338	1,3339	1,3338	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,5	1,3337	1,3337	1,3338	1,3337	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,25	1,3333	1,3334	1,3334	1,3335	$0,5 \cdot 10^{-4}$

Obrázek 5.4: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci

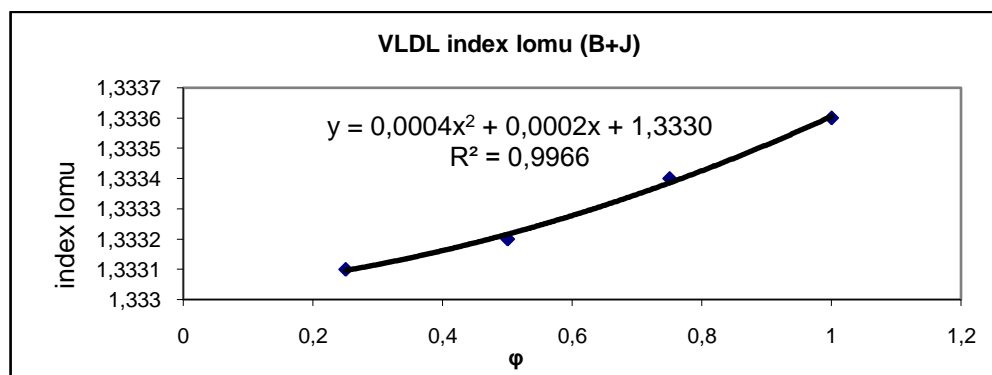


$\varphi = 1$  odpovídá 13,2 mg/ml

Tab. 5.6: Indexy lomu vzorku B+J

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3336	1,3337	1,3336	1,3336	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,75	1,3334	1,3335	1,3335	1,3334	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,5	1,3332	1,3333	1,3332	1,3332	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,25	1,3331	1,3330	1,3331	1,3331	$0,5 \cdot 10^{-4}$

Obrázek 5.5: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci

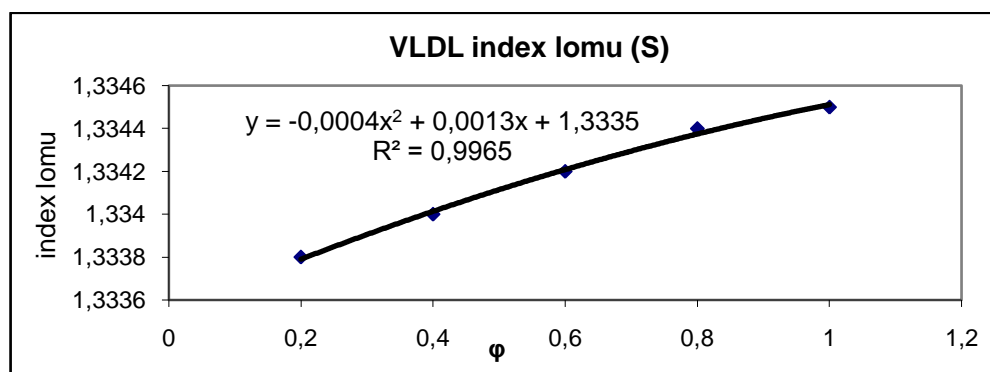


$\varphi = 1$  odpovídá 11,7 mg/ml

Tab. 5.7: Indexy lomu vzorku S

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3345	1,3346	1,3345	1,3345	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,8	1,3345	1,3344	1,3342	1,3344	$12 \cdot 10^{-4}$
0,6	1,3342	1,3342	1,3342	1,3342	0
0,4	1,3340	1,3340	1,3339	1,3340	$0,5 \cdot 10^{-4}$
0,2	1,3339	1,3338	1,3338	1,3338	$0,5 \cdot 10^{-4}$

Obrázek 5.6: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci

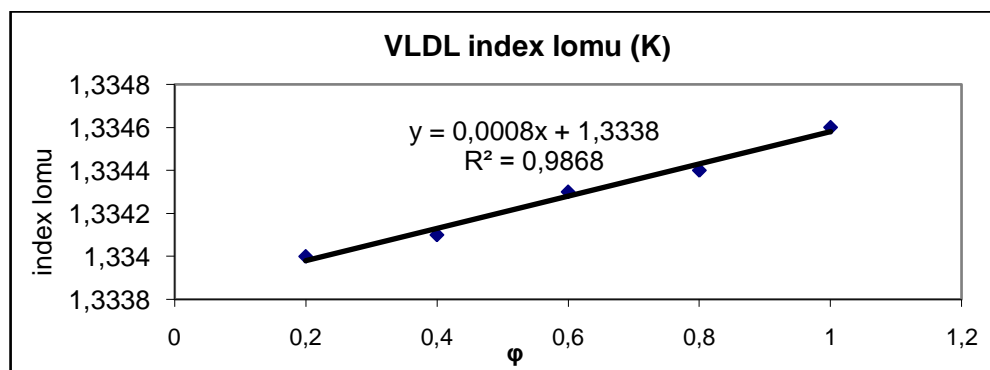


$\varphi = 1$  odpovídá 15,6 mg/ml, biochemické parametry: TC = 0,21; TAG = 0,61; CB = 0,02 [g/l]

