

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**Aplikace chromatografických metod pro separaci  
metabolitů cholesterolu**

**Diplomová práce**



**Hradec Králové 2008**

**Bc. Lucie Tetřevová**

## Abstrakt

Autor: Bc. Lucie Tetřevová

Název: ***Aplikace chromatografických metod pro separaci metabolitů cholesterolu***

Jazyk: český

Diplomová práce se zabývá vypracováním a validací analytické metody pro separaci volného a esterifikovaného cholesterolu v krevním séru a v různých druzích biologického materiálu. Tato separace je potřebná vzhledem k tomu, že volný a esterifikovaný cholesterol podléhá rozdílnému metabolismu a zavedená metoda umožní studium těchto rozdílných metabolických cest pomocí stabilních izotopů. Pro separaci volného a esterifikovaného cholesterolu byla zvolena solid – phase extrakce. Metoda byla optimalizována a validována a bylo dosaženo následujících výsledků: přesnost stanovení esteru cholesterolu ve vzorcích krevního séra 2,14%, ve vzorcích homogenátu nadledvin 6,98%, přesnost stanovení volného cholesterolu v séru 2,91% a v homogenátu nadledvin 7,48%. Limit detekce byl stanoven 1  $\mu\text{mol/l}$  a limit kvantifikace 5  $\mu\text{mol/l}$ . Linearita v rozsahu koncentrací 1  $\text{mmol/l}$  – 25  $\text{mmol/l}$  byla u esterů cholesterolu s korelačním koeficientem 0,998, u volného cholesterolu 0,997. Stabilita derivátu byla testována po dobu 30 dnů za teploty 4  $^{\circ}\text{C}$  a – 25  $^{\circ}\text{C}$ , derivát byl stabilní po celou dobu testování při výše uvedených teplotách. Laboratorní teplota, vzhledem k vysoké těkavosti rozpouštědla derivátu nebyla testována. Metoda byla úspěšně aplikována ve studiích sledujících vliv cholesterolu v dietě a vliv septického šoku na syntézu cholesterolu.

## Abstract

Author: Bc. Lucie Tetřevová

Title: ***The application of chromatographic methods for separation metabolites of cholesterol***

Language: czech

The proposed diploma thesis deals with the development and validation of analytical method for free and esterified cholesterol separation from blood serum and adrenal tissue samples. This method is necessary due to the different metabolism of free and esterified cholesterol in the body and it enables the research of these particular pathways using stable isotope tracers. The solid phase extraction method was chosen, optimised and validated with following results: precision values 2.14% for serum cholesterol ester, 6.98% for tissue cholesterol esters, 2.91% for serum free cholesterol, 7.48% for tissue free cholesterol, limit of detection 1  $\mu\text{mol/l}$  and linear range 1-25  $\text{mmol/l}$  were found. The stability of the derivative was tested for 30 days at temperatures 4 °C and -25 °C. The derivative was found to be stable for the whole time period in both temperatures. Laboratory temperature was not tested due to a high volatility of the solvent used. The developed method was used in experimental studies evaluating the influence of dietary cholesterol and septic shock to cholesterol synthesis rate.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 9. 5. 2008

.....

Děkuji RNDr. Aleně Tiché Ph.D., MUDr. Radomíru Hyšplerovi Ph.D. a PharmDr. Lucii Novákové Ph.D. za odborné vedení, pomoc a rady při vypracování diplomové práce a také vedení Gerontologické a metabolické kliniky FNHK, které mi umožnilo využít laboratoře k experimentální části.

# Obsah

<b>1</b>	<b><u>SEZNAM ZKRATEK .....</u></b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b><u>ÚVOD A CÍL PRÁCE .....</u></b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b><u>TEORETICKÁ ČÁST.....</u></b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>ANALÝZA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU .....</b>	<b>13</b>
3.1.1	KREV A JEJÍ SOUČÁSTI.....	13
3.1.1.1	Odběr krve .....	13
3.1.1.1.1	Faktory krevního odběru mající vliv na výsledky analýz.....	14
3.1.1.1.2	Odběrové systémy.....	14
3.1.1.2	Krevní plazma a sérum .....	15
3.1.1.3	Transport a uchovávání vzorku.....	15
3.1.1.4	Prvotní zpracování a příprava krevního vzorku k analýze .....	16
3.1.2	OSTATNÍ BIOLOGICKÉ MATERIÁLY.....	17
3.1.3	ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ PRO BIOCHEMICKÉ STANOVENÍ .....	17
3.1.3.1	Homogenizace .....	17
<b>3.2</b>	<b>CHOLESTEROL.....</b>	<b>19</b>
3.2.1	FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	19
3.2.2	BIOLOGICKÝ VÝZNAM .....	20
3.2.3	SYNTÉZA CHOLESTEROLU .....	20
3.2.4	TRANSPORT LIPIDŮ V ORGANISMU .....	22
3.2.5	ÚLOHA LIPOPROTEINŮ V TRANSPORTU CHOLESTEROLU.....	24
3.2.6	VYLUČOVÁNÍ CHOLESTEROLU .....	26
3.2.7	ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ CHOLESTEROLU.....	26
3.2.7.1	Chemické metody .....	27
3.2.7.2	Enzymatické metody.....	27
3.2.7.3	Chromatografické metody .....	28
3.2.7.4	Jiné metody .....	28
<b>3.3</b>	<b>CHROMATOGRAFICKÉ METODY .....</b>	<b>30</b>
3.3.1	ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	30
3.3.2	TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE .....	30

3.3.2.1	Volba stacionární a mobilní fáze v TLC.....	31
3.3.2.2	Nanášení vzorků .....	32
3.3.2.3	Detekční systémy v TLC .....	32
3.3.2.4	Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu .....	33
3.3.2.5	Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu .....	33
3.3.2.6	Dělení lipidů pomocí TLC.....	34
3.3.3	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	35
3.3.3.1	Teorie plynové rozdělovací chromatografie .....	35
3.3.3.2	Instrumentace v plynové chromatografii .....	36
3.3.3.2.1	Mobilní fáze.....	36
3.3.3.2.2	Analytické kolony.....	37
3.3.3.2.3	Detektory .....	38
3.3.4	DERIVATIZACE V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII .....	40
3.3.4.1	Nejvýznamnější derivatizační reakce využívané při GC.....	40
<b>3.4</b>	<b>HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....</b>	<b>42</b>
3.4.1	PRINCIP METODY .....	42
3.4.2	INSTRUMENTACE .....	42
3.4.2.1	Iontový zdroj.....	44
3.4.2.2	Hmotnostní analyzátoři.....	47
3.4.2.2.1	Magnetický hmotnostní analyzátoři.....	47
3.4.2.2.2	Kvadrupólový analyzátoři (Quadrupole, Q) .....	47
3.4.2.2.3	Iontová past (Ion trap, IT).....	48
3.4.2.2.4	Průletový analyzátoři (Time of flight, TOF).....	48
3.4.2.3	Detektory iontů .....	48
3.4.3	HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM .....	49
<b>3.5</b>	<b>SPOJENÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ (GC-MS) 50</b>	
3.5.1	ZPŮSOBY SPOJENÍ GC-MS .....	50
3.5.2	APLIKAČNÍ OBLAST GC-MS .....	52
<b>3.6</b>	<b>EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI (SOLID PHASE EXTRACTION) .....</b>	<b>53</b>
3.6.1	ÚVOD.....	53
3.6.2	SPE PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	53
3.6.3	INSTRUMENTACE .....	54
3.6.4	SORBENTY .....	54

3.6.5	SELEKTIVITA SPE.....	59
3.6.6	POSTUP SPE .....	59
3.6.7	VYUŽITÍ SPE PRO FRAKCIONACI LIPIDŮ.....	62
<b>3.7</b>	<b>VYUŽITÍ IZOTOPICKÉHO ZNAČENÍ V METABOLICKÝCH STUDIÍCH.....</b>	<b>64</b>
<b>3.8</b>	<b>VALIDACE ANALYTICKÉ METODY.....</b>	<b>66</b>
3.8.1	PŘESNOST .....	66
3.8.2	SPRÁVNOST .....	66
3.8.3	STABILITA.....	66
3.8.4	LINEARITA .....	67
3.8.5	LIMIT DETEKCE, KVANTIFIKACE .....	67
<b>4</b>	<b><u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</u></b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>CHEMIKÁLIE.....</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>PŘÍPRAVA ROZTOKŮ .....</b>	<b>70</b>
4.3.1	STANDARDNÍ ROZTOKY .....	70
4.3.2	PRACOVNÍ ROZTOKY .....	71
<b>4.4</b>	<b>VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY .....</b>	<b>72</b>
4.4.1	ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU.....	72
4.4.1.1	Krev .....	72
4.4.1.2	Tkáně .....	72
4.4.2	POSTUP EXTRAKCE LIPIDŮ ZE VZORKU.....	72
4.4.3	POSTUP TLC.....	73
4.4.4	POSTUP SPE .....	75
4.4.5	CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY .....	76
4.4.5.1	Analýza na přístroji GC – FID.....	76
4.4.5.2	Analýza na přístroji GC – MS .....	76
<b>5</b>	<b><u>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</u></b>	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>TLC .....</b>	<b>77</b>
<b>5.2</b>	<b>SPE.....</b>	<b>78</b>
5.2.1	OPTIMALIZACE SPE METODY .....	78



<b>5.3</b>	<b>GC ANALÝZA.....</b>	<b>80</b>
<b>5.4</b>	<b>VALIDACE SPE METODY.....</b>	<b>83</b>
5.4.1	LINEARITA .....	83
5.4.1.1	Estery cholesterolu.....	83
5.4.1.2	Volný cholesterol.....	85
5.4.2	SPRÁVNOST .....	87
5.4.2.1	Sérum.....	87
5.4.2.2	Homogenát nadledvin.....	88
5.4.3	PŘESNOST .....	89
5.4.3.1	Sérum.....	89
5.4.3.2	Homogenát nadledvin.....	90
5.4.4	DETEKČNÍ A KVANTIFIKAČNÍ LIMIT.....	92
5.4.5	STABILITA.....	92
5.4.5.1	Estery cholesterolu – uchování v lednici (4 °C) .....	93
5.4.5.2	Estery cholesterolu – uchování mrazáku (-25 °C).....	94
5.4.5.3	Volný cholesterol – uchování v lednici (4 °C) .....	95
5.4.5.4	Volný cholesterol – uchování v mrazáku (-25 °C) .....	96
<b>5.5</b>	<b>VYUŽITÍ METODY V KLINICKÉM VÝZKUMU .....</b>	<b>99</b>
5.5.1	STUDIE SLEDUJÍCÍ VLIV CHOLESTEROLU V DIETĚ NA SYNTÉZU CHOLESTEROLU ...	99
5.5.2	STUDIE SLEDUJÍCÍ VLIV SEPTICKÉHO ŠOKU NA SYNTÉZU CHOLESTEROLU .....	104
<b>6</b>	<b><u>ZÁVĚR .....</u></b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</u></b>	<b>108</b>

## 1 Seznam zkratek

ACN	acetonitril
apo	apoprotein
BSTFA	N, O – bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
C	koncentrace
$c_i$	koncentrace stanovená
$c_0$	koncentrace vypočítaná
CETP	cholesterol ester transfer protein
CoA	koenzym A
DAD	detektor diodového pole
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
FD	fluorescenční detektor
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GC-MS	spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHES	cholesterol esteráza
CHO	cholesterol oxidáza
IE	isotope excess
IS	vnitřní standard
LCAT	lecitin cholesterol acyltransferáza
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MS	hmotnostní spektrometrie
$m/z$	poměr hmotnosti a náboje
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid redukovaná forma
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotid fosfát redukovaná forma
R	korelační koeficient

R <sub>F</sub>	retenční faktor
Rec	výtěžnost
RSD	relativní směrodatná odchylka
S <sub>R</sub>	směrodatná odchylka
SPE	extrakce na tuhou fázi
St	standardní vzorek
TAG	triacylglyceroly
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS-ch	trimethylsilyl cholesterol
TTR	tracer/tracee ratio
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

## 2 Úvod a cíl práce

Separáční techniky jsou využívané mimo jiné k oddělování klinicky významných sloučenin z komplexních směsí, kterými jsou biologické materiály. Významnou součástí těchto technik jsou chromatografické metody, které jsou neustále rozvíjeny a přináší mnoho nových analytických možností s širokými aplikacemi v klinickém výzkumu.

V oblasti výzkumu metabolismu lipidů si stále udržuje své místo plynová chromatografie s různými detektory, především plamenoionizačním a hmotnostním. Je to citlivá technika s velkou separační účinností. Její nevýhodou je však velmi častá nutnost derivatizace, která je prováděna s cílem vytvoření tepelně stabilních a těkavých derivátů.

Metabolismus cholesterolu je významnou kapitolou v metabolismu lipidů. Cholesterol má řadu nezastupitelných fyziologických rolí – je složkou biologických membrán, prekurzorem steroidních hormonů, žlučových kyselin, vitamínu D a v neposlední řadě je nezbytný k potravní modifikaci některých proteinů. Je však zároveň molekulou podílející se na patogenezi řady onemocnění. Jeho nadbytek má jednoznačný vztah k ateroskleróze a vzniku žlučových konkrementů. Naproti tomu i jeho relativní nedostatek je přítomen v průběhu závažných onemocnění a může přispívat k nedostatečné produkci steroidních hormonů.

Cílem diplomové práce bylo vypracovat, validovat a ověřit v klinické praxi metodu pro frakcionaci volného a esterifikovaného cholesterolu v krevním séru a v některých tkáních metodikou tenkovrstvé chromatografie a extrakce na tuhou fázi. Tato frakcionace je potřebná vzhledem k tomu, že volný a esterifikovaný cholesterol podléhá rozdílnému metabolismu. Zavedená metoda umožní studium těchto rozdílných metabolických cest pomocí stabilních izotopů s využitím metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, která již byla v laboratoři zavedena. Vypracovaná metoda bude nadále využívána pro klinické a výzkumné účely v laboratořích Gerontologické a metabolické kliniky FNHK.

## **3 Teoretická část**

### **3.1 Analýza biologického materiálu**

Základní materiály vyšetřované při biochemických analýzách jsou součástí nebo produkty lidského organismu nebo látky živočišného původu. Volba vyšetřovaných materiálů závisí na mnoha ohledech. Tam, kde je podezření na změny, event. poškození určitého orgánu nebo tkáně, nabízí se vyšetření tohoto orgánu. Protože odběr potřebné části orgánu (biopsie) bývá spojen s riziky pro vyšetřovaného, provádí se až po zvážení diagnostického přínosu ve srovnání s riziky.

Mnohem častější je vyšetřování biologických tekutin a exkrementů, jejichž získání je zpravidla snadnější a z hlediska rizik méně závažné nebo zcela nezávažné. Význam vyšetřovaných biologických tekutin vyplývá z jejich vztahu k orgánům a tkáním, jejichž stav mohou svým složením více či méně odrážet, i k organismu jako celku [1].

#### **3.1.1 Krev a její součásti**

Význam krve jako vyšetřovaného materiálu vyplývá z její úlohy v organismu. Její nejdůležitější úkoly jsou: výměna a transport látek (kyslíku, oxidu uhličitého, živin, metabolitů, hormonů, vody aj.) mezi tkáněmi, udržování stálého vnitřního prostředí, regulace teploty a ochrana organismu (imunita, systém srážení krve). V krvi se tedy velmi citlivě odráží stav organismu, a proto jsou krev i její součásti (zvláště plazma a sérum) nejčastěji vyšetřovaným materiálem při biochemických analýzách [1].

##### **3.1.1.1 Odběr krve**

Pro laboratorní diagnostiku se odebírá krev venózní, arteriální nebo kapilární. Venózní krev se získává punkcí z předloketní žíly (vena basilica, resp. vena mediana cubiti), popřípadě z jiné povrchové žíly. Arteriální krev se používá méně často (získává se punkcí stehenní tepny-artéria femoralis), většinou se místo ní používá tzv. arterializovaná kapilární krev z prstu, ušního lalůčku nebo u malých dětí z paty [1][2].

#### 3.1.1.1.1 Faktory krevního odběru mající vliv na výsledky analýz

S odběrem krve souvisí mnoho faktorů, které mohou mít vliv na výsledek biochemické analýzy. Mezi tyto faktory patří např. poloha pacienta při odběru a určitou dobu před ním. Vstoje dochází k přesunu tekutiny z intravazálního prostoru do intersticia a koncentrace vysokomolekulárních látek v krvi včetně hematokritu může stoupnout o 10 – 15%. Doporučuje se tedy odběr vleže [3].

Vzhledem k cirkadiánním biologickým rytmům je odběr třeba provádět vždy ve stejnou dobu. V praxi se odběr provádí většinou ráno, protože v tuto dobu lze i snadno splnit podmínku odběru nalačno. Nedodržením lačnění vznikají zkreslené nálezy v parametrech lipidového a sacharidového metabolismu [1][2].

Stažení paže se také při odběru moc nedoporučuje nebo by mělo být co nejkratší. V opačném případě dochází k již popsanému zvýšení koncentrace vysokomolekulárních látek v odebrané krvi a také k anaerobnímu metabolismu ve stažené paži s následnou lokální acidózou [3].

#### 3.1.1.1.2 Odběrové systémy

Krev se odebírá do předem označených odběrových nádob. Vždy by měla platit zásada nejprve popsat nádobku jménem pacienta a ještě před vlastním odběrem jméno znovu zkontrolovat, tím se zcela vyloučí možnost záměny. Ideální je identifikace pacienta podle čárového kódu.

Nejvhodnější jsou odběrové nádoby na jedno použití. Jsou však většinou z plastické hmoty, ve kterých se krev pomalu a nedostatečně sráží a častěji dochází k hemolýze. Výrobce proto opatřuje stěny odběrových zkumavek vrstvou kaolinu, což urychlí srážení [3].

V současnosti je na trhu k dispozici široké spektrum uzavřených odběrových systémů. Existují tři možné způsoby uzavřeného odběrového systému, a to odběr krve pomocí vakua, druhý způsob využívá pouze pístu a existují i systémy, které mají obě možnosti.

Výhody uzavřeného odběrového systému jsou následující: ochrana odběrového pracovníka před možnou kontaminací krví pacienta, ochrana biologického materiálu před kontaminací vzorků zvenčí, možnost přímého nasazení odběrové zkumavky do analyzátoru a v neposlední řadě i snadná

likvidace materiálu spálením. Pomocí uzavřeného odběrového systému tedy docílíme kvalitní odběr krve, který je předpokladem pro správnou analýzu [4].

Oddělení séra od krevních elementů velmi usnadní odběr krve do zkumavky se speciálním separačním gelem, jehož hustota je volena tak, aby po odstředění vytvořil rozhraní mezi krvinkami a vrstvou séra, čímž zabrání jejich vzájemnému ovlivňování [3].

### **3.1.1.2 Krevní plazma a sérum**

Protože jen omezené množství biochemických analýz se provádí přímo z plné krve, je potřeba se zmínit o plazmě a séru, jakožto o nejčastěji vyšetřovaném materiálu.

