



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Zakład Farmakodynamiki

Ewa Bartosińska

**Opracowanie bioanalitycznych metod oznaczania tokochromanoli
w tkance tłuszczowej pochodzącej z gruczołu piersiowego kobiet**

Promotor pracy: dr hab. Danuta Siluk

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Antoni Nasal

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Michał Jan Markuszewski

Gdańsk, 2018

STRESZCZENIE

Związki występujące pod wspólną nazwą „witaminy E”, czyli tokoferole i tokotrienole, od kilkunastu lat stanowią przedmiot intensywnej pracy badawczej naukowców z dziedziny biochemii, botaniki, chemii, nauk o żywności, czy medycyny. Zainteresowanie tymi związkami wynika zarówno z potencjału antyoksydacyjnego tokochromanoli, jak i z istnienia przesłanek świadczących o istotnej roli tej witaminy w zachowaniu homeostazy organizmu poprzez udział w mechanizmach innych niż działanie przeciwutleniające. Podczas gdy metody oznaczania pochodnych witaminy E, czyli tokochromanoli, w pożywieniu i materiale roślinnym zostały szeroko opisane w literaturze, analiza ilościowa w tkankach pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego wymaga wielu badań i dalszego rozwoju.

Mając na uwadze doniesienia dotyczące potencjalnego działania przeciwnowotworowego niektórych tokochromanoli, szczególnie przeciwko rakowi piersi, w niniejszej rozprawie doktorskiej materiałem badanym stała się tkanka tłuszczowa pochodząca z piersi. Tkanka tłuszczowa, będąca długoterminowym magazynem wszelkiego rodzaju związków o charakterze lipofilowym, stanowiła tutaj potencjalnie odpowiedni materiał biologiczny do badań porównawczych pomiędzy grupami pacjentek obciążonych nowotworem piersi, kobiet zdrowych oraz kobiet zmarłych w wyniku wypadków. Surowica bądź osocze krwi wykorzystane w tego rodzaju badaniach odzwierciedlają jedynie aktualne stężenie witaminy w organizmie, w dużej mierze zależne od diety pacjentki.

W niniejszej pracy najwięcej uwagi poświęcono stworzeniu czułej i szybkiej metody analitycznej służącej jednoczesnemu oznaczeniu ośmiu naturalnych pochodnych witaminy E w materiale biologicznym. Aby osiągnąć ten cel, konieczne było opracowanie metody ekstrakcji oraz homogenizacji tkanki tłuszczowej w celu izolacji analitów. Następnie zwalidowano metodę ilościowego oznaczania tokotrienoli w tkance tłuszczowej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol. Podczas wykonywania tej części projektu zaobserwowano problematyczną powtarzalność – przede wszystkim tokoferoli – w odniesieniu do zachowania się w źródle jonów APCI, co stało się inspiracją do rozszerzenia badań nad jonizacją chemiczną tych związków pod ciśnieniem atmosferycznym. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wysnuto wniosek, iż w celu osiągnięcia zamierzonego celu, tj. oznaczenia wszystkich ośmiu tokochromanoli

w tkance tłuszczowej, konieczne jest zastosowanie innego rodzaju detektora. Odpowiednim wyborem okazał się detektor fluorescencyjny, dzięki czemu została osiągnięta zadowalająca czułość oznaczeń dla wszystkich ośmiu związków. Metoda RP-HPLC-FLD została zwalidowana oraz zastosowana do oszacowania stężeń tych związków w 99 próbkach tkanki tłuszczowej pochodzących od pacjentek Oddziału Chirurgii Onkologicznej, pacjentek Kliniki Chirurgii Plastycznej oraz kobiet poddawanych sekcji zwłok w Zakładzie Medycyny Sądowej. Zaproponowane podejście analityczne może w przyszłości posłużyć weryfikacji hipotezy dotyczącej wpływu ochronnego pochodnych witaminy E przeciwko rozwojowi nowotworu piersi.

ABSTRACT

„Vitamin E” homologues, namely tocopherols and tocotrienols, have been under thorough scientific investigation in biochemistry, botany, chemistry, food sciences and medicine for several years. Not only they exert potent antioxidant properties but tocochromanols are also suggested to be involved in other homeostatic mechanisms. Since the quantification of vitamin E congeners in foods and plant material is extensively described in the literature, determination of these constituents in human or animal tissues still requires further research studies and improvement.

Considering the literature reports about potential anticancer properties of some tocochromanols, especially against breast cancer, biological matrix used in this project was breast adipose tissue. As adipose tissue can represent a long-term storage of lipophilic compounds in human organism, it was perceived as suitable biological material for comparative studies between women with breast cancer, healthy volunteers and women deceased by accidents. Blood serum or plasma reflects mainly the actual concentration of vitamin E in humans which is strongly related to dietary habits.

In present work, the aim was to develop a fast and sensitive analytical method for simultaneous determination of eight naturally occurring tocochromanols in the biological material. In order to achieve this goal, it was inevitable to devise methods for homogenization and extraction of target analytes from breast adipose tissue. Afterwards, the method for quantitative determination of four tocotrienols in human breast adipose tissue with the use of high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry utilizing triple quadrupole mass analyzer was developed. During this phase of the project, the problematic repeatability of ionization efficiency of some tocochromanols in APCI was observed and therefore more research was performed on ionization of tocol-related compounds in atmospheric pressure chemical ionization. It has been noted that for successful determination of tocopherols and tocotrienols in the biological material, another type of analytical detector has to be applied. The application of fluorescence detector enabled for quantification of eight tocochromanols with satisfactory sensitivity. The validated HPLC-FLD method for quantitative analysis of tocopherols and tocotrienols was applied in determination of these compounds in 99 breast adipose tissue samples obtained from Department of Oncological Surgery patients, women undergoing plastic surgery at the Department of Plastic Surgery and women deceased by

accidents from Department of Forensic Medicine. The proposed analytical approach can facilitate verification of hypothesis concerning the potential protective role of vitamin E against breast cancer disease.