Tab. 5.8: Indexy lomu vzorku K

$\varphi$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\bar{n}$	SD
1	1,3345	1,3346	1,3348	1,3346	$13 \cdot 10^{-4}$
0,8	1,3344	1,3343	1,3346	1,3344	$13 \cdot 10^{-4}$
0,6	1,3343	1,3343	1,3343	1,3343	$13 \cdot 10^{-4}$
0,4	1,3340	1,3341	1,3343	1,3341	$13 \cdot 10^{-4}$
0,2	1,3341	1,3340	1,3340	1,3340	$13 \cdot 10^{-4}$

Obrázek 5.7: Graf závislosti indexu lomu ( $\bar{n}$ ) na koncentraci



$\varphi = 1$  odpovídá 17,6 mg/ml, biochemické parametry: TC = 0,89; TAG = 2,54 CB = 0,06 [g/l]

Tab. 5.9: Hodnoty spolehlivosti R podle typu a trendu regrese

Typ trendu a regrese	B (2xkonc.)	T	B	J	B+J	S	K
exponenciální	0,8396	0,9825	0,9529	0,9657	0,9797	0,9878	0,9868
lineární	0,8396	0,9826	0,9529	0,9657	0,9797	0,9878	0,9868
logaritmický	0,7252	0,9715	0,9005	0,9978	0,8887	0,9708	0,9088
polynomický	0,9062	0,9867	0,9529	0,9943	0,9966	0,9965	0,99
mocniný	0,7253	0,9715	0,9005	0,9978	0,8887	0,9708	0,9089

Z tabulky 5.9 je patrné, že závislosti indexu lomu na koncentraci nejlépe vyhovuje funkce polynomická, která bude využita pro výpočty.

## **6. Závěr**

U sedmi různých vzorků lidské krevní plasmy byly ultracentrifugací separovány lipoproteiny VLDL. Celková hmotnost byla stanovena gravimetricky.

Refraktometricky byla u sledovaných vzorků stanovena závislost indexu lomu na koncentraci lipoproteinu, které nejlépe vyhovovala polynomická funkce.

Souvislost s chemickým složením lipoproteinu, především s obsahem hlavní lipidové složky – triacylglycerolů - bude třeba určit na základě studia většího počtu vzorků.

## 7. Literatura

- <sup>1</sup> Kolektiv autorů: Biochemie základní kurz, Praha, Karolinum 2005
- <sup>2</sup> E. Tvrzická: Chromatografické metody v analýze lipidů v Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek, VŠCHT, Praha 2006 95-105
- <sup>3</sup> F. Novák: Úvod do klinické biochemie, Praha, Karolinum 2002
- <sup>4</sup> R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell: Harperova biochemie, Jinočany, Nakladatelství H+H, 2002
- <sup>5</sup> B. Ioffe: Refraktometrické metody v chemii, Praha, Nakladatelství technické literatury 1983
- <sup>6</sup> I. Němcová, L. Čermáková, P. Rychlovský: Spektrometrické analytické metody I., Praha, Karolinum 2004
- <sup>7</sup> J. Hošek: Využití optických metod pro měření vlastností tekutin, České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní  
[http://www.cvut.cz/pracoviste/odbor-rozvoje/stranky/habilitace-a-inaugurace/habilitacni-prednasky/tekutiny\\_hab\\_prednaska.pdf](http://www.cvut.cz/pracoviste/odbor-rozvoje/stranky/habilitace-a-inaugurace/habilitacni-prednasky/tekutiny_hab_prednaska.pdf)
- <sup>8</sup> Daniel Urbánek: Optické metody se zaměřením na refraktometrii a polarimetrii a jejich využití v chemické analýze. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta, katedra chemie, Brno 2008  
[http://is.muni.cz/th/185725/pedf\\_b/BP.pdf](http://is.muni.cz/th/185725/pedf_b/BP.pdf)
- <sup>9</sup> V. Bouška, P. Kašpar: Speciální optické metody, Praha, Academica 1983
- <sup>10</sup> R. M. Krauss, D. J. Burke: Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans, *Journal Lipid Research*. 23, 1982, 97-104
- <sup>11</sup> R. M. Carroll, L. L. Rudel: Lipoprotein separation and low density lipoprotein molecular weight determination using high performance gel-filtration chromatography, *Journal Lipid Research* 24, 1983, 200-207
- <sup>12</sup> S. Usui, Y. Hara, S. Hosaki, M. Okazaki: A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC, *Journal Lipid Research* 43, 2002, 805-814
- <sup>13</sup> Y. Hirowatari, H. Yoshida, H. Kurosawam, K. Doumitu, N. Tada: Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent, *Journal Lipid Research* 44, 2003, 1404-1412
- <sup>14</sup> J. Skořepa a spolupracovníci: Lipidy a riziko koronární aterosklerózy, Praha, Univerzita Karlova 1980

<sup>15</sup> I. Jančářová, L. Jančář: Analytická chemie, Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2003

<sup>16</sup> J. Zíka a kolektiv: Analytická příručka, SNTL Praha, 1966

<sup>17</sup> V. Kalous a kolektiv: Metody chemického výzkumu, SNTL, Praha, 1987

<sup>18</sup> J. Wen, T. Arakawa, J. S. Philo: Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions, Analytical Biochemistry 240, 1996, 155-166



## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala své školitelce prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, ochotu a cenné připomínky k mojí bakalářské práci.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Evě Tvrzické, CSc. za odborné vedení v experimentální části a příjemnou spolupráci.

V neposlední řadě také děkuji těm, kteří poskytli vzorky.