Plazma je přirozenou tekutou částí krve. K získání plazmy je třeba odebírat krev přímo do stříkačky nebo zkumavky, obsahující protisrážlivý prostředek. Jako antikoagulační prostředky se používají zejména heparin, oxalát, citrát, EDTA.

K získání krevního séra se krev odebírá do zkumavky, která neobsahuje protisrážlivý prostředek. Krev se tedy srazí, vytvoří se krevní koagulum a zbylá tekutina, která se získá odstředěním koagula je sérum. V séru tedy chybí srážecí faktory, které jsou normálně přítomny v plazmě, neboť byly spotřebovány během procesu koagulace [1].

### **3.1.1.3 Transport a uchovávání vzorku**

Krev při transportu chráníme před extrémní teplotou. Transport musí být dostatečně rychlý, aby mohlo být sérum odděleno od krvinek. Na delší vzdálenosti raději posíláme sérum než plnou krev, v opačném případě hrozí mechanická hemolýza [3].

Teplota skladování biologického materiálu závisí na dvou faktorech, a to na stabilitě analytu a na době provedení analýzy. Pokud je vzorek zpracován do 24 – 48 hodin, postačuje pro většinu analytů uchovávání při teplotě 4 °C, pro dlouhodobé skladování je vhodná teplota -20 °C, popř. až -80 °C. Při skladování je nutné, aby byl materiál dobře uzavřen a zabránilo se zahušťování vzorku odpařováním, mikrobiální kontaminaci, vlivu světla a samozřejmě metabolismu krevních elementů [2].

#### **3.1.1.4 Prvotní zpracování a příprava krevního vzorku k analýze**

Prvotním zpracováním je odstředění krve a oddělení séra či plazmy, deproteinace vzorku před analýzou a též další postupy, např. promývání erytrocytů apod.

Pro oddělení krevních elementů od séra (či plazmy) je vhodná centrifugace při 1000 - 1500 g (g-násobek gravitačního zrychlení) po dobu 10 minut při 4 °C. Delší doba centrifugace nebo zvýšení počtu g vede často k částečné či úplné hemolýze. Plazma nebo sérum mají být odděleny co možno nejdříve, nejpozději však do 2 hodin od odběru. Krev pro stanovení tepelně nestálých analytů má být centrifugována v chlazené centrifuze. Předčasné oddělení séra od krevních elementů (dříve než za 20 – 30 minut) však může vést k dodatečné tvorbě fibrinu, a dochází tak k pocentrifugační koagulaci. Z tohoto pohledu je plazma jako biologický materiál pro další analýzy vhodnější – krev je možné ihned zcentrifugovat, hrozí menší nebezpečí hemolýzy [2].

Deproteinace se provádí pouze u analýz, kde při stanovení interferuje bílkovina. Deproteinace je obvykle chemická a je zapotřebí zvolit vhodné činidlo podle charakteru stanovované látky a pracovního postupu. Obvykle se používá kyselina trichloroctová, sulfosalicylová nebo organická rozpouštědla jako chloroform a metanol [3].



### 3.1.2 Ostatní biologické materiály

Mezi další biologické materiály vyšetřované při biochemických analýzách patří:

- Moč
- Žaludeční šťáva
- Duodenální šťáva
- Mozkomíšni mok
- Stolice
- Plodová voda
- Synoviální tekutina
- Konkrementy
- Pleurální výpotky
- Pot
- Sliny
- Sperma
- Sputum
- Lymfa
- Slzy
- Žluč

### 3.1.3 Zpracování tkání pro biochemické stanovení

Tkáň se získává biopsií, jako operační materiál nebo při sekci. Vzorky tkání se před stanovením musí připravit podle speciálních postupů v závislosti na typu tkáně a požadavku stanovení analytů. Pokud má být tkáňový materiál extrahován, pak je potřeba, aby byla tkáň nejprve zhomogenizována [1][2].[1, 2]

#### 3.1.3.1 Homogenizace

Homogenizace je v biochemické práci chápána jako důkladné rozmělnění materiálu za přídavku vody nebo vhodných roztoků (nejčastěji různých pufrů nebo fyziologických roztoků).

Pro homogenizaci malých množství měkkých tkání je nejvhodnější homogenizátor podle Pottera a Elvehjema. Tento homogenizátor se skládá ze silnostěnné zkumavky a zabroušeného pístu, který se spojí s elektromotorkem.

Do zkumavky se vloží odvážená tkáň a přidá se potřebné množství homogenizačního média. U tužších materiálů, jako jsou např. játra nebo nadledviny je často třeba tkáň roztříhat na menší kousky. Rotující píst drtí tkáň, která prochází mezi stěnou zkumavky a pístem. Vznikající teplo je odváděno ponořením nádoby do chladicí směsi vody s ledem [5].

Kvalita homogenizace je ovlivněna dobou homogenizace, rychlostí rotace a pohybu nahoru a dolů, koncentrací homogenizovaného materiálu a rozměrem štěrbin mezi stěnou nádoby a pístem. Při kratší homogenizaci a širší štěrbině se rozrušují především buněčné membrány, prodlužováním doby homogenizace a při užší štěrbině se rozrušují též jaderné membrány.

Homogenizátory s rotujícími noži (mixéry) se používají také velmi často a hodí se tam, kde je třeba zpracovat větší množství materiálu najednou, kde nevádí, že se rozruší jak buněčné membrány, tak orgány. Jemnost homogenátu je dána rychlostí otáčení nožů, poměrem rozměrů nože a nádoby, viskozitou homogenizované suspenze [1].

Mezi další způsoby mechanické homogenizace patří ještě roztírání tkáně v třecí misce s jemným pískem nebo s jiným abrazivem. Tento způsob sice nevyžaduje žádné přístroje, ale je nestandardní a pomalý [1][5].

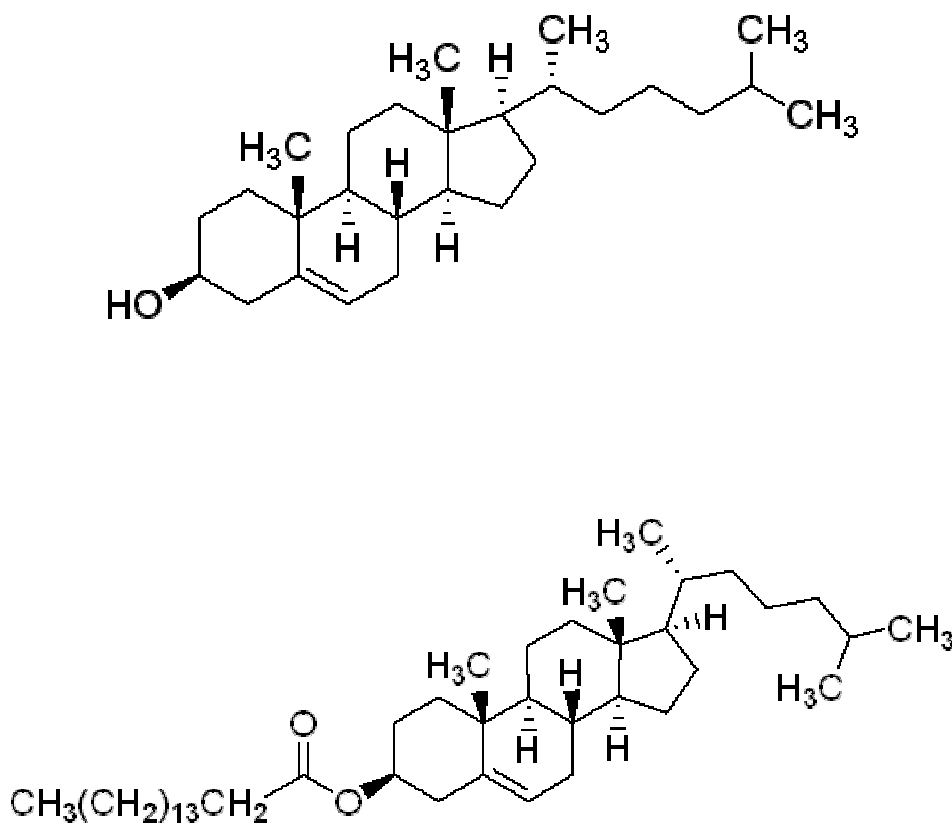
Sonikace je postup, jímž se rozrušují buněčné struktury působením ultrazvuku. Zvukové frekvence, zejména v ultrazvukové oblasti, rozrušují velmi účinně jak buněčné membrány, tak orgány. Postup se používá např. k hemolýze erytrocytů. K rozrušení jen určitých struktur při zachování jiných se hodí sonikační zařízení s nastavitelnou frekvencí a intenzitou ultrazvuku [1].

## 3.2 Cholesterol

### 3.2.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Cholesterol je sterol, jehož strukturální základ tvoří steranový skelet sestávající se ze čtyř uhlovodíkových kruhů (cyklopentanoperhydrofenantrenu) a osmiuhlíkatého postranního řetězce na 17 uhlíku. Dále ve své molekule obsahuje jednu nenasycenou vazbu vycházející z 5. uhlíku, dvě methylové skupiny v polohách 10 a 13 a hydroxylovou skupinu na 3. uhlíku (viz. obr. 1) [6].

Cholesterol je bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně se rozpouští v acetonu a 96% ethanolu. Je rozpustný v chloroformu, hexanu nebo pyridinu [7].



Obr. 1. Vzorec volného cholesterolu a esteru cholesterolu.

### 3.2.2 Biologický význam

Cholesterol je významnou složkou živočišných plazmatických membrán a v menší míře se vyskytuje v membránách vnitrobuněčných organel. Jeho hydroxylová skupina má slabý polární charakter a kondenzované cykly mu zaručují v porovnání s ostatními membránovými lipidy vyšší stupeň stability. Se vzrůstajícím podílem cholesterolu v biomembránách se snižuje jejich viskozita. Cholesterol tak představuje důležitou látku určující vlastnosti biomembrán. Cholesterol je také prekurzorem veškerých ostatních steroidů v těle, kortikoidů, pohlavních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D [2][8][9].

V organismu se vyskytuje cholesterol buď jako volný nebo jako esterifikovaný na hydroxylové skupině v poloze 3 vyššími mastnými nenasycenými kyselinami. Volný cholesterol je součástí buněčných membrán. Estery cholesterolu jsou zásobní a transportní formou cholesterolu v lidském organismu. V plazmě jsou přítomny z celkového cholesterolu asi 2/3 v podobě esterifikované. Jedná se převážně o estery cholesterolu s kyselinou linolovou a linoleovou. Intracelulární, zásobní pool cholesterolu tvoří pak estery cholesterolu s kyselinou olejovou a palmitoolejovou [2][6][10].

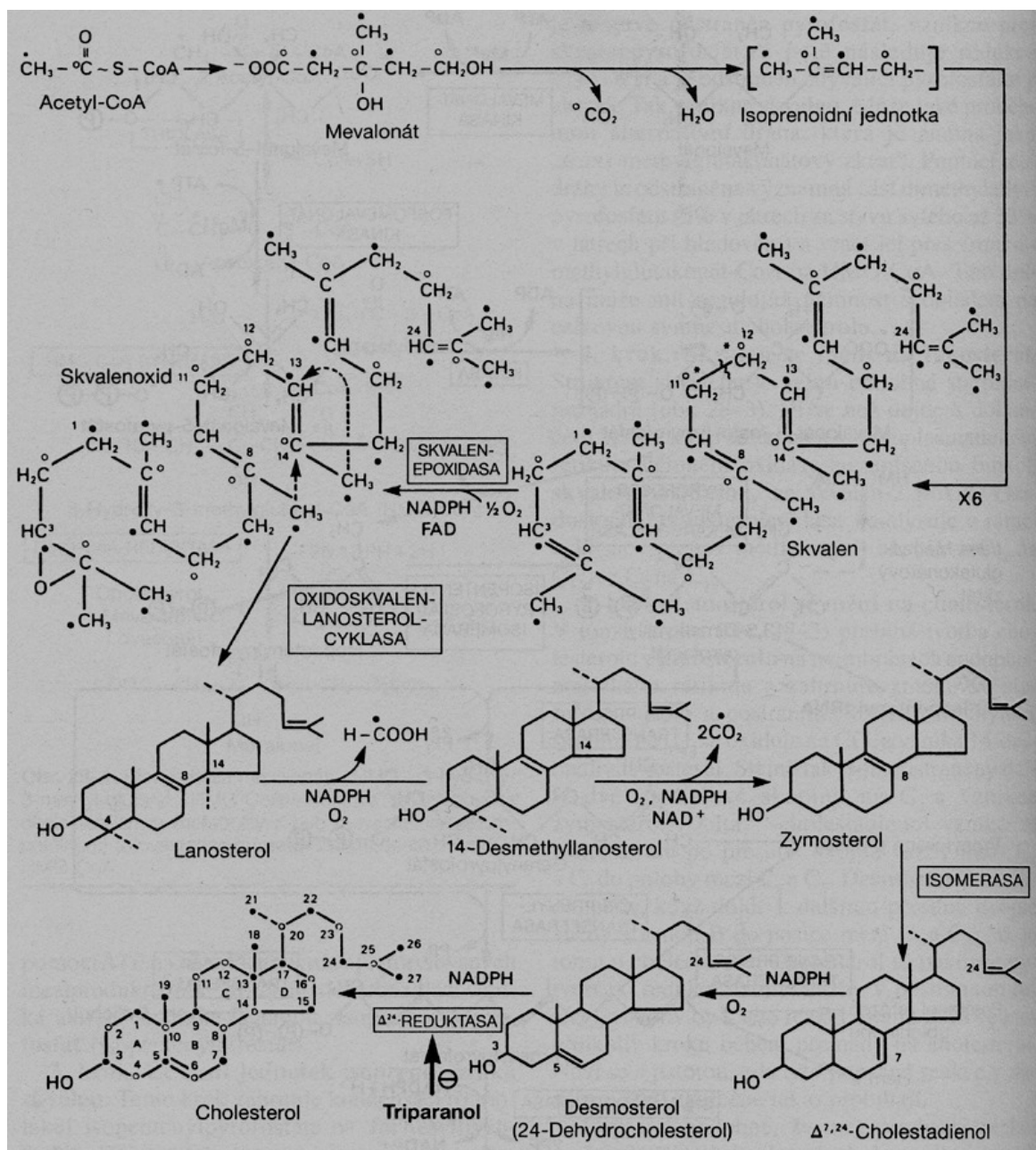
### 3.2.3 Syntéza cholesterolu

Přibližně polovina cholesterolu v těle pochází ze syntézy (asi 500 mg za den) a zbývající podíl má původ v potravě. Játra syntetizují přibližně 10% z celkové produkce cholesterolu u člověka, střevo asi 15% a kůže zbývající významný podíl. Prakticky veškeré tkáně mohou cholesterol syntetizovat. Za syntézu odpovídají mikrosomální frakce (z endoplazmatického retikula) a frakce z cytoplazmy (z cytosolu) [9].

Acetyl-koenzym A (acetyl-CoA) je zdrojem veškerých atomů uhlíků v cholesterolu. Nejprve kondenzují dvě molekuly acetyl-CoA na acetocetyl-CoA a tuto reakci katalyzuje enzym v cytoplasmě thiolasa. Acetoacetyl-CoA kondenzuje s další jednotkou acetyl-CoA na 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA), katalyzováno HMG-CoA syntasou. HMG-CoA se mění na mevalonát dvěma redukcemi za účasti HMG-CoA reductasy, mikrosomálního enzymu, a tento krok je považován za krok limitující rychlost v dráze syntézy cholesterolu. Z mevalonátu vznikají aktivní isoprenové jednotky. Z šesti

jednotek isoprenu vzniká skvalen. Skvalen se mění na lanosterol a ten se přemění na cholesterol, na membránách endoplasmatického retikula dochází ke změnám na steroidním jádře a postranním řetězci. Nejdříve vznikne desmosterol a po redukci dvojné vazby v postranním řetězci se vytvoří cholesterol (viz. obr. 2) [9].

Hlavním kontrolním bodem celé dráhy je tedy reakce katalyzovaná HMG-CoA-reduktasou. Tento enzym je regulován kompetitivními a allosterickými mechanismy, fosforylací a defosforylací, a dlouhodobou regulací rychlostí syntézy a odbourání enzymu [8].



Obr. 2. Schéma biosyntézy cholesterolu [9].

### 3.2.4 Transport lipidů v organismu

Jak již bylo uvedeno, lipidy jsou ve vodě normálně nerozpustné, proto musí být při transportu v krevní nebo lymfatické cirkulaci solubilizovány. Děje se tak vazbou na proteiny. Mastné kyseliny, které jsou přenášeny po lipolýze v tukové tkáni do svalů nebo do jater nebo po vstřebání ve střevě do tukové tkáně a svalů jsou přenášeny pomocí albuminu. Cholesterol, fosfolipidy, estery cholesterolu a triacylglyceroly (TAG) jsou přenášeny v komplexu se specifickými proteiny (apoproteiny) v částicích zvaných lipoproteiny [11].

Lipoproteiny jsou kulovité částice, které obsahují nepolární jádro z triacylglycerolů a esterů cholesterolu, zatímco na povrchu nacházíme více polární lipidy – volný cholesterol a zejména fosfolipidy a již zmíněné apoproteiny [3][12].

Lipoproteiny lze klasifikovat podle řady hledisek, např. podle zastoupení tuků nebo apoproteinů. Nejběžnější je však jejich rozdělení podle fyzikálních a chemických vlastností, jejichž výrazem je odlišná pohyblivost při elektroforéze a odlišné chování při preparativní ultracentrifugaci. Rychlost, s jakou každý lipoprotein protéká roztokem NaCl, je možné vyjádřit v jednotkách flotace (Svedberg – Sf). Složení různých lipoproteinových frakcí získaných centrifugací je znázorněno v tabulce 1 [6][9].

Tab. 1. Složení lipoproteinů v plazmě u člověka [9].

Frakce	Zdroj	Průměr (nm)	Relativní hustota	Sf	Složení						
					Protein (%)	Celkový lipid (%)	Procenta celkového lipidu				
							Triacylglycerol	Fosfolipid	Ester cholesterolu	Cholesterol (volný)	Volné mastné kyseliny
Chylomikrony	Střevo	90–1000	<0,95	>400	1–2	98–99	88	8	3	1	...
Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)	Játra (střevo)	30–90	0,95–1,006	20–400	7–10	90–93	56	20	15	8	1
Lipoproteiny o střední hustotě (IDL)	VLDL	25–30	1,006–1,019	12–20	11	89	29	26	34	9	1
Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)	VLDL	20–25	1,019–1,063	2–12	21	79	13	28	48	10	1
Lipoproteiny o vysoké hustotě HDL <sub>2</sub>	Játra a střevo. VLDL Chylomikrony	10–20	1,063–1,125		33	67	16	43	31	10	...
HDL <sub>3</sub>		7,5–10	1,125–1,210		57	43	13	46	29	6	6
Albumin-FFA	Tuková tkáň		>1,2810		99	1	0	0	0	0	100

FFA – volné mastné kyseliny, VHDL (lipoproteiny o velmi vysoké hustotě) je minoritní frakce, jejíž hustota je 1,21 – 1,25.

Při elektroforéze zůstávají na startu chylomikrony, následuje frakce  $\beta$  (v této frakci lze identifikovat některé další, specifické subfrakce jako např. široké  $\beta$  nebo pomalé pre- $\beta$  lipoproteiny), pre- $\beta$  a konečně frakce  $\alpha$  lipoproteinů [6][9].

Existují tedy čtyři hlavní skupiny lipoproteinů, které jsou fyziologicky důležité a významné pro klinickou diagnózu. Jsou to chylomikrony, které pocházejí ze střevní resorpce TAG, dále lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) jaterního původu a exportující TAG, lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a nakonec lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) účastníci se v metabolismu VLDL a chylomikronů a také cholesterolového transportu [9].

### 3.2.5 Úloha lipoproteinů v transportu cholesterolu

Estery cholesterolu pocházející z potravy se hydrolyzují na volný cholesterol, který se mísí s volným cholesterolem z potravy a žlučovým cholesterolem před svou resorpcí ve střevě společně s jinými lipidy. Mísí se s cholesterolem, který je syntetizován ve střevě a vstupuje do chylomikronů. Z cholesterolu, který se resorbuje ve střevní sliznici je esterifikováno 80 – 90% mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Chylomikrony jsou z 90% tvořeny TAG, dále obsahují již zmíněný cholesterol, fosfolipidy a z bílkovin je nejvýznamnější podíl apoproteinu B48 (apo B-48). Chylomikrony mohou pronikat lymfatickými cévami přímo do ductus thoracicus a pak do oběhu. Na povrchu endotelu dochází ke štěpení chylomikronů lipoproteinovou lipázou za vzniku chylomikronových zbytků. Z chylomikronových zbytků se ztrácí pouze 5 % esterů cholesterolu. Zbývající část je zachycena játry díky specifickým receptorům. Chylomikrony mají poločas rozpadu 15 minut, a nejsou proto za normálních okolností prokazatelné v séru po 14 hodinovém lačnění. Základní funkcí chylomikronů je poskytnutí tuku tkáním a současně dodání cholesterolu do jater [6][9].

V játrech je potravní cholesterol využit buď k syntéze žlučových kyselin nebo se stává součástí VLDL určených pro export. Játry produkované VLDL transportují cholesterol do plasmy a jsou rovněž degradovány lipoproteinovou lipázou. Zbytky VLDL se objevují v oběhu nejdříve jako IDL (intermediární částice) a pak jako LDL. Při přeměně VLDL na LDL jsou téměř všechny proteiny kromě apo-B100 odstraněny a většina jejich cholesterolu esterifikována enzymem asociovaným s HDL, lecitin cholesterol acyltransferazou (LCAT). Enzymovou aktivitou plazmatické LCAT vznikají prakticky všechny estery cholesterolu u člověka [8].

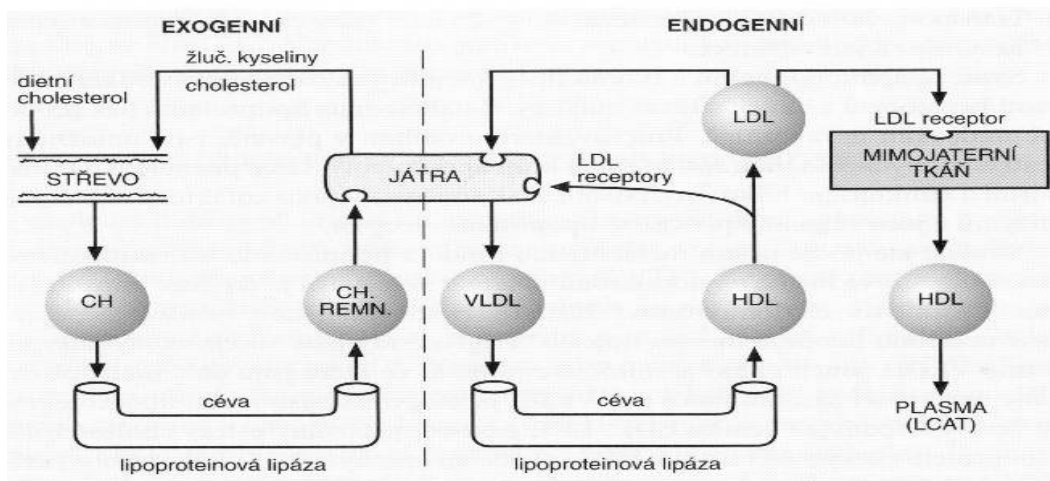
Základní funkcí LDL je tedy transport cholesterolu do jater i dalších tkání. Při odbourávání LDL částic hrají zcela zásadní úlohu speciální LDL-receptory. Jedná se o transmembránové glykoproteiny na povrchu buněk, které specificky vážou jak apo-B, tak apo-E. LDL receptory se shlukují do opláštěných jamek, které slouží k shromáždění povrchových receptorů určených k endocytóze a zároveň jejich oddělení od ostatních proteinů na povrchu buňky. Tyto jamky, které jsou vystlány klathrinem, se vchlipují dovnitř buňky, čímž vytvářejí obalené



váčky, které pak splývají s lysozomy. Uvolněné estery cholesterolu jsou pak lysozomální lipasou hydrolyzovány a volný cholesterol je potom buňkou dále využit. Pochod se nazývá receptorová endocytóza a není omezena pouze na LDL-receptory. Tímto způsobem také játra přijímají chylomikronové zbytky pomocí samostatných receptorů pro tyto zbytky, které specificky váží apo-E. [8][12].

Kromě LDL receptorů mohou být LDL částice odbourávány i systémem scavengerových receptorů, které se uplatňují především za patologických situací a váží na sebe modifikované, acetylované, oxidované nebo vysoce denzní LDL částice. Tato metabolická cesta se uplatňuje i při zvýšené koncentraci LDL v plazmě a vede k akceleraci aterosklerózy. Scavengerové receptory obvykle odbourávají až 20 % plazmatických LDL [6].

Reverzním transportem cholesterolu nazýváme soubor dějů, které vedou k uvolnění cholesterolu v periferní tkáni, jeho transportu plazmou a konečně odbourávání v játrech. Zásadní roli v reverzním transportu cholesterolu hrají cholesterol ester transfer protein (CETP) a především HDL. Při zániku buňky dochází k uvolnění cholesterolu z buněčné membrány. Tento cholesterol se po uvolnění do plazmy váže na HDL. HDL částice jsou nejmenší lipoproteinové částice. Jsou syntetizovány a secernovány játry a buňkami tenkého střeva ve formě disků (nascent HDL) Tyto nascentní HDL obsahují z lipidů především volný cholesterol a fosfolipidy, v jejichž bílkovinné části pak dominují apo-A. Nascentní HDL vznikají též při katabolismu chylomikronů a VLDL. Podle některých autorů produkují HDL i makrofágy. HDL se vyskytují ve dvou frakcích. HDL<sub>3</sub> vznikají z nascentních HDL po přijetí fosfolipidů, volného cholesterolu a apolipoproteinů z dalších lipoproteinů a periferních buněk. Volný cholesterol je posléze esterifikován, přemísťuje se do nitra částice za vzniku sférické částice HDL<sub>3</sub>. Další interakcí s chylomikrony a VLDL vznikají větší a méně denzní částice HDL<sub>2</sub>. Ty se váží apo-AI na specifické jaterní receptory pro HDL. Část HDL<sub>2</sub> je působením enzymů konvertována zpět na HDL<sub>3</sub>. Interakce mezi jednotlivými třídami HDL a dalšími lipoproteiny jsou zprostředkovány CETP [6].



Obr. 3. Schéma metabolismu cholesterolu [6].

### 3.2.6 Vylučování cholesterolu

Za den je z těla odstraněn asi 1 g cholesterolu. Přibližně polovina tohoto množství se vyloučí stolicí ve formě žlučových kyselin. Zbytek se vylučuje jako neutrální steroidy. Velké množství cholesterolu vyloučené žlučí je znovu resorbováno a předpokládá se, že alespoň část cholesterolu sloužící jako prekurzor pro vznik steroidů ve stolici pochází ze střevní sliznice. Koprostanol je hlavním steroidem ve stolici. Vytváří se z cholesterolu činností bakterií v tlustém střevě. Velká část žlučových solí ve vyloučené žluči se znovu resorbuje do portálního krevního oběhu, je zachycena játry a opět se vylučuje ve žluči. Tento cyklus nese název enterohepatální oběh. Žlučové soli nebo jejich deriváty, které se znovu neresorbovaly, jsou vyloučeny stolicí. Žlučové soli podléhají změnám, které způsobují střevní bakterie, a vznikají z nich sekundární žlučové kyseliny [9].

### 3.2.7 Analytické metody stanovení cholesterolu

Cholesterol je možné v biologickém materiálu stanovit několika metodami. Dlouhou dobu byla jedinou metodou stanovení cholesterolu tzv. Liebermann-Buchardova reakce. Průmyslová výroba analytických enzymů cholesterolesterazy (CHES) a cholesteroxidazy (CHO) umožnila využít pro stanovení cholesterolu enzymatické metody vhodné pro analyzátoři. Cholesterol lze rovněž stanovit i metodami chromatografickými [13].

### 3.2.7.1 Chemické metody

Cholesterol reaguje s kyselinou sírovou v bezvodém prostředí kyseliny octové a anhydridu kyseliny octové za vzniku modrozelených nenasycených sloučenin. (tzv. Liebermann-Buchardova reakce). Pro referenční účely se používá metoda podle Abella, která je vícestupňová (alkalické zmýdelnění – extrakce – barevná reakce), neboť se odstraňují interferující látky.

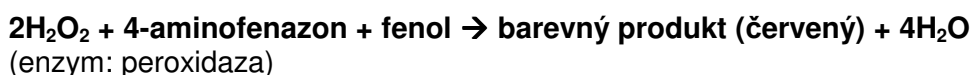
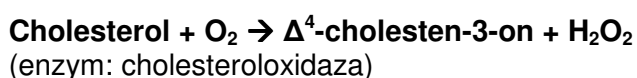
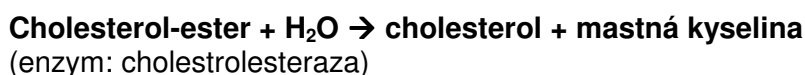
Cholesterol reaguje také s kyselinou sírovou a  $\text{Fe}^{3+}$  kationty v bezvodém prostředí za tvorby zbarvení (metoda podle Zlatkinse). Tato metoda je citlivější než Liebermann-Buchardova reakce, ale je méně specifická a příliš se v laboratořích nerozšířila [4].

### 3.2.7.2 Enzymatické metody

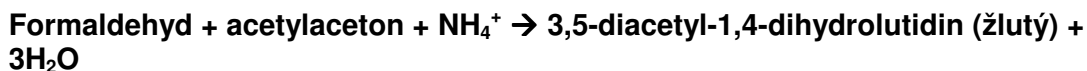
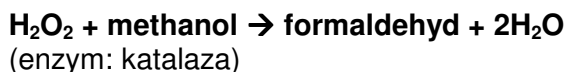
Protože v krevním séru je asi 70% cholesterolu esterifikováno, musí být při stanovení celkového cholesterolu nejprve estery cholesterolu hydrolyzovány. Klasická je chemická hydrolýza účinkem roztoku hydroxidu za zvýšené teploty, ale u plně enzymových metod se hydrolýza provádí pomocí enzymu CHES. V další fázi se stanovuje cholesterol reakcí, při které je oxidován za katalytického působení enzymu CHO. V reakci vzniklý peroxid vodíku se stanovuje. Lze využít oxidativní kopulace fenolu (nebo jeho derivátů) a 4-aminofenazonu za katalytického působení peroxidazy. Vzniká červené zbarvení, které se stanovuje fotometricky.

Nebo je peroxid vodíku využit k oxidaci methanolu za katalytického působení enzymu katalasy na formaldehyd, který se stanoví Hantzschovou kondenzační reakcí (formaldehyd + acetylaceton +  $\text{NH}_4$ ). Vzniká žluté zbarvení dihydrolutidinového derivátu [4].

Stanovení je popisováno následujícími rovnicemi:



nebo



### **3.2.7.3 Chromatografické metody**

Před vlastní analýzou je nutné provést úpravy vzorku. Např. při plynové chromatografii (GC) se provádí hydrolýza-extrakce-derivatizace a teprve takto upravený vzorek se analyzuje. Z dalších chromatografických metod je vhodná i tenkovrstvá chromatografie (TLC). Těmito metodami se většinou rozlišují jednotlivé lipidy. Aby bylo možné uvedené metody použít, je nutno tkáň nebo sérum nejprve extrahovat, obvykle metodou podle Folche-do směsi chloroformu a methanolu v poměru 2:1 [4][9].

Tabulka 2 znázorňuje přehled chromatografických metod pro stanovení cholesterolu a jeho derivátů v různých druzích matrice. Pro tento účel byly nalezeny metody GC, ale i HPLC.

### **3.2.7.4 Jiné metody**

Další metodou je využití izotopového zředování ve spojení s hmotnostní spektrometrií a elektrochemické metody [4].

Tab. 2 Přehled chromatografických metod pro stanovení cholesterolu a jeho derivátů

stanovované látky	matrice	stacionární fáze analytická kolona	mobilní fáze	detekce	detekovaný ion u MS	délka analýzy	citlivost metody LOD/LOQ	reference
cholesterol cholesteryl ester	monocyty makrofágy	není přímý vstup do MS	methanol 10 mM octan amonný chloroform	ESI-MS-MS SRM	$[M+NH_4]^+$	1,3 min	LOD = 0,5 $\mu$ M	[14]
prekurzory cholesterolu plazmatické fytoosteroly	plazma	GC 14% cyanopropylphenyl-86% dimethylpolysiloxane) (60 m x 0,25 mm ID x 0,25 $\mu$ m)	He	EI-MS SIM	$[M+H]^{+*}$	66 min.	LOD = 0,2-0,5 $\mu$ M	[15]
celkový cholesterol tokoferol $\beta$ -karoten	maso	HPLC Normal-phase silica column Zorbax RX-Sil (4,6 mm ID x 250 mm)	1% isopropanol v N-hexanu	DAD FD	-	17 min.	LOD = 0,5 $\mu$ M	[16]
celkové lipidy cholesterol mastné kyseliny	maso	HPLC Spherisorb ODS-2 (4,6 x 150 mm)	ACN:isopropanol (70:30)	DAD	-	15 min.	-	[17]
celkové lipidy cholesterol mastné kyseliny	maso	GC Silica-capillary DB-WAX column (30m x 30 mm)	N <sub>2</sub>	FID	-	-	-	[17]
celkový cholesterol	tuky oleje	GC 30 m CP-SIL 24 CB megapore kapilární kolona	N <sub>2</sub>	FID	-	30 min.	-	[18]
cholesterol oxysteroly	sérum	HPLC Develosil C30-UG-3 column (150 mm x 4,6 mm ID)	ACN:2-propanol (9:1) + 50 nM LiClO <sub>4</sub>	ED	-	35 min.	LOD = 0,36 $\mu$ mM	[19]
oxidační produkty cholesterolu (10 látek)	modelové sloučeniny	HPLC Silica Supelcosil column (250 mm x 21 mm ID)	heptan, isopropanol gradientová eluce	APCI-MS SIM	$[M+H]^+$	35 min.	LOD = 0,3 ng	[20]
cholesterol sitosterol sitostanol	buňky adenokarcinomu tlustého střeva	HPLC Xterra MS C <sub>8</sub> reversed-phase column (2,1mm x 150 mm)	methanol:voda (90:10) 0,2mM octan amonný	APCI-MS	$[M+H-H_2O]^+$	18 min.	LOQ = 0,225 – 0,45 $\mu$ M	[21]

### **3.3 Chromatografické metody**

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody nelze principiálně použít. Jelikož většina přírodních vzorků jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam [22].

#### **3.3.1 Rozdělení chromatografických metod**

Vzhledem ke značné různorodosti těchto metod se dělí podle několika hledisek.

- podle povahy děje, který převládá při separaci (rozdělovací, adsorpční, gelová, afinitní, iontově-výměnná chromatografie)
- podle skupenství mobilní fáze (kapalinová a plynová chromatografie)
- podle uspořádání stacionární fáze (kolonová chromatografie a chromatografie v plošném uspořádání – papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie) [23].

#### **3.3.2 Tenkovrstvá chromatografie**

Princip TLC je znám více než 100 let, avšak její analytické využití nastalo až před 30 lety zásluhou E. Stahla a od té doby je jednou z nejužívanějších chromatografických technik. Klasická TLC je jednoduchá, laciná metoda, která vyžaduje minimální instrumentaci a je používána pro separace jednoduchých směsí a identifikaci či semikvantitativní vizuální analýzu vzorků [24].

Princip TLC spočívá v tom, že při průchodu rozpouštědla vrstvou sorbentu dochází k mnohonásobnému ustalování rovnováhy. Molekuly analytu se rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi a dělení je založeno na rozdílné afinitě složek směsi k mobilní a stacionární fázi.

V praxi se postupuje tak, že se na tenkou vrstvu vyznačí ve vhodné vzdálenosti od okraje tzv. start, tj. počátek chromatogramu, a body pro nanesení vzorků. Na označená místa se nanášou roztoky příslušných vzorků. Po odpaření rozpouštědla se destička s tenkou vrstvou sorbentu postaví na dno

chromatografické komory, v níž je již předem připraveno rozpouštědlo (mobilní fáze), přičemž kapilárními silami rozpouštědlo vzlíná po chromatogramu vzhůru a unáší s sebou jednotlivé složky podle jejich rozpustnosti. Dochází tedy k vzestupnému vyvíjení chromatogramu. Stupeň nasycení komory značně ovlivňuje kvalitu dělení, tvar skvrn a zejména pak reprodukovatelnost výsledků. Dříve, než dosáhne čelo mobilní fáze konce desky, ukončí se analýza, destička se vyjme z komory. Když mobilní fáze vytéká, přistoupí se k detekci [24][25][26].

K rozdělování mezi fázemi dochází na základě rozdělovacího (distribučního) zákona a rozdělení je dáno hodnotou distribuční konstanty. Vlivem různě velkých hodnot distribučních konstant pro různé látky dojde k jejich rozdílné migraci na chromatogramu, a tudíž k jejich rozdělení. Látky více rozpustné ve stacionární fázi budou migrovat pomaleji - menší hodnota retenčního faktoru ( $R_F$ ), látky s vyšší rozpustností v mobilní fázi budou blíže čelu-vyšší hodnoty  $R_F$ . Bude-li mít dvojice látek v daném rozpouštědlovém systému stejnou hodnotu  $R_F$ , nerozdělí se. Hledá se vhodný rozpouštědlový systém, v němž se budou  $R_F$  jednotlivých látek lišit [26].

### **3.3.2.1 Volba stacionární a mobilní fáze v TLC**

Selektivita systému je dána kombinací stacionární a mobilní fáze, jež je rozhodujícím činitelem ovlivňujícím kvalitu separace vyjadřovanou rozlišením. V TLC není v podstatě možné ovlivňovat účinnost ani faktor kapacity změnou rychlosti toku mobilní fáze. Faktor selektivity je tedy jediným faktorem, který rozhoduje o kvalitě rozdělení látek na chromatogramu. Při volbě sorbentu i mobilní fáze se vychází vždy z povahy separovaných látek. Pro látky rozpustné v organických rozpouštědlech platí to, že pro nepolární látky volíme buď adsorpční chromatografii, nebo rozdělovací chromatografii na obrácených fázích. Středně polární látky chromatografujeme na principu adsorpčním, přičemž silikagel použijeme pro látky neutrální a kyselé a oxid hlinitý pro mírně polární látky neutrální a bazické.

Rozpouštědlo použité při adsorpční chromatografii v normálním módu jako mobilní fáze je samo adsorbováno, přičemž dochází ke kompetici mezi chromatografovanou látkou a rozpouštědlem. Čím je chromatografovaná látka ve vztahu k rozpouštědлу tvořícímu mobilní fázi polárnější, tím je více zadržována adsorbentem a hodnoty  $R_F$  se snižují. Chceme-li naopak zvýšit

pohyblivost chromatografovaných látek, tj. dosáhnout vyšších hodnot  $R_F$ , použijeme polárnější rozpouštědlo, neboť molekuly polárnějšího rozpouštědla budou vytěšňovat molekuly chromatografované látky a ty bude možné mobilní fází vymýt z prostoru, kde byly sorbovány [25].

### **3.3.2.2 Nanášení vzorků**

Analyzované vzorky jsou rozpouštěny ve vhodném těkavém rozpouštědle a nanášejí se na start. Minimální nanášené množství je určeno mezí detekce a je tedy závislé na povaze detekčního činidla a měřené veličiny. Maximální nanášené množství je limitováno kapacitou tenké vrstvy a rozpustností dělené složky v mobilní fázi. Množství chromatografovaných látek při TLC se obvykle pohybuje v rozmezí 0,1 až 100  $\mu\text{g}$  (pro jednu skvrnu). Asi 2 – 5%ní roztoky je třeba nanést v množství 2 – 220  $\mu\text{l}$  speciálními pipetkami nebo upravenými injekčními stříkačkami [26].

### **3.3.2.3 Detekční systémy v TLC**

Fyzikální způsoby detekce spočívají ve využití záření (viditelného, ultrafialového a infračerveného) dopadajícího na chromatogram. Řada látek absorbuje záření o určité vlnové délce a toho lze využít při prohlížení chromatogramu. Některé látky se projevují jako fluoreskující skvrny, jiné naopak absorbují ultrafialové záření a projeví se jako tmavé skvrny na svítícím pozadí. Toho se zvláště využívá, impregnujeme-li vrstvu např. fluorescenčním indikátorem. Vrstva pod ultrafialovým zářením silně září, zatímco látky rozdělené na chromatogramu se jeví jako tmavé skvrny. Ve všech případech se skvrny zakreslí do chromatogramu.

Chemické způsoby detekce spočívají v tom, že se chromatogram postříká vhodným detekčním činidlem, jež vyvolá barevnou reakci s rozdělenými látkami. Pro detekci látek na tenkých vrstvách se používá řady univerzálních detekčních činidel, zpravidla agresivních. Mezi ně patří koncentrovaná kyselina dusičná, kyselina sírová, roztok dichromanu sodného apod. Vedle univerzální detekce je vhodné mít k dispozici i selektivní způsoby, jež umožňují detekovat pouze určitou skupinu látek [26].



### 3.3.2.4 Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu

Látky v TLC se identifikují na základě hodnot  $R_F$  a jejich shody se standardy.  $R_F$  udává poměr vzdálenosti středu zóny analytu ( $l_A$ ) a čela mobilní fáze od startu ( $l_0$ ).

$$R_F = l_A/l_0$$

Hodnota  $R_F$  udává relativní polohu zóny na chromatogramu (nabývá teoreticky hodnot 0 až 1) a je pro každou látku za daných podmínek separace charakteristická.

Využívají se také hodnoty  $R_M$  definované vztahem:

$$R_M = \log [(1/R_F) - 1] = \log k$$

Hodnoty  $R_M$  souvisejí se strukturou látek: byla pozorována lineární závislost  $R_M$  na počtu strukturních jednotek u členů homologických řad [24].

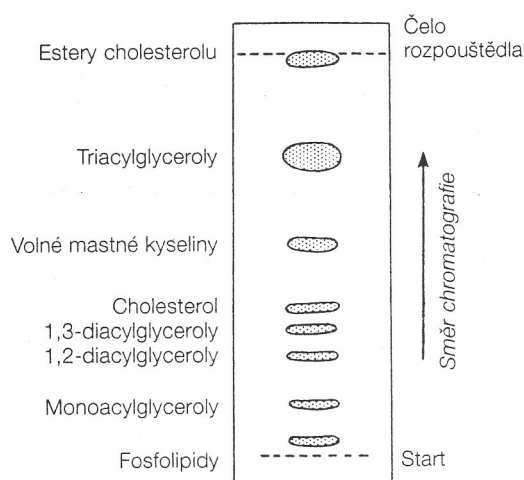
### 3.3.2.5 Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu

Vyhodnocení je buď přímé nebo nepřímé. Při nepřímé semikvantitativní metodě se skvrna z tenké vrstvy vyškrabe a potom se extrahuje vhodným rozpouštědlem. Koncentrace látky v extraktu se pak může určit spektrofotometricky nebo jinou metodou.

Mezi přímé metody patří měření plochy skvrny (logaritmus plochy skvrny je úměrný koncentraci) a denzitometrie. Použití skenovacích fotodenzitometrů je nejrozšířenější a poskytuje nejpřesnější výsledky. Převádějí intenzitu zabarvení skvrn na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství analytů ve skvrnách. Umožňují též zaznamenávání spekter. Při použití denzitometrů již neplatí tvrzení, že TLC je pouze semikvantitativní metoda [24].

### 3.3.2.6 Dělení lipidů pomocí TLC

Celkové lipidy izolované z biologického materiálu metodou podle Folche jsou ještě natolik komplikovanou směsí, že je nutné je rozdělit do jednodušších frakcí před podrobnou konečnou analýzou. Jako vhodná separační technika se jeví chromatografie na tenké vrstvě silikagelu. Pro dělení neutrálních lipidů se vyvíjí směsí petroletheru nebo hexanu, diethyletheru a kyseliny octové (90:10:1). Vyvíjení trvá asi 30 až 40 minut. Chromatogram se po usušení detekuje 5%ním ethanolickým roztokem kyseliny fosfomolybdenové (zahřátí na 80 °C, až se objeví zřetelně modré skvrny na žlutém podkladě) nebo 2%ního oxidu chromového (nebo dichromanu draselného) v 2%ní kyselině sírové (zahřívá se na 180 °C, až se objeví černé skvrny na světlém podkladě) nebo 0,2%ním ethanolickým roztokem 2',7'-dichlorfluoresceinu (objeví se skvrny při ozáření ultrafialovými paprsky). Výhodou tohoto způsobu detekce je možnost získání nezměněné lipidové frakce pro další identifikaci. Lipidy se identifikují srovnáním se standardy. Při detekci chromsírovou směsí lze chromatogramy vyhodnotit denzitometricky [27].



Obr. 4. Oddělení hlavních tříd lipidů pomocí TLC [9].

Vhodný systém rozpouštědel pro tento účel je směs hexan-diethylether-kyselina mravenčí v poměru objemů 80:20:2.

### 3.3.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní fází je nosný plyn pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně.

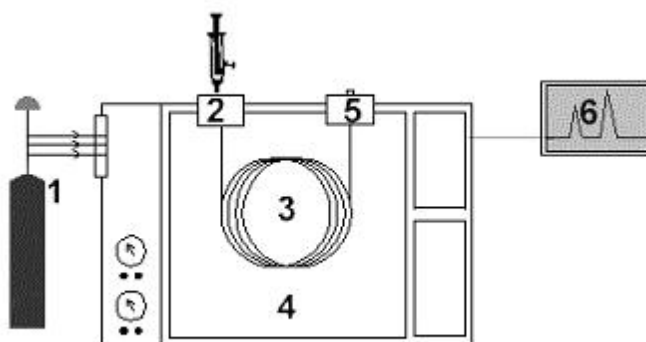
Složky jsou vždy separovány v plynné fázi. Pokud má být vzorek analyzován metodou plynové chromatografie, musí být všechny složky vzorku převedeny do plynného stavu definovaným způsobem. V praxi to znamená, že GC je vhodná především pro organické látky s teplotou varu do 400 °C. Lze analyzovat i látky netěkavé a to po převedení na těkavější deriváty.

Dle stacionární fáze, kterou GC používá, je dělena na *plynovou adsorpční chromatografii*, u které je řídicím procesem adsorpce složky z plynné fáze na povrch tuhého adsorbentu (např. silikagel, aktivní uhlí) a na *plynovou rozdělovací chromatografii*, kde probíhá distribuce složky mezi plynnou mobilní a kapalnou stacionární fází [28].

#### 3.3.3.1 Teorie plynové rozdělovací chromatografie

Zplyněný nebo plynný vzorek v mobilní fázi, se zčásti rozpustí v kapalně stacionární fázi. Složky, pokud se příliš neliší polaritou, vycházejí z kolony v tom pořadí, v jakém stoupají jejich teploty varu. Záleží také na polaritě, složka, která má přibližně stejnou polaritu jako stacionární fáze, bude vycházet z kolony později, než složka, jejíž polarita je odlišná. Základní pravidlo : „Podobné rozpouští se v podobném“, se projeví větší retencí nepolárních složek na nepolární stacionární fázi a naopak [28].

### 3.3.3.2 Instrumentace v plynové chromatografii



Obr. 5. Schéma plynového chromatogramu [28]

(1-tlaková láhev s nosným plynom, 2-dávkovací zařízení, 3-chromatografická kolona, 4-kolonový termostat, 5-detektor, 6-zařízení pro vyhodnocení analýzy)

#### 3.3.3.2.1 Mobilní fáze

V GC se mobilní fáze označuje jako nosný plyn, jehož funkcí je transport složek rozdělované směsi analytickou kolonou a přitom se sám neúčastní separačního procesu. Nosný plyn má mít vysokou čistotu, nemá obsahovat kyslík a H<sub>2</sub>O. Jako nosné plyny se využívají helium, dusík, vodík, argon a výjimečně některé další plyny, které se téměř nerozpouštějí v kapalně stacionární fázi. Nosný plyn má ale jinou vlastnost, která do určité míry ovlivňuje separační proces, a to je stlačitelnost plynu. K tomu, aby plyn proudil kolonou, je třeba, aby na začátku kolony byl tlak vyšší než na jejím konci, kde je obvykle tlak atmosférický.

Zdrojem nosného plynu je obvykle tlaková láhev opatřená regulátorem tlaku. Průtok nosného plynu se reguluje jemnými jehlicovými ventily. Sušička, absorbery kyslíku a injektor jsou připojeny ke vstupu chromatografické kolony. Zpravidla obsahuje trubičku z křemenného skla, která je dole zúžena nebo opatřena fritou. Injektor je dokonale proplachován nosným plynem. Nahoře uzavírá injektor septum ze speciální pryže odolné vysokým teplotám. Kapalně vzorky se nasají do mikrostříkačky a po propíchnutí septa se nastříkne objem vzorku (0,1 až 5 µl), který se okamžitě odpaří v injektoru. Teplota v injektoru má být vyšší, než je teplota varu nejméně těkavé složky vzorku. Páry vzorku jsou přeneseny do připojené kolony [28].

### 3.3.3.2 Analytické kolony

V GC jsou používány dva základní typy kolon: náplňové a kapilární.

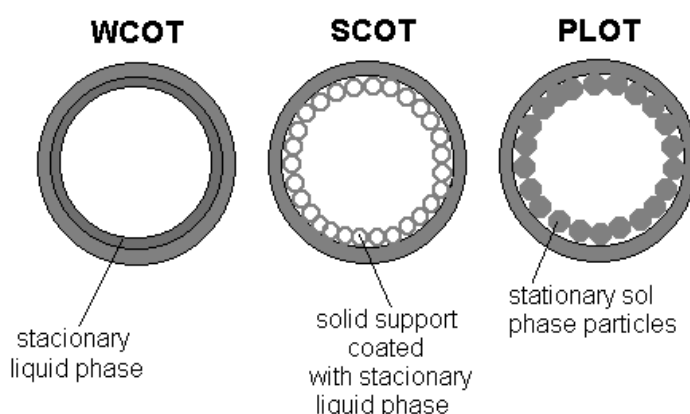
Náplňové kolony jsou trubice ze skla nebo nerezové oceli, naplněné granulovaným materiálem např. adsorbentem nebo nosičem pokrytým kapalnou stacionární fází. Jako nosič slouží křemelina o průměru částic 0,1-0,15 mm.

Kapilární kolony jsou otevřené kapiláry, kde funkci nosiče zastávají vnitřní stěny kapiláry, které jsou pokryty kapalnou stacionární fází. Zvýšení obsahu stacionární fáze je možné dosáhnout úpravou vnitřních stěn naleptáním, čímž se zvýší několikanásobně vnitřní povrch kapiláry. Tyto kolony se zhotovují z taveného křemene, jehož povrch je potažen vrstvičkou polyamidu, ten dodává koloně pružnost. Existují různé typy těchto kolon (viz obr. 6):

WCOT (wall coated open tubular) je kolona s tenkým filmem stacionární fáze naneseným přímo na vnitřní stěně kolony. Vnitřní průměr i tloušťka stěny se pohybují ve stovkách mikrometrů.

SCOT (support coated open tubular) kapalina je zakotvena na nosiči, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry, tloušťka tenké vrstvy náplně je 1-5  $\mu\text{m}$ .

PLOT (porous layer open tubular) je kolona, kde na vnitřní stěně kapiláry je nanesena, popřípadě chemicky vytvořena z materiálu stěny, pórovitá vrstva o tloušťce kolem 10  $\mu\text{m}$  i větší [29].



Obr. 6. Schématické znázornění kolon používaných v GC [29].

Vedle mechanicky nanesených fází rozeznáváme ještě kolony s vázanou stacionární fází. Ty mají stacionární fázi chemicky vázanou na vnitřní povrch kapiláry, nebo spíše je stacionární fáze polymerizována do takového stupně, že ji nelze rozpouštědlem odstranit [29].

Stacionární fázi volíme podle charakteru vzorku a podle rozsahu teplot varu. Obecně platí, že zvolená stacionární fáze má být podobného typu jako analyzovaný vzorek. U stacionárních fází bývá uvedena dolní a horní hranice použitelnosti. Používané fáze jsou na bázi polysiloxanu [28].

### 3.3.3.2.3 Detektory

Úkolem detektoru je poskytnout rozdílné signály při průchodu samotného nosného plynu a při průchodu nosného plynu obsahujícího eluovanou složku [28].

#### *Plamenový ionizační detektor (FID)*

Jeho podstatnou část tvoří hořák. Ionty a elektrony, které se vytvoří spálením složek unášených nosným plynem, umožňují elektrický tok mezi elektrodami, na které je vloženo stabilizované stejnosměrné napětí. Vzduch jako pomocný plyn se přivádí do spodní části detektoru. Jednotlivé konstrukce FID se od sebe liší zejména úpravou a geometrií elektrod, které se umísťují např. jako dvě destičky rovnoběžné s plamenem nebo jednou z elektrod je elektricky odizolovaná kovová tryska hořáku. Druhá elektroda má formu dutého válečku a je umístěna nad plamenem. V redukční zóně plamene dochází k hydrogenaci a vytvoření radikálu  $\text{CH}_3\cdot$ , které další reakcí s kyslíkem produkují ionty schopné přenosu elektrického proudu. Pouze hydrogenovatelný uhlík je v podmínkách FID ionizován, proto není velikost odezvy úměrná počtu všech uhlíkových atomů, ale počtu tzv. efektivních uhlíkových atomů [28].

### *Detektor elektronového záchytu (ECD)*

Podstatnou částí detektoru jsou dvě elektrody - emitor, kde se jako zdroj měkkého radioaktivního záření užívá izotop  $^{63}\text{Ni}$ , a kolektor. Mezi těmito elektrodami je vloženo napětí. Nosný plyn vstupuje do detektoru tryskou, je radioaktivním zářením ionizován a mezi elektrodami prochází ionizační proud. Obsahuje-li nosný plyn molekuly s afinitou k elektronům, dojde k poklesu ionizačního proudu, který je po zesílení zaznamenán [28].

### *Tepelně vodivostní detektor (TCD)*

Podstatnou částí je tenké odporové vlákno umístěné uvnitř kovového bloku. Vlákem prochází konstantní elektrický proud a zahřívá je na určitou teplotu. Jestliže detektorem prochází čistý nosný plyn o stálém průtoku, je tato teplota odporového vlákna konstantní. Obsahuje-li nosný plyn eluovanou složku s jinou teplotou vodivosti než má nosný plyn, změní se teplota vlákna a tím i jeho elektrický odpor. U tohoto detektoru se jako nosný plyn využívá vodík nebo helium [28].

### *Plamenový fotometrický detektor (FPD)*

Selektivní pro látky obsahující síru a fosfor. Je založen na měření intenzity chemiluminiscence [29].

### *Hmotnostní spektrometr*

Je dalším typem detektoru užívaným v GC (viz podrobně kap. 3.4)

### 3.3.4 Derivatizace v plynové chromatografii

Derivatizační techniky se zahrnují do kategorie reakční chromatografie proto, že využitím specifických reakcí buď před chromatografickou separací, anebo až po rozdělení látek před vstupem do detektoru docílujeme kvalitativně nových vlastností separovaných látek. Ty umožní separaci, zvýší citlivost a selektivitu detekce, usnadní jejich identifikaci

Analyzované látky se působením různých činidel převedou chemickou reakcí na deriváty, tj. na látky nové, s odlišnými chemickými a fyzikálně – chemickými vlastnostmi.

Důvodů vedoucích k derivatizaci v plynové chromatografii je více, ale nejvýznamnější jsou tyto:

Zvýšení těkavosti analyzovaných látek. Velmi mnoho organických látek není totiž možno chromatografovat v plynné fázi proto, že je nelze převést do plynného stavu anebo se při pokusu o zplynění rozkládají.

Zamezení nežádoucí sorpce. Toto se využívá všude tam, kde přítomná funkční skupina vytváří silné interakce se stacionární fází.

Zlepšení selektivity, zvýšení citlivosti a snížení limitu detekce. Jde především o to, že do molekuly separované látky se zavádějí při derivatizačním pochodu takové elementy, které vykazují selektivitu při určitém způsobu detekce [25].

#### 3.3.4.1 Nejvýznamnější derivatizační reakce využívané při GC

##### Acylderiváty

Acylačních reakcí se využívá k přípravě derivátů alkoholů, fenolů, aminů a thiolů. Vzniklé deriváty vykazují zpravidla nižší polaritu než původní látky a mají výhodnější chromatografické vlastnosti. Blokováním protonu nemůže docházet k jejich interakcím s okolními molekulami, zamezí se tak tvorbě vodíkových můstků. Ztráta možnosti tvorby vodíkové vazby vede dále ke zvýšení těkavosti derivátů ve srovnání s původními nederivatizovanými látkami [25].

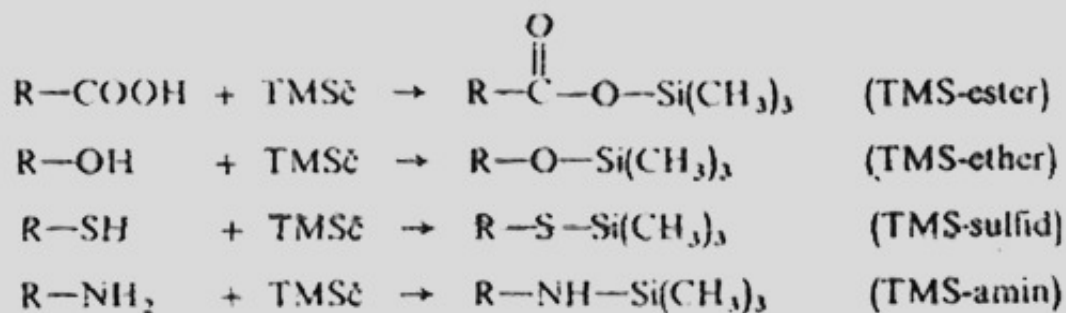


## Estery

Esterifikace je nejčastější derivatizační reakce mající zásadní význam pro analýzu karboxylových kyselin plynovou chromatografií. Estery jsou podstatně těkavější než jim odpovídající kyseliny. Estery nemohou vytvářet vazby vodíkovými můstky, nemohou disociovat, takže patří mezi látky s dobrými chromatografickými vlastnostmi. Z esterů se nejčastěji připravují methylestery [25].

## Silylderiváty

Silylačních reakcí se využívá v chromatografii velmi často. Principem je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující různé polární funkční skupiny s aktivním vodíkem, který je schopen reakce a nezáleží přitom na tom, zda-li je vodík vázán na kyslík, síru, síru či dusík. Reakční schéma je znázorněno na obr. 7 [25].



Obr. 7. Možnosti silylačních reakcí [25]

(TMS = trimethylsilyl-)

## **3.4 Hmotnostní spektrometrie**

### **3.4.1 Princip metody**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je technika, která převádí molekuly vzorku na ionty a ty pak separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Základními kroky v této technice jsou:

- 1) ionizace
- 2) akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru
- 3) separace iontů hmotnostním filtrem
- 4) detekce iontů [23]

Při vhodné interpretaci výsledků měření má metoda velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména plynovou a kapalinovou chromatografií) výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matrici [24].

### **3.4.2 Instrumentace**

Vzhledem ke konstrukční rozmanitosti současné instrumentace je možno u všech přístrojů identifikovat stejné základní stavební prvky.

Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu.

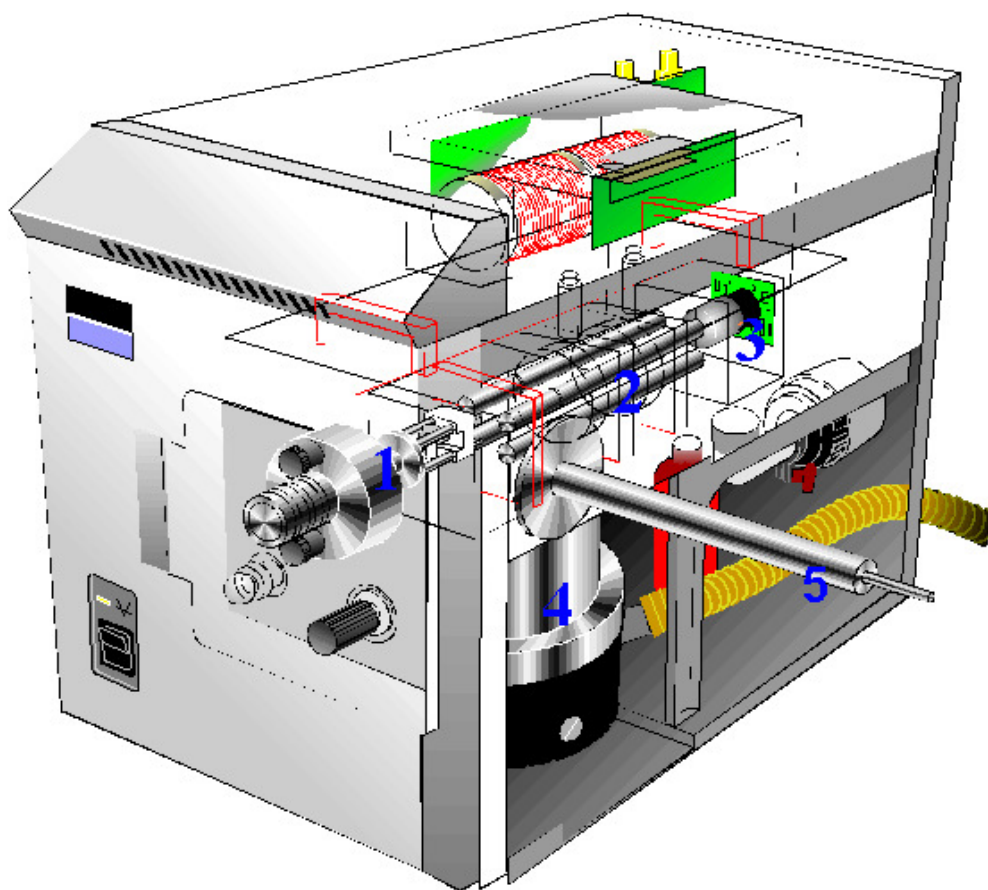
Hmotnostní analyzátor slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých  $m/z$ , produkovanou v iontovém zdroji.

Detektor, na který je směřován proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem, poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je po digitalizaci převeden do počítače a vhodným programovým vybavením zpracován do formy hmotnostních spekter. Kromě sběru dat v reálném čase a jejich zpracování zajišťuje počítač další řídicí a kontrolní funkce související s chodem přístroje a optimalizací jeho provozních parametrů [24].

Hmotnostní spektrometr je zařízení pracující za velmi nízkých tlaků. Nedílnou součástí zařízení je i výkonný, nejčastěji dvoustupňový vakuový

čerpací systém, umožňující držet dostatečně nízký tlak za všech provozních podmínek.

Další nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru je vhodný vstup umožňující převedení vzorku analyzované látky z prostředí vnějšího do prostoru iontového zdroje (interface, rozhraní). V případě kombinace hmotnostního spektrometru s plynovým chromatografem (GC-MS) je do prostoru iontového zdroje přiváděna mobilní fáze spolu s látkami vystupujícími z chromatografické kolony a to buď přímo a nebo přes vhodné rozhraní snižující podíl mobilní fáze [24].



Obr. 8. Schéma hmotnostního spektrometru

- 1-ionizační zdroj (interface, převodník)
- 2-kvadrupól
- 3-fotonásobič
- 4-turbomolekulární pumpa
- 5-transferline-spojení z GC

### 3.4.2.1 Iontový zdroj

Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj, ionizace analyzované látky je naprosto nezbytným předpokladem analýzy.

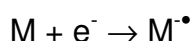
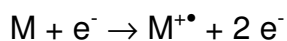
Použitý způsob ionizace ovlivňuje aplikační zaměření metody. Proces ionizace výrazně omezuje citlivost měření a dosažitelný limit detekce metody.

Podle množství dodané energie je obvyklé dělit ionizační techniky na tzv. měkké, při nichž je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a na tvrdé, při nichž dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Dalším třídícím kritériem je skupenství, ve kterém se látka nachází při ionizaci. Nejběžnější jsou techniky ionizace v plynné fázi – analyzovaná látka je předem odpařena do vakua a nutným předpokladem je její dostatečná těkavost. Techniky ionizace v kondenzované fázi, při nichž dochází k tvorbě iontů přímo ve fázi kapalné nebo tuhé, jsou vhodné zejména pro analýzu netěkavých látek [24].

#### Způsoby ionizace molekul

##### *Elektronová ionizace (electron ionization, EI)*

EI je příkladem tvrdé ionizační techniky v plynné fázi. Jedná se v současnosti o nejběžnější a nejlépe propracovaný způsob ionizace, používaný běžně u kombinace GC-MS. Energetickým procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce molekul analyzované látky M s proudem urychlených elektronů. Při této interakci může dojít k následujícím dějům:



Jako zdroj elektronů se nejčastěji používá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno (katoda). Velikost žhavicího proudu určuje množství emitovaných elektronů. Proud elektronů je směřován prostorem iontového

zdroje směrem k anodě. Potenciálový rozdíl mezi žhavenou katodou a anodou určuje energii elektronů, přicházejících do kontaktu s ionizovanou látkou. Za standard se považuje energie 70 eV, která ve většině případů zajišťuje vznik maximálního počtu iontů a jejich rozsáhlou fragmentaci. Pro zvýšení pravděpodobnosti interakce s molekulou se někdy dráha elektronů zakřivuje polem malého permanentního magnetu umístěného v prostoru ionizační komůrky. Vzniklé ionty jsou z prostoru ionizace vytlačovány elektrostatickým polem pomocné elektrody udržované na vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlen a směřován z iontového zdroje soustavou akceleračních a fokusačních elektrod [24].

#### *Chemická ionizace (chemical ionization, CI)*

CI je příkladem běžně používané měkké ionizační techniky z plynné fáze a spolu s ionizací EI se běžně využívá u kombinace GC-MS. Princip je analogický EI, ale ve zdroji je přítomen tzv. reakční plyn o tlaku 100 Pa. Nejdříve jsou ionizujícími elektrony ionizovány molekuly reakčního plynu, které potom ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu. Nejběžnějšími reakčními plyny jsou methan a amoniak [24].

#### *Ionizace polem (Field ionization, FI)*

Ionizačním prostředkem je v tomto případě silné elektrické pole, řádu  $10^7 - 10^8 \text{ V.cm}^{-1}$  vytvořené mezi ostrými hroty nebo hranami. Odstranění elektronu probíhá tunelovým jevem s menším přenosem vnitřní energie na molekulární nebo jemu podobný ion než při EI. Tento měkký ionizační proces poskytuje větší relativní četnost iontů, odpovídajících hmotností původní molekule, celkové množství vzniklých iontů je však nižší [30].

### *Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)*

Vzorek je rozpuštěn a smísen s vhodnou matricí a odpařen. krátký laserový puls je absorbován matricí, následně dojde k přenosu absorbované energie a ionizaci a desorpci iontů vzorku a jejich ion – molekulárním reakcím. Nejčastěji se užívají dusíkové UV či IČ lasery. Tento způsob ionizace se používá pro analýzu nejrůznějších biopolymerů [24].

### *Ionizační techniky za atmosferického tlaku (API techniky)*

Řadí se mezi měkké ionizační techniky v kapalně fázi, vhodné pro kombinaci hmotnostního spektrometru s kapalinovým chromatografem a kapilární elektroforézou. V současnosti se lze u komerční instrumentace nejčastěji setkat s těmito variantami:

- elektrosprejová ionizace (electrospray, ESI)
- chemická ionizace za atmosferického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)
- fotoionizace za atmosferického tlaku (atmospheric pressure photoionization, APPI) [24].

### **3.4.2.2 Hmotnostní analyzátory**

Slouží k rozdělení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle jejich  $m/z$  [24].

#### **3.4.2.2.1 Magnetický hmotnostní analyzátor**

Nejstarší, z hlediska hmotnostního rozsahu a rozlišení velmi kvalitní disperzní prvek, umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle hodnoty  $m/z$ . Bývá součástí hmotnostních spektrometrů s velmi vysokým rozlišením, jež jsou jen výjimečně přímo spojeny se separační metodou. Konstrukčně se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci mohou procházet ionty. Ionty rozdílných  $m/z$  opisují dráhy o různých poloměrech a dojde k prostorové disperzi iontů podle jejich hmotnosti [24].

#### **3.4.2.2.2 Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole, Q)**

Analyzátor je tvořen čtyřmi rovnoběžnými tyčovými elektrodami. Na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny elektrody je ještě současně superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. V závislosti na čase se mění velikost těchto napětí (skenování), přičemž jejich poměr zůstává stejný.

Ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a vlivem vložených napětí začne oscilovat. V daný časový okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$ , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu.

Při vhodně zvoleném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém  $m/z$  (SIM metoda selected ion monitoring), ostatní se dostanou na nestabilní trajektorie a zachytí se na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje. Zařízení se chová jako hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu  $m/z$  iontu. Změnou napětí vkládaných na kvadrupól je možno nechat tímto filtrem postupně projít ionty v celém intervalu hodnot  $m/z$  (SCAN mod) [23][29][31].

#### 3.4.2.2.3 Iontová past (Ion trap, IT)

Pracuje podobně jako kvadrupól, má však jen tři elektrody, z nichž jedna je kruhová a dvě vyklenuté do prostoru kruhu. Tento prostor je místem, ve kterém se shromažďuje oblak iontů. Ionty mohou být v iontové pasti zachovány milisekundy i podstatně déle. Je používán základní plyn helium o nízkém tlaku. Helium třením brzdí pohyb iontů a napomáhá jejich semknutí do oblaku v iontové pasti. Změnou nastavení veličin jsou ionty přiváděny odváděny k detektoru [23].

#### 3.4.2.2.4 Průletový analyzátor (Time of flight, TOF)

Je v principu nejjednodušším hmotnostním analyzátozem, tvořeným pouhou evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů s rozdílným  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Ionty s odlišným  $m/z$ , vystupující z iontového zdroje, mají při stejné kinetické energii rozdílnou rychlost. Těžší ion se pohybuje pomaleji a dorazí do detektoru později. Je zřejmé, že časová diference, a tedy i dosažitelné rozlišení budou záviset na délce dráhy, kterou ionty v trubici průletového analyzátoru urazí. Aby zařízení nemuselo být příliš rozměrné, často se konstruuje s tzv. reflektorem, elektrostatickým zrcadlem znásobujícím průletovou dráhu iontů. Hlavní předností tohoto zařízení je teoreticky neomezený hmotnostní dosah [24].

#### **3.4.2.3 Detektory iontů**

Iontové detektory převádějí proud dopadajících iontů na proud elektronů [23].

#### Faradayova klec

Jedná se o jednoduchý detektor, který tvoří konverzní elektroda (dynoda) miskovitého tvaru. Dopad iontu způsobí vyražením elektronu z povrchu. Elektron dopadá na anodu. Vzniklý elektrický proud je zesílen zesilovačem [23].



### Elektronové násobiče

Elektrody zesilují elektronový proud  $10^4$  až  $10^8$  krát. Dnes se většina elektronových násobičů konstruuje jako zužující se trubice, do jejíž širší části dopadají ionty. Potenciál tohoto konce je negativní až  $-3$  kV a postupně klesá k nule směrem k úzkému konci, který je uzemněn. Ion vyrazí elektron. Elektron dopadá na místo s méně negativním potenciálem a vyrazí další elektrony. Signál se dalšími nárazy elektronů zvětšuje. Zesílený proud elektronů je veden do zesilovače a je vyhodnocován [23].

### Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem

Detektor mění v konverzní elektrodě náraz iontu na vyražený elektron. Ten dopadá na fosforescenční stínítko a vyrazí foton. Foton je zachycen fotonásobičem [23].

### **3.4.3 Hmotnostní spektrum**

Hmotnostní spektrum je záznam iontů vzniklých z analyzované sloučeniny, uspořádaný podle vzrůstajícího poměru  $m/z$ , vyneseny proti absolutnímu či relativnímu zastoupení jednotlivých iontů. Na ose y je relativní intenzita v %, na ose x poměr  $m/z$

#### Píky ve spektru :

Hlavní pík – nejintenzivnější pík

Molekulární pík M – naznačuje molekulovou hmotnost analytu

Izotopické píky (M+1, M+2) - přirozeně se vyskytující izotopy [29][31].

## **3.5 Spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií (GC-MS)**

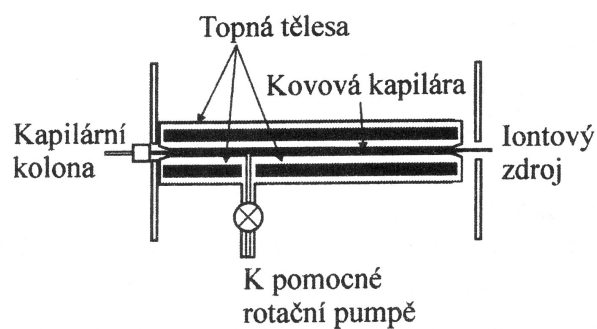
### **3.5.1 Způsoby spojení GC-MS**

Základním problémem spojení obou zařízení je jejich tlaková nekompatibilita. Tlak na výstupu kolony plynového chromatografu je přibližně atmosférický, ale iontové zdroje používané pro tuto kombinaci pracují optimálně za vakua. Zvýšení tlaku v iontovém zdroji a hmotnostním analyzátoru vede k výraznému poklesu citlivosti a zhoršení charakteru spekter (ztráta rozlišení, vyšší signál pozadí, změna poměrného zastoupení jednotlivých iontů aj.). Primárním předpokladem úspěšného spojení GC-MS je dostatečně výkonný čerpací systém, schopný s rezervou odčerpat nadbytek nosného plynu z prostoru ionizace. Ústí kolony je možno přímo propojit s iontovým zdrojem a při průtocích nosného plynu do  $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  je možno s běžnými čerpacími systémy udržet v EI zdroji dostatečně nízký tlak.

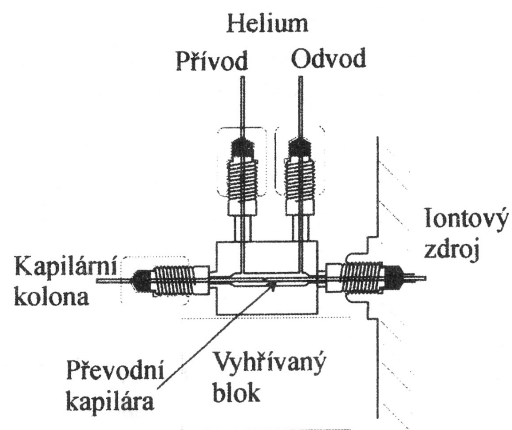
Ukázka jednoho běžně používaného způsobu spojení kapilární kolony plynového chromatografu s iontovým zdrojem je uvedena na obr. 9. Vlastní kolona je propojena s kovovou, nebo deaktivovanou křemennou kapilárou, jež je vedena vyhřívaným prostorem přímo do iontového zdroje. Přestupní část je rovnoměrně vyhřívána na teplotu vyšší, než je maximální teplota ohřevu separační kolony v plynovém chromatografu. Tím se zabraňuje kondenzaci separovaných látek před vstupem do hmotnostního spektrometru. Výhodné je, že pokud lze vnitřek vyhřívaného prostoru evakuovat, pak je možné provést výměnu separační kapiláry přímo za provozu bez nebezpečí zavzdušnění hmotnostního spektrometru. Nevýhodou uvedeného způsobu přímého spojení je závislost okamžitého tlaku v iontovém zdroji na průtokové rychlosti nosného plynu.

Tu je možno eliminovat s použitím způsobu propojení s tzv. otevřeným děličem, znázorněného na obr. 10. Konce separační kapiláry a převodní kovové nebo deaktivované křemenné kapiláry jsou orientovány proti sobě v uzavřeném a vyhřívaném převodním bloku, jež je promýván proudem helia. Množství nosného plynu vstupujícího do iontového zdroje, dané pouze rozměry převodní kapiláry a rozdílem tlaků mezi přestupním blokem a vnitřkem iontového zdroje, je nezávislé na průtokové rychlosti nosného plynu. Uvedený způsob spojení je

vhodný zejména pro hmotnostní spektrometry s méně výkonným čerpacím systémem a při použití krátkých kapilárních kolon větších vnitřních průměrů a vyššími průtoky nosného plynu [23][24][29][31].



Obr. 9. Přímé spojení kapilární kolony plynového chromatografu s iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru [24].



Obr. 10. Spojení kapilární kolony plynového chromatografu s iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru pomocí otevřeného děliče [24].

### **3.5.2 Aplikační oblast GC-MS**

Metoda GC-MS je s výhodou používána pro analýzu komplikovaných směsí látek, u nichž je identifikace komponent na základě porovnání retenčních časů nemožná, a pro komplexní vzorky obsahující neznámé složky. Díky vysoké citlivosti detekce hmotnostním spektrometrem sahá aplikovatelnost GC-MS do oblasti stopové a ultrastopové analýzy.

V zásadě je aplikovatelnost GC-MS omezena pouze požadavkem dostatečné těkavosti analyzované látky, jež musí projít separační kolonou. Odhaduje se, že tuto podmínku splňuje asi 10% známých organických látek (tj. asi 3 miliony) [24].

## **3.6 Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction)**

### **3.6.1 Úvod**

Extrakce na tuhou fázi (SPE) je v současné době nejvýkonnější technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Její podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které jsou v důsledku mezimolekulových interakcí adsorbovány na sorbent. Proto lze SPE nazvat také chemická filtrace.

SPE nabízí mnoho výhod oproti tradičním izolačním technikám, mezi něž patří zejména extrakce v soustavě kapalina-kapalina, a to především dobrou selektivitu a úsporu organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi látky jedovaté, ničící ozónovou vrstvu, ale i jinak nebezpečné.

Přestože se technika SPE rozvíjí teprve přes 20 let, je natolik výhodná, že se stala přednostně využívanou technikou úpravy vzorku. SPE lze snadno automatizovat a navázat na další instrumentální metody. Univerzálnost SPE jí dovoluje, aby byla užitečně používána pro různé účely:

- čištění vzorku
- zakoncentrování stopových množství látek
- výměna rozpouštědel (analyt je převeden z jedné specifické matrice do jiné, např. z vodné do organické)
- derivatizace (analyt je zachycován na sorbent, převeden na derivát a pak eluován) [23][32]

### **3.6.2 SPE příprava vzorků**

Neupravené vzorky jsou většinou nevhodné pro další chromatografické analýzy. Příčin může být celá řada:

- nízké koncentrace analytů
- interferující nečistoty
- vlastní matrice vzorku není slučitelná s chromatografickým systémem nebo je pro něj nebezpečná

SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na stacionární fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn. Po extrakci na tuhou fázi je analyt v roztoku, obsahuje minimum interferujících látek a je v dostatečné koncentraci.

Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii (HPLC), a proto i používané sorbenty jsou velice podobné a jejich nabídka je široká [32].

### 3.6.3 Instrumentace

SPE je velmi jednoduchou technikou. Základem je využití extrakčních kolonek na jedno použití o nejrůznějších velikostech a náplní sorbentů. V principu SPE pracuje takto:

- Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a součenniny jsou ze vzorku zachyceny materiálem sorbentu v koloně.
- Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly.
- Nakonec mohou být z kolonky žádoucí analyty znovuzískány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu. Tento extrakt má často podstatně vyšší koncentraci analytu než měl původní vzorek.

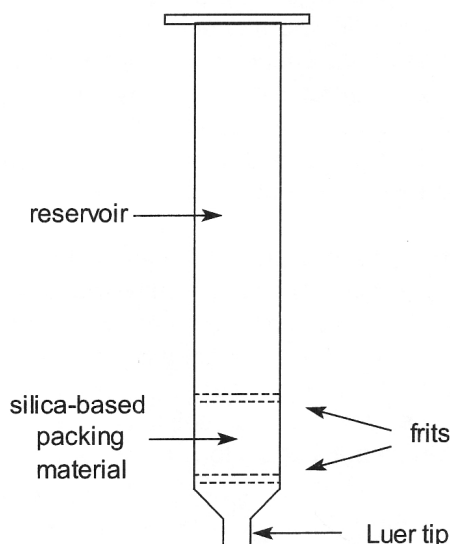
Alternativně může být extrakční kolonka vybrána k tomu, aby zadržovala příměsi ze vzorku, ale analytům dovolila projít. Průtok kapalin vedených přes kolonku může být urychlován vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky nebo centrifugací [23].

### 3.6.4 Sorbenty

#### Výběr vhodného sorbentu

Před výběrem vhodného sorbentu je třeba zjistit co nejvíce informací o vzorku, tzn., uvážit vlastnosti matrice a analytu, a na základě těchto znalostí potom zvolit typ fáze a velikost kolonky. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla nebo je slisován se skleněnými vlákny do disků. Sorbenty jsou v kolonce uzavřeny fritami z polypropylenu, případně oceli nebo polytetrafluorethylenu. Sorbent má větší zrnění než je tomu u HPLC, takže lze

pracovat při nízkém podtlaku či přetlaku. Používají se chemicky vázané obrácené fáze na bázi modifikovaného silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze, ale i celá řada dalších sorbentů [32].



Obr. 11. Schéma SPE kolonky [33].

### Výběr množství SPE sorbentu a velikost kolonky

Množství sorbentu, které má být použito, se řídí poměrně jednoduchými pravidly:

- obrácené a normální fáze, adsorbenty – obsah analytů, které mají být zachyceny, by neměl být větší než 5% hmotnosti sorbentu (pokud použijeme 100 mg v 1 ml trubičce, vzorek by měl obsahovat maximálně 5 mg analytů).
- iontoměniče – je třeba počítat s iontově výměnnou kapacitou sorbentu.

Pro volbu velikosti kolonky nebo disku uvádím pro představu tabulku 3 firmy Sigma-Aldrich s.r.o., která je výrobcem kolonek pro SPE [32].

Tab. 3. Tabulka pro volbu velikosti SPE kolonky nebo disku [32].

Množství vzorku	Velikost kolonky/ ø disku	Množství sorbentu
< 1 ml	1 ml	50 mg/100 mg
1 ml - 250 ml, pomalá rychlost extrakce	3 ml	500 mg
1 ml - 250 ml rychlé extrakce	6 ml	500 mg
10 ml - 250 ml, velká kapacita sorbentu	6, 12, 20 ,60 ml	1, 2, 10 g
< 1 litr	6, 12, 20 ,60 ml	1, 2, 10 g
100 ml - 1 litr	47 mm disk	-
> 1 l, velká kapacita sorbentu	90 mm disk	-

### Typy sorbentů a vznikající molekulární interakce

Kolonky SPE obsahují sorbenty založené nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Při této modifikaci se na povrchové silanolové skupiny chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu. Nechá-li se část silanolových skupin volných, spoluúčastní se na výsledných vlastnostech sorbentu (non end-capped = neuzavřený sorbent), jestliže se silanolové skupiny zcela pokryjí vázanou fází, uplatní se jen její vlastnosti (end-capped = uzavřený sorbent). Chemicky vázané fáze vznikají reakcí povrchové silanolové skupiny silikagelu s trialkyltrichlorsilany.

Při separaci jsou využívány různé mechanismy zachycování látek spočívající v odlišných molekulárních interakcích mezi analytem a sorbentem. Mezi běžně uplatňované interakce patří tyto:

- van der Waalsovy síly (nepolární interakce)
- vodíkové vazby a dipól – dipólové interakce (polární interakce)
- kation – aniontové interakce (iontové interakce typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty)



Každý sorbent má specifickou směs těchto vlastností. Hlavní interakci využívanou pro extrakci analytu označujeme jako primární, vedlejší působící interakce jako sekundární [23].

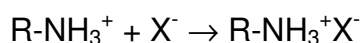
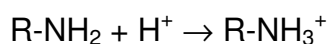
### *Nepolární vázané fáze*

Nepolární vázané fáze se vyznačují hydrofobními vlastnostmi. Lze je využít pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Připojí-li se k tomu u neuzavřených sorbentů uplatnění silanolových skupin, vzrůstá selektivita pro bazické sloučeniny. Obvykle se použití podobá aplikaci obrácených fází v HPLC, kde jako rozpouštědlo používáme polární kapalinu, ze které se nejselektivněji vážou nejméně polární látky [23].

### *Polární vázané fáze*

Polární vázané fáze jsou selektivní pro polární sloučeniny. U prvních dvou uvedených skupin ( viz tab. 3.) se sekundárně uplatňuje iontová výměna, protože silanolová skupina je slabě kyselá a vyměňuje kationty a aminopropylová skupina slabě zásaditá a vyměňuje anionty. Aktivní silanolové skupiny velmi ochotně zachycují vlhkost ze vzduchu, proto se musí kolonky uchovávat v suchém prostředí.

Aminopropyl zachycuje z nepolárních rozpouštědel, např. z hexanu, molekuly obsahující skupiny –OH, –NH<sub>2</sub> nebo –SH. Zmíněná iontová výměna se může uplatnit ve vodném prostředí o pH = 7,8 a nižším, neboť aminoskupina se hydrolyzuje a může k sobě poutat ionty:



Kyanopropylové skupiny zachycují nepolární i polární sloučeniny a mohou je extrahovat z vodných roztoků. Rovněž mohou zachycovat polární molekuly z méně polárních rozpouštědel dipól-dipólovou interakcí mezi kyanoskupinou a polární skupinou analytu. Také (2, 3-dihydroxypropoxy)propy-

lová skupina má strukturu, která umožňuje zachycování nepolárních i polárních molekul. Nejčastěji se používá pro extrakci polárních molekul z relativně nepolárních rozpouštědel s využitím tvorby vodíkových vazeb [23].

#### *Iontově-výměnné vázané fáze*

Použití aminopropylové vázané fáze již bylo zmíněno. Trimethylamoniumpropyl-chloridová fáze je silným iontoměníčem pro výměnu aniontů (anex) z vodných i nevodných roztoků náhradou za svůj chloridový anion. Benzensulfonová i propansulfonová kyselina jsou silnými iontoměníči pro výměnu kationtů (katexy). Prve uvedená kyselina vykazuje sekundárně také silné nepolární interakce. Karboxypropylová skupina je slabým iontoměníčem typu katex. Využívá se k extrakci bazických sloučenin z roztoků o pH = 6,8 a vyšším, kdy se karboxylová skupina výrazně disociuje [23].

Tab. 4. Nepolární, polární a iontově-výměnné sorbenty [23]

<b>Nepolární sorbenty</b>		<b>Polární sorbenty</b>		<b>Iontově-výměnné sorbenty</b>	
<i>označení</i>	<i>funkční skupina</i>	<i>označení</i>	<i>funkční skupina</i>	<i>označení</i>	<i>funkční skupina</i>
C <sub>18</sub>	oktadecyl	Silikagel	silanol	NH <sub>2</sub>	aminopropyl
C <sub>8</sub>	oktyl	NH <sub>2</sub>	aminopropyl	SAX	trimethylamoniumpropyl (kvarterní amin)
C <sub>2</sub>	ethyl	DIOL	3-(2,3-dihydroxypropoxy)propyl	CBA	karboxypropyl
CH	cyklohexyl	CN	kyanopropyl	SCX	benzensulfonová kyselina (4-sulfofenyl)
PH	fenyl			PRS	propansulfonová kyselina (3-sulfopropyl)
CN	kyanopropyl				

### 3.6.5 Selektivita SPE

Selektivitou je míněn stupeň oddělení analytu od ostatních příměsí v původním vzorku. Vysoce selektivní charakter SPE je způsoben dvěma hlavními faktory:

- Každý použitelný sorbent nabízí jedinečné charakteristické retenční vlastnosti dané primárními a sekundárními interakcemi, které kombinujeme s vlastnostmi analytu.
- Extrakci v systému kapalina-kapalina limituje nemísitelnost použitých kapalin. Např. vodný vzorek nemůže být extrahován do methanolu. V SPE je fází, na kterou se extrahuje, pevný sorbent (kapalina je chemicky navázána na nosiči) a pojem nemísitelnost ztrácí smysl. Výsledkem je velké množství použitelných kombinací sorbent – rozpouštědlo pro zajištění vysoce selektivní extrakce [23].

### 3.6.6 Postup SPE

Obvyklý postup SPE se skládá z pěti základních kroků:

#### 1) Příprava vzorku před extrakcí a výběr vhodné kolonky

Cílem je vytvořit vzorek, jehož fyzikální a chemické vlastnosti podporují zadržení analytů v extrakční kolonce. Tuhé vzorky je nutno převést do roztoku. Jindy mohou být tuhé látky extrahovány kapalinou před použitím SPE. Vzorky obsahující tuhé nečistoty vyžadují filtraci. Obsahuje-li vzorek částičky látky, na které se analyty adsorbují, musí se analyty nejdříve z těchto částiček desorbovat.

#### 2) Solvatace kolonky

Aby částičky silikagelu adsorbovaly analyt, je nezbytné smáčení fáze vázané na silikagel maticí vzorku. Smáčivost zajistíme solvatací.

#### 3) Aplikace vzorku

Vzorek se napipetuje do kolonky a nechá se dostatečný čas protékat. Zvláště při iontové – výměnné extrakci by příliš rychlé provedení mohlo způsobit, že se analyt nazadrží úplně. Pro kolonku se 100 mg náplně je v tomto

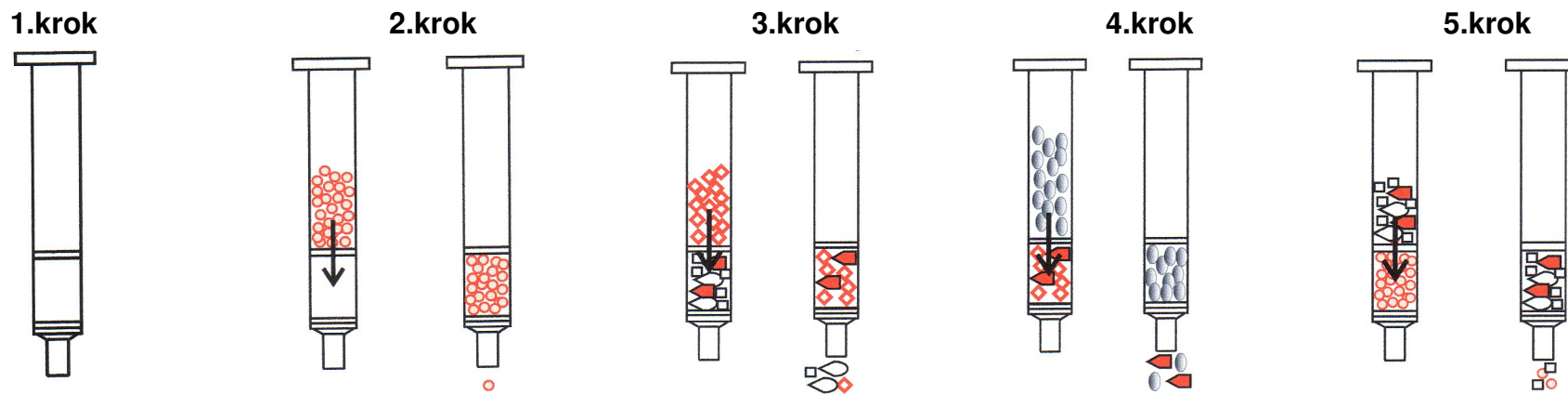
případě vhodný průtok 1 – 2 ml/min. Pro vyšší hmotnosti sorbentů je přiměřený vyšší průtok.

#### 4) Promývání kolonky

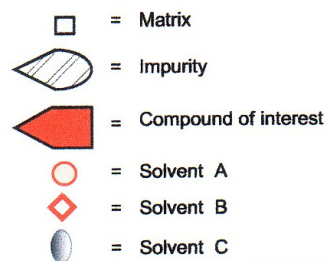
Účelem jednoho nebo více promývacích kroků je selektivně eluovat nežádoucí sloučeniny z vázaných fází, aniž by byly eluovány analyty. Často jsou velmi vhodnou volbou rozpouštědla, ve kterých jsou analyty nerozpustné. Používáme-li iontově – výměnné nebo nepolární sorbenty, je pro eluci nežádoucích příměsí důležité dodržování pH. Průtok pro eluci příměsí by měl být řízen. Při velkém průtoku by se nemusely příměsi dostatečně vymýt.

#### 5) Eluce analytu z kolony

Závěrečným stupněm v SPE extrakci je znovuzískání analytů z extrakční kolonky. To je provedeno promytím kolonky rozpouštědlem, které eluuje analyty z vázaných fází do vhodné jímací nádoby. Běžným minimálním elučním objemem je 250  $\mu$ l na 100 mg sorbentu. Opět je nezbytná kontrola rychlosti průtoku, protože při rychlém průtoku nemusí být všechen analyt kvantitativně elován [23][34].



legenda ke schématu



Obr. 12. Schématické znázornění jednotlivých kroků SPE [34]

(1.krok-výběr vhodné kolonky, 2.krok-solvatace kolonky, 3.krok-aplikace vzorku, 4.krok-promývání kolonky, 5.krok-eluce analytu z kolony)

### 3.6.7 Využití SPE pro frakcionaci lipidů

#### Frakcionace lipidů na SPE kolonkách naplněných silikagelem

Lipidové extrakty z biologického materiálu ještě obsahují mnoho tříd a skupin lipidů. Existuje málo technik, které by mohly být použity k izolaci každé z těchto sloučenin. Kolonová chromatografie se silikagelem jako adsorbentem se jeví jako vhodná metoda, pomocí které toho lze dosáhnout. Především SPE kolonky jsou vhodné pro tento účel, protože stupeň hydratace a tudíž adsorptivita silikagelu je důkladně kontrolována. Frakce izolované tímto způsobem mohou být později podrobněji analyzovány pomocí HPLC nebo GC [33].

Například Bitman et al. promývali SPE kolonku, naplněnou silikagelem, chloroformem (20 ml), aby eliminovali potencionální nečistoty před aplikací lipidového vzorku rozpuštěném v hexanu. Nepochární (jednoduché) lipidy, jako estery cholesterolu, TAG a cholesterol byly eluovány směsí hexan – diethylether (1:1, 40 ml) a komplexní lipidy byly získány nejprve elucí methanolem (20 ml) a následně eluovány směsí chloroform – methanol – voda (3:5:2, 20 ml) [35].

Hamilton et al. vyvinuli metodu, ve které estery cholesterolu a TAG eluovali směsí hexan – methyl $tert$ -butyl ether v poměrech 100:0,2 a 96:4. SPE kolonka byla okyselena promytím směsí hexan - kyselina octová (100:0,2) a volné mastné kyseliny byly eluovány směsí hexan – methyl $tert$ -butyl ether – kyselina octová (100:2:0,2). Poté byl eluován volný cholesterol, a to směsí methyl $tert$ -butyl ether – kyselina octová (100:0,2). Různé frakce obohacené obzvláště o fosfolipidy byly eluovány mobilní fází o vzrůstající polaritě. Tato mobilní fáze obsahovala methyl $tert$ -butyl ether, methanol a amonium acetátový pufr (pH 8,6) v různých poměrech [36].

Wang et al. potvrdili, že směs hexan – diethylether (98,5:1,5) eluuje čistou frakci esterů cholesterolu ze sérových lipidů s použitím SPE kolonky naplněné silikagelem [37].

### Frakcionace lipidů na SPE kolonkách s chemicky vázanými fázemi

Komerční SPE kolonky jsou dostupné s širokou paletou chemicky vázaných stacionárních fází. Tyto kolonky mají velký potenciál pro izolaci specifických lipidových tříd. Doposud bylo popsáno mnoho aplikací [33].

Kaluzny et al. byli mezi prvními, kteří použili kolonky s polymerně vázaným aminopropylem pro separaci lipidů. Tato metoda je schopná rozdělit 10 odlišných skupin lipidů, za použití elučních činidel o stoupající polaritě, s rozumným stupněm čistoty [38].

Pinkart et al. použili kolonky s polymerně vázaným aminopropylem pro separaci polyhydroxyalkanoátů, fosfolipidů, sterolů, TAG, diacylglycerolů, monoacylglycerolů a esterů sterolů z mikrobiální lipidové směsi [39].

Burdge et al. vyvinuli metodu pro rychlou separaci fosfatidylcholinu, neesterifikovaných mastných kyselin, esterů cholesterolu a TAG z celkového lipidového extraktu z plazmy, za použití aminopropylsilikagelových kolonek [40].

Giacometti et al. použili kolonky s vázaným aminopropylem pro separaci monoacylglycerolů, diacylglycerolů, TAG, sterolů a jejich esterů z tkáňových vzorků [41].

### **3.7 Využití izotopického značení v metabolických studiích**

Izotopově značená látka (tracer) je látka s molekulami označenými způsobem, který neovlivní její metabolický osud a je rovnoměrně rozptýlena mezi neoznačenými molekulami (tzv. tracee) v konkrétním metabolickém poolu. Pool je zásoba sledované látky v určitém kompartmentu, který může být velký (např. celková tělesná voda pro deuterium oxid nebo ureu) nebo naopak pouze intravaskulární (značené erythrocyty). Pro značení látek lze například využít stabilní či nestabilní (radioaktivní) izotopy. Stabilní izotop je jeden ze dvou či více forem prvku, který má ve svém jádře stejný počet protonů, ale odlišný počet neutronů a v elektronovém obalu stejný počet elektronů a nepodléhá samovolné přeměně doprovázené emisí částic. Tracery jsou využívány pro diagnózy onemocnění či objasnění metabolických pochodů v živých systémech. Využívají se pak měřící metody pozitronové emisní tomografie, magnetické resonance či hmotnostní spektrometrie.

Po rozptýlení traceru je odebrán vzorek materiálu k analýze. Vyextrahovaný vzorek je po chromatografické separaci analyzován hmotnostním spektrometrem. Výstupem je hmotnostní chromatogram, který zaznamená množství látky v přirozené formě a množství látky značené, tedy traceru. Hodnotí se poměr ploch pod křivkou (TTR – tracer/tracee ratio) odpovídající molárnímu poměru tracer vs. tracee a dále je stanoveno procento obohacení (APE – atom percent excess).

$$APE = AREA \text{ tracer} / (AREA \text{ tracer} + AREA \text{ tracee})$$

Metody sledování syntézy de novo jsou s využitím diluce značeného metabolitu v poolu či inkorporace prekursoru do metabolitu.

Pro stanovení rychlosti syntézy cholesterolu lze využít inkorporace substrátu označeného deuteriem. Deuterium je stabilní izotop vodíku a využívá se jako metabolický tracer, aplikovaný formou deuterium oxidu. Deuterium oxid (tzv. těžká voda) je používán jako tracer při metabolickém výzkumu již řadu desetiletí. Jeho aplikace je bezpečná jak perorálně, tak intravenózně, jediným známým nežádoucím účinkem je vertigo. Metodu lze využít pro stanovení inkorporace deuteria do řady metabolitů. Atomy deuteria se rozptýlí v tělesné



vodě, obohatí metabolický pool NADH a cestou jablečného enzymu i pool NADPH. Z tohoto zdroje a přímo z molekul tělesné vody je deuterium inkorporováno do cholesterolu syntetizovaného de novo. Ve studiích je pak sledována inkorporace deuteria do molekuly neesterifikovaného cholesterolu.

Pomocí GC-MS je stanoven isotope excess (IE) cholesterolu, který je ukazatelem rychlosti syntézy cholesterolu organismem [42].

## 3.8 Validace analytické metody

### 3.8.1 Přesnost

Přesnost analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi sérií měření mnohonásobného dávkování homogenního vzorku upraveného předepsaným postupem za předepsaných podmínek. Přesnost by měla být určována na třech úrovních: opakovatelnost, intermediární přesnost a reprodukovatelnost. Míra přesnosti je vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) v %.

Požadavek na přesnost pro biologický materiál  $RSD = 15\% - 20\%$ .

### 3.8.2 Správnost

Tento test charakterizuje těsnost shody mezi výsledkem analýzy  $C_i$  a přijatou referenční hodnotou  $C_0$ . Touto referenční hodnotou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je zaručena.

V případě, že se stanovovaná látka nachází v matrici, která může při měření interferovat, testuje se správnost metody pomocí standardního přídatku účinné látky, a to buď k samotné matrici nebo k analyzovanému přípravku, její známá koncentrace  $C_0$ , koncentrace stanovená u modelového vzorku je  $C_i$ .

Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti (Rec), která se vypočítá podle vzorce:

$$Rec (\%) = 100.C_i / C_0$$

Požadavek pro směrodatnou odchylku pro biologický materiál je  $RSD < 15\%$ .

### 3.8.3 Stabilita

Stabilita se testuje při uchování za daných podmínek

- Laboratorní teplota ( 22 °C)
- Lednice ( 4 °C)
- Mrazák ( - 25 °C)

Koncentrace je vyjádřena plochou píku  $St / IS$

Směrodatná odchylka plochy píku  $S_R (\%)$

$$S_R = 100 ( A_i - A_o ) / A_o$$

### 3.8.4 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tento test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky v rozmezí +/- 50% očekávané koncentrace. Připraví se pět vzorků standardní látky v uvedeném koncentračním rozmezí a každý se analyzuje třikrát.

Důležitou charakteristikou linearity přímky je korelační koeficient (R). Hodnoty blízké 1 signalizují požadovanou silnou lineární závislost.

### 3.8.5 Limit detekce, kvantifikace

*LOD (Limit of Detection)* – detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovaná kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. Definuje se jako pětinašobek směrodatné odchyly odezvy slepého pokusu – šumu.

*LOQ (Limit of Quantification)* – kvantifikační limit je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Definuje se jako desetinásobek směrodatné odchyly šumu.

Směrodatnou odchyly šumu lze odhadnout při měření blanku ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří největší kladná ( $r^+$ ) a záporná amplituda šumu ( $r^-$ ), z tohoto rozpětí šumu je možno odhadnout jeho směrodatnou odchyly vydělením pěti.

$$S_n = (r^+ + r^-) / 5$$

Detekční a kvantitativní limit se vypočtou podle vzorců:

$$LOD = 3 \cdot S_n \cdot K / b_1$$

$$LOQ = 10 \cdot S_n \cdot K / b_1$$

Kde K ( plocha píku / výška píku) je poměr charakteristický pro stanovovanou látku a  $b_1$  ( plocha píku / koncentrace analytu ) je poměr daný směrnici regresní rovnice [43] [44]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Přístroje a pomůcky

- plynový chromatograf Fisons Instruments GC 8000 series (Pragolab, CZ), software Clarity (DataApex), kapilární kolona SPB – 5, ( 30 m × 0,53 mm × 1,5 μm ) ( Supelco, MO)
- plynový chromatograf AutoSystem XL ( vybavený autosamplerem) spojený s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem TurboMass (Perkin Elmer, Norwalk, CT), kapilární kolona CP–Sil 8 CB–MS (Supelco, Bellefonte, MO) 60 m × 0,32 mm, tloušťka filmu 0,5 μm, Turbomass software ( Perkin Elmer, Norwalk, CT)
- laboratorní rotátor Stuart SB3 ( Biolote, Velká Británie)
- chlazená centrifuga HERAEUS 400 R ( Hanau, Německo)
- analytické váhy A + D company 202 M (Hradec Králové, Česká republika)
- AD Koncentrátor 5301 Eppendorf (MEDESA, Polička, Česká republika)
- homogenizátor IKA T10 Ultra – Turrax ( IKA – WERKE, Německo)
- termoblok QBT 2 ( Tectra a.s., Praha)
- UV lampa (Osram, Mnichov, Německo)
- statistický software SigmaStat (Systat Software GmbH, Německo)
- TLC hliníkové fólie Silikagel 60, tloušťka vrstvy 0,2 mm, 5x10 cm (Merck, Německo)
- SPE kolonky Strata SI-1 Silica (55 μm, 70 Å), 1000 mg/6 ml (Phenomenex, USA)
- injekční jehly Medoject 0,6x25 mm (Chirana T. Injecta, Brno, Česká republika)
- Free cholesterol C test kit (Wako, Německo)
- autosamplerové vialky ( 1 ml)
- skleněné vialky s teflonovým víčkem ( 5 ml, 10 ml)
- vakuové odběrové zkumavky ( Vacuette Greiner Bio – one , Rakousko)
- skleněná Pasteurova pipeta ( 1,5 ml)

## 4.2 Chemikálie

- n-hexan p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- methanol p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- ethanol p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- diethylether p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- ethylacetát p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- kyselina octová p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- hydroxid draselný p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- pyridin p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- redestilovaná destilovaná voda (GORO, Praha, Česká republika)
- fyziologický roztok (Braun Melsungen, Německo)
- chloroform p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- 5  $\alpha$  – cholestan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- cholesterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- cholesterypalmitát (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2', 7' - dichlorofluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- N, O – bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), (Supelco, USA)
- helium 5.5 (SIAD, Braňany u Mostu)
- vodík 4.0 (SIAD, Braňany u Mostu)
- vzduch 2.2a (SIAD, Braňany u Mostu)
- dusík 5.0 (SIAD, Braňany u Mostu)

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Standardní roztoky

- Zásobní roztok cholesterolu 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 3,87 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterolu 3 mmol/l byl připraven rozpuštěním 11,60 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterolu 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 19,34 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterolu 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 38,67 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterolu 15 mmol/l byl připraven rozpuštěním 58,01 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterolu 20 mmol/l byl připraven rozpuštěním 77,34 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterolu 25 mmol/l byl připraven rozpuštěním 96,68 mg cholesterolu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 6,25 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 3 mmol/l byl připraven rozpuštěním 18,75 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 31,25 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 62,51 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 15 mmol/l byl připraven rozpuštěním 93,76 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 20 mmol/l byl připraven rozpuštěním 125,02 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Zásobní roztok cholesterylpalmitátu 25 mmol/l byl připraven rozpuštěním 156,27 mg cholesterylpalmitátu a doplněn na 10 ml hexanu.
- Standardní roztok 5  $\alpha$  – cholestanu 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 37,20 mg 5  $\alpha$  – cholestanu a doplněn na 10 ml hexanu.

### 4.3.2 Pracovní roztoky

- Pracovní roztok cholesterylpalmitátu byl připraven zředěním zásobního roztoku cholesterylpalmitátu 5 mmol/l hexanem na  $c = 2,5$  mmol/l.
- Pracovní roztok cholesterylpalmitátu byl připraven zředěním zásobního roztoku cholesterylpalmitátu 15 mmol/l hexanem na  $c = 7,5$  mmol/l.
- Pracovní roztoky pro limit detekce TMS-cholesterolu byly připraveny zředěním zásobního roztoku cholesterolu 1 mmol/l hexanem na  $c = 100$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $c = 50$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $c = 10$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $c = 1$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $c = 5$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $c = 100$  nmol/l,  $c = 50$  nmol/l,  $c = 10$  nmol/l

## **4.4 Vývoj a optimalizace metody**

### **4.4.1 Odběr a příprava vzorku**

#### **4.4.1.1 Krev**

Vzorek odebrané krve se centrifuguje (1,9 G, 10 min., 4 °C) a odebere se krevní sérum.

#### **4.4.1.2 Tkáň**

Homogenát – analyzovaný materiál (nadledviny) se nastříhá na menší části, přenese se do zkumavky, přidá se voda (dvojnásobek navážky tkáně) a zhomogenizuje se.

### **4.4.2 Postup extrakce lipidů ze vzorku**

- Do extrakční vialky se napipetuje 4 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 2:1.
- K této směsi se napipetuje 1 ml vzorku (homogenát nadledvin, sérum).
- Nechá se extrahovat 15 minut na rotátoru.
- Zcentrifuguje se (10 minut, 3000 G, 8 °C).
- Spodní chloroformová vrstva, která obsahuje lipidy, se odebere skleněnou Pasteurovou pipetou a přenese se do další vialky.
- Spodní chloroformová vrstva se promyje 800 µl fyziologického roztoku a směs se zcentrifuguje (10 minut, 3000 G, 8 °C).
- Spodní chloroformová vrstva se opět skleněnou Pasteurovou pipetou přenese do další vialky a nechá se odpařit v koncentrátoru do sucha (program 2 - pro těkavá organická rozpouštědla, 60 °C).



### 4.4.3 Postup TLC

- Odparek vyextrahovaných lipidů se rozpustí ve 100  $\mu$ l hexanu.
- Připraví se mobilní fáze (80 ml hexanu + 20 ml etheru + 1 ml kyseliny octové).
- Do chromatografické komory vyložené filtračním papírem se nalije mobilní fáze, komora se uzavře a nechá se nasytit parami mobilní fáze.
- Na tenké vrstvě se ve výši 2 cm od spodního okraje označí tzv. start (počátek chromatogramu) a body pro nanesení vzorků a 1 cm od horního okraje tenké vrstvy se označí cíl.
- Na označená místa se nanese 25  $\mu$ l vzorku a 25  $\mu$ l standardu volného cholesterolu v hexanu ( $c = 5$  mmol/l) a standardu cholesterylpalmitátu v hexanu ( $c = 7,5$  mmol/l).
- Vyuvíjení se ukončí, jakmile čelo mobilní fáze dosáhne označeného cíle.
- Chromatogram se vysuší a skvrny na tenké vrstvě se detegují postřikem 2', 7'- dichlorofluoresceinu (0,2%ní roztok v 95%ním ethanolu).
- Chromatogram se vysuší a prohlíží se po ozáření ultrafialovými paprsky (366 nm). Neutrální lipidy se jeví jako žluté skvrny na purpurovém pozadí a vzorek se identifikuje srovnáním se standardy.
- Skvrny charakterizující volný cholesterol a estery cholesterolu se označí a následně se z tenké vrstvy vyškrabou do jednotlivých označených zkumavek.
- Volný cholesterol a estery cholesterolu se extrahují ze silikagelu dvakrát 500  $\mu$ l diethyletheru (k silikagelu se přidá 500  $\mu$ l diethyletheru, protřepe se a diethyletherový extrakt se skleněnou Pasteurovou pipetou odebere do zkumavky).
- Diethyletherový extrakt se promyje dvakrát 1 ml vody, protřepe se a horní vrstva se odebere do extrakční vialky.
- Promytý diethyletherový extrakt se odpaří pod proudem dusíku
- Estery cholesterolu musí být hydrolyzovány. Do vialky se přidá 1 ml 96% etanolu a 70  $\mu$ l nasyceného vodného roztoku KOH. Viala se umístí na 1 hodinu do termobloku zahřátého na 80  $^{\circ}$ C.

- Po alkalické hydrolyze se do vialky přidá 1 ml vody a lipidy se extrahují třikrát s 1 ml hexanu (tzn., přidá se 1 ml hexanu, protřepe se, nechá se odsadit a horní vrstva se stáhne do jiné vialky, totéž se opakuje ještě dvakrát).
- Hexanový extrakt lipidů se odpaří v koncentrátoru do sucha (program 2, 60 °C).
- Do vialky se k odparku napipetuje ještě 100 µl vnitřního standardu (IS), což je v tomto případě 5 α-cholestane v hexanu (c=1 mmol/l).
- Vialka se umístí opět do koncentrátoru a odpaří se do sucha (program 2, 60 °C).
- Do vialky se přidá 100 µl směsi derivatizačního činidla BSTFA a pyridinu v poměru 1:1, vialka se uzavře víčkem a nechá se derivatizovat 45 minut v termobloku při 75 °C.
- Vzorky se analyzují metodou GC.

#### 4.4.4 Postup SPE

- Odparek vyextrahovaných lipidů se rozpustí v 1 ml hexanu.
- SPE kolonka se promyje 5 ml hexanu a na kolonku se aplikuje 1 ml vzorku.
- Estery cholesterolu se eluují ze vzorku jako první, a to 10 ml směsí hexan – ethylacetát (95:5)
- Následuje eluce volného cholesterolu ze vzorku, a to 10 ml směsí hexan – diethylether – ethanol (25:25:50)
- Eluované frakce obsahující estery cholesterolu a volný cholesterol se odpaří v koncentrátoru do sucha (program 2, 60 °C).
- Estery cholesterolu musí být hydrolyzovány. Do vialky se přidá 1 ml 96% etanolu a 70 µl nasyceného vodného roztoku KOH. Vialka se umístí na 1 hodinu do termobloku zahřátého na 80 °C.
- Po alkalické hydrolýze se do vialky přidá 1 ml vody a lipidy se extrahují třikrát s 1 ml hexanu (tzn., přidá se 1 ml hexanu, protřepe se, nechá se odsadit a horní vrstva se stáhne do jiné vialky, totéž se opakuje ještě dvakrát).
- Hexanový extrakt lipidů se odpaří v koncentrátoru do sucha (program 2, 60 °C).
- Do vialky se k odparku napipetuje ještě 100 µl vnitřního standardu (IS), což je v tomto případě 5 α-cholestane v hexanu (c=1 mmol/l)
- Vialka se umístí opět do koncentrátoru a odpaří se do sucha (program 2, 60 °C).
- Do vialky se přidá 100 µl směsí derivatizačního činidla BSTFA a pyridinu v poměru 1:1, vialka se uzavře víčkem a nechá se derivatizovat 45 minut v termobloku při 75 °C.
- Vzorky se analyzují metodou GC.

## **4.4.5 Chromatografické podmínky**

### **4.4.5.1 Analýza na přístroji GC – FID**

Pro analýzu vzniklého derivátu byly použity tyto parametry :

Injektor : 300 °C

Kolona : kapilární SBP – 5

Nosný plyn : helium o tlaku 100 kPa

Teplotní program kolonového termostatu : izotermální 320 °C

Teplota detektoru : 330 °C

Průtok vodíku detektorem : 90 ml/min

Průtok vzduchu detektorem : 490 ml/min

### **4.4.5.2 Analýza na přístroji GC – MS**

Pro analýzu vzniklého derivátu byly použity tyto parametry :

Injektor : 320 °C

Kolona : kapilární CP – Sil 8 CB – MS

Nosný plyn : helium o tlaku 100 kPa

Teplotní program kolonového termostatu : izotermální 320 °C

Elektronová ionizace

Teplota ionizačního zdroje : 280 °C

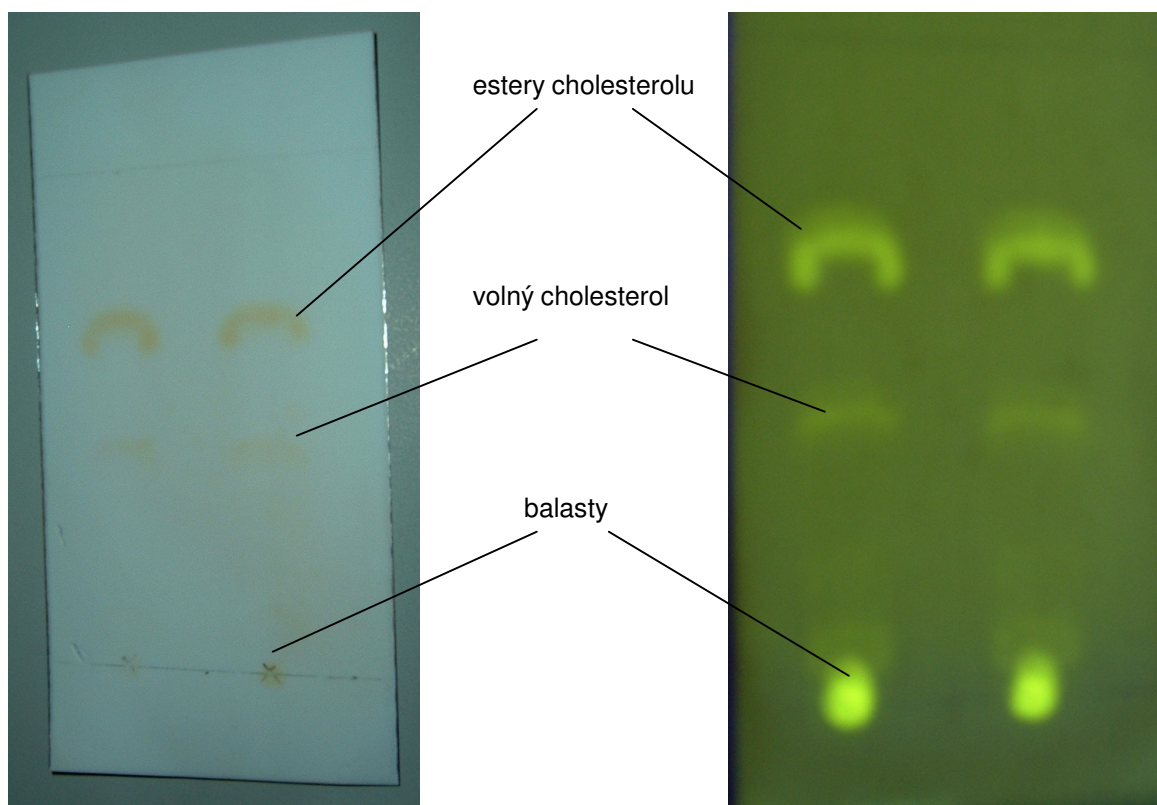
Ionizační energie: 70 eV

Byly monitorovány fragmenty ( m/z) 368, 369 a 370, SIM mode pro vzniklý derivát cholesterolu.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 TLC

Separace volného a esterifikovaného cholesterolu pomocí TLC byla úspěšná. Tato metoda se však neosvědčila v této aplikaci především vzhledem k malému množství extraktu, který je možné separovat a následně nedostatečnému množství derivátů cholesterolu pro GC-MS analýzu. Inkorporace deuteria do cholesterolu v podmínkách in vivo dosahuje pouze několika procent poměru  $^2\text{H}/^1\text{H}$  a pro stanovení tohoto poměru s dostatečnou přesností je nutné značné množství analytu v hmotnostním detektoru. Zároveň je TLC významně méně robustní metodou při zpracovávání většího množství vzorků, zvláště při zapojení většího počtu osob do procesu přípravy vzorků.



Obr. 13. Rozdělení volného a esterifikovaného cholesterolu na tenké vrstvě

## 5.2 SPE

### 5.2.1 Optimalizace SPE metody

Popsaná metoda SPE je výsledkem optimalizace eluce. V průběhu optimalizace metody byly testovány různé druhy elučních činidel pro separaci volného a esterifikovaného cholesterolu. Koncentrace cholesterolu ve vzorku byla stanovena po proběhlé alkalické hydrolýze, a to enzymatickou kolorimetrickou metodou.

#### Schéma optimalizace

##### *Pokus č. 1*

Eluce esterů cholesterolu: **hexan – ethylacetát (90:10)**

Eluce volného cholesterolu: **hexan – diethylether – ethanol (25:25:50)**

##### *Pokus č. 2*

Eluce esterů cholesterolu: **hexan – ethylacetát (95:5)**

Eluce volného cholesterolu: **hexan – diethylether – ethanol (25:25:50)**

##### *Pokus č. 3.*

Eluce esterů cholesterolu: **hexan – ethylacetát (99:1)**

Eluce volného cholesterolu: **hexan – ethylacetát (85:15)**

##### *Pokus č. 4.*

Eluce esterů cholesterolu: **hexan – ethylacetát (95:5)**

Eluce volného cholesterolu: **hexan – ethylacetát (85:15)**

Nejlepších výsledků eluce (nejvyšší koncentrace esterifikovaného a volného cholesterolu) bylo dosaženo za použití elučních činidel z pokusu č. 2. V ostatních případech (pokus č. 1, 3, 4) docházelo k tomu, že se frakce volného cholesterolu eluovala už s estery cholesterolu nebo naopak – estery cholesterolu se eluovaly až s frakcí volného cholesterolu – docházelo tedy k neuspokojivé separaci volného a esterifikovaného cholesterolu (viz tab. 5).

Tab. 5. Kocentrace eluátů po SPE – optimalizace SPE metody

Pokus č.	koncentrace cholesterolu (mmol/l)					
	Eluce esterů cholesterolu			Eluce volného cholesterolu		
	eCH	fCH	směs	eCH	fCH	směs
1	6,248	3,451	5,214	< 0,01	2,687	1,429
2	6,587	< 0,01	3,175	< 0,01	4,285	2,125
3	5,062	0,039	2,779	0,229	2,984	1,485
4	6,423	< 0,01	3,045	0,085	4,159	1,986

eCH = estery cholesterolu, fCH = volný cholesterol

Koncentrace eluátů po adsorpci vzorku byly vždy < 0,01 mmol/l.

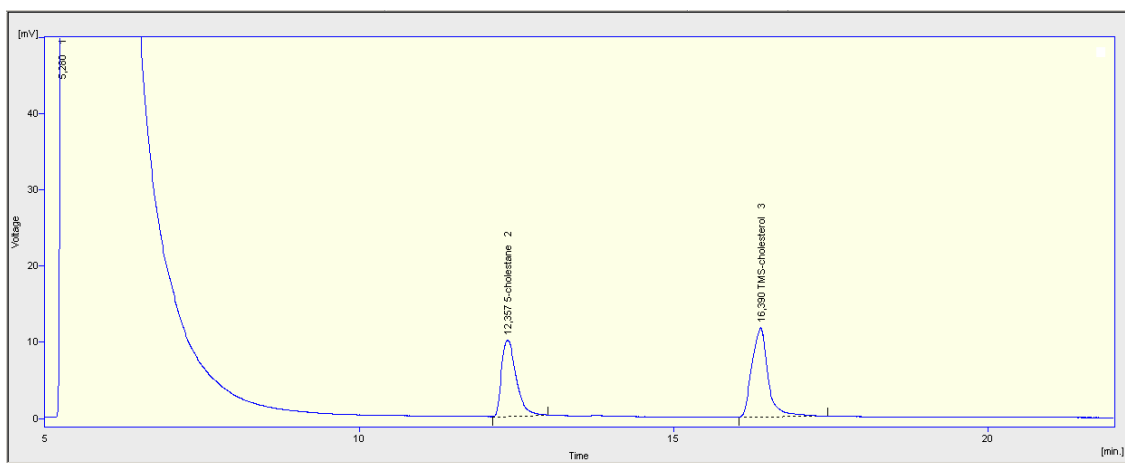
Eluovány byly 3 vzorky standardních roztoků:

- estery cholesterolu o koncentraci 7,5 mmol/l
- volný cholesterol o koncentraci 5 mmol/l
- směsný vzorek esterů (3,75 mmol/l) a volného cholesterolu (2,5 mmol/l)

## 5.3 GC analýza

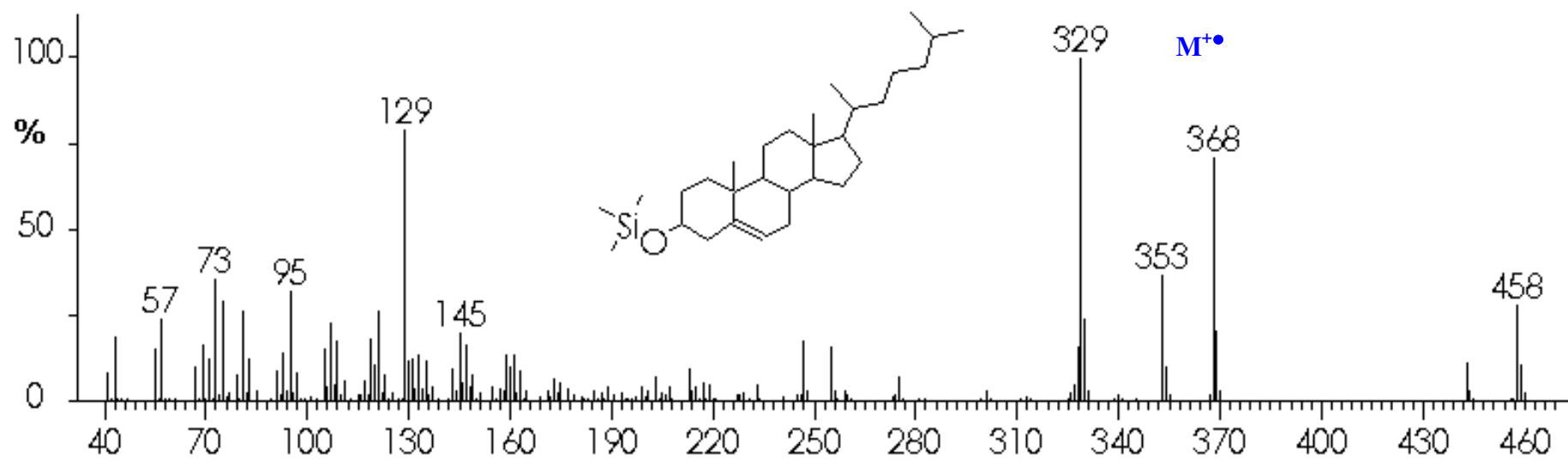
### Retenční čas

Retenční čas vzniklého derivátu cholesterolu a IS za uvedených chromatografických podmínek byl : IS (5  $\alpha$ -cholestan) 12,3 min a TMS-cholesterol 16,4 min.



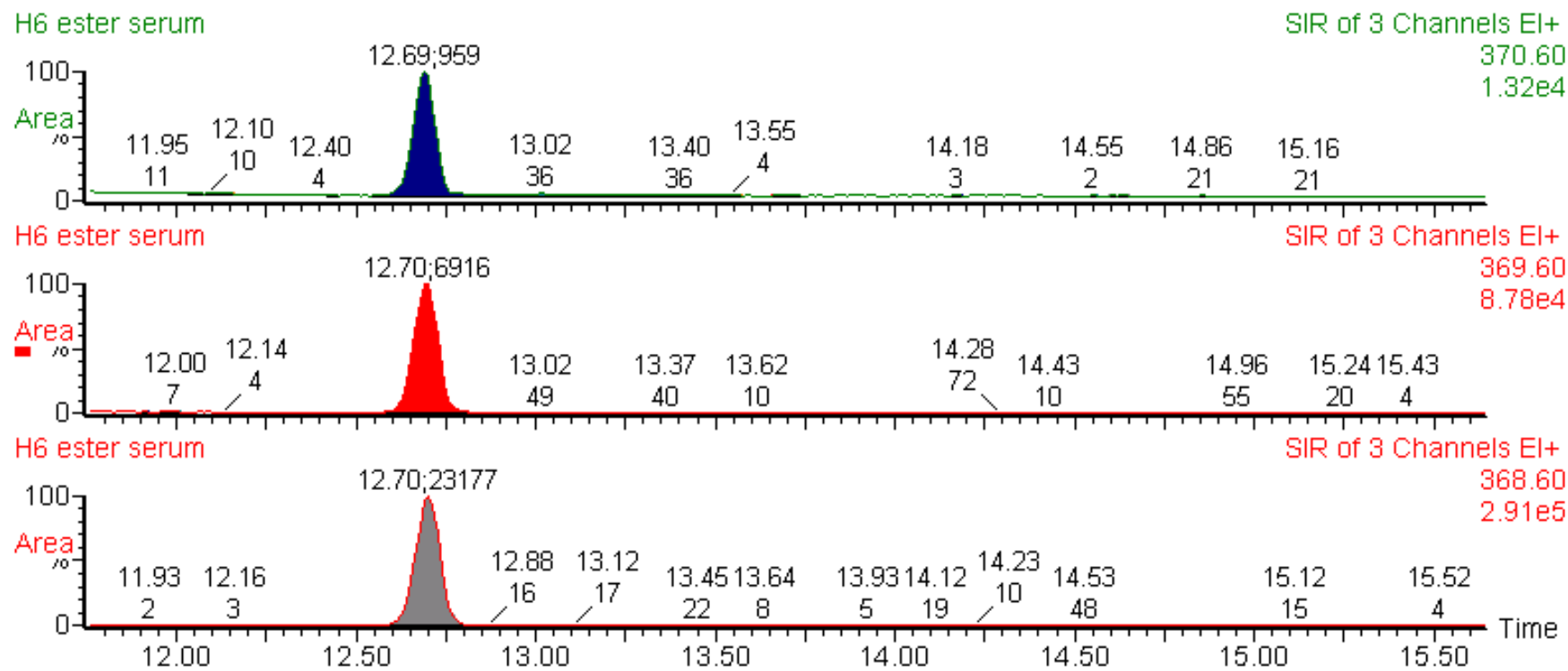
Obr. 14. Chromatografický záznam analytu z homogenátu nadledvin (GC-FID)





Obr. 15. Hmotnostní spektrum TMS-cholesterolu

Při EI je intenzivním iontem ve spektru  $M^{+\bullet}$  (368,6), který byl vybrán pro kvantifikaci v módu SIM. Odpovídajícím způsobem byly kvantifikovány izotopy  $M+1$  (369,6) a  $M+2$  (370,6) - viz obr. 16



Obr. 16. Chromatografický záznam analýzy (GC-MS, EI, SIM)

## 5.4 Validace SPE metody

Byly stanoveny tyto validační parametry :

- linearita
- správnost
- přesnost
- detekční a kvantifikační limit
- stabilita

### 5.4.1 Linearita

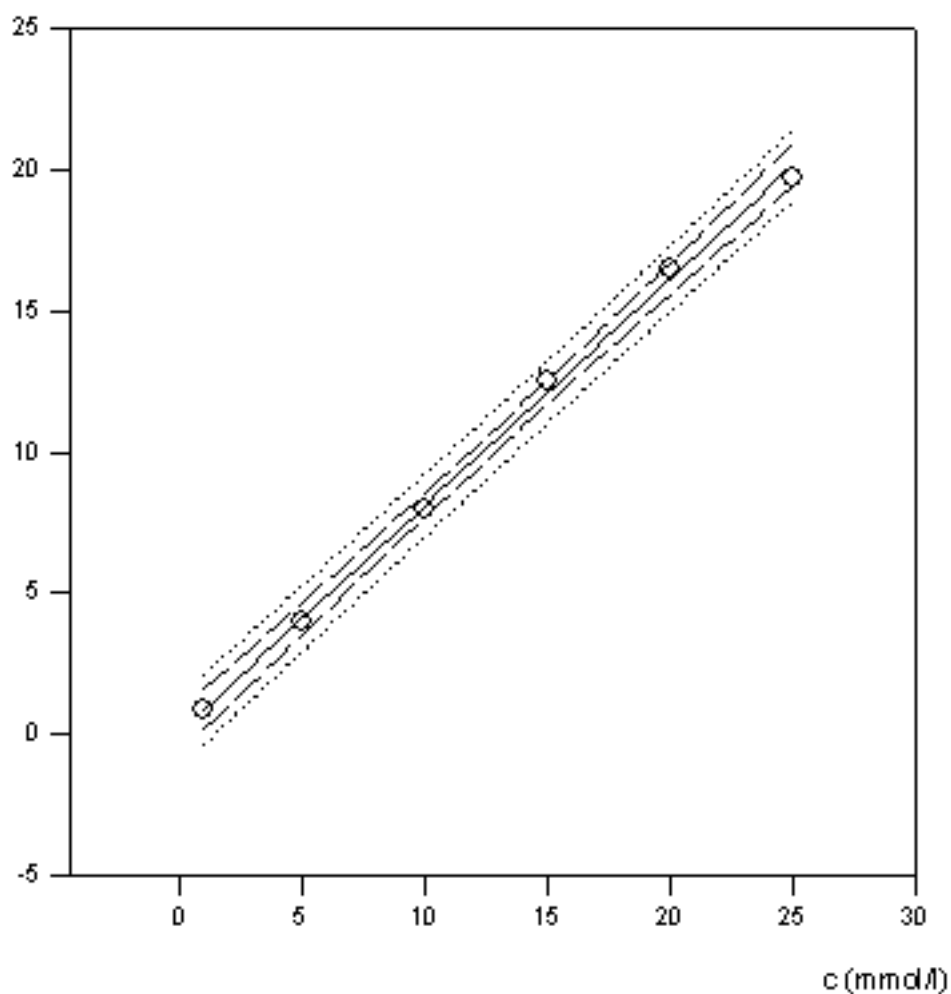
#### 5.4.1.1 Estery cholesterolu

Linearita byla testována v rozsahu koncentrací 1 mmol/l až 25 mmol/l esterů cholesterolu. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr.

Tab 6. Linearita – estery cholesterolu – hodnoty poměru Area (TMS-cholesterol)/Area (IS) při různých koncentracích

<i>c St</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/Area (IS)</i>
<b>1 mmol/l</b>	119562	138349	0,86421
	133016	154907	0,85868
	64184	79816	0,80415
			<b>0,84235</b>
<b>5 mmol/l</b>	352009	89088	3,95125
	344780	86364	3,99217
	188778	46980	4,01826
			<b>3,98723</b>
<b>10 mmol/l</b>	284219	36229	7,84507
	593840	73812	8,04530
	423320	52907	8,00121
			<b>7,96386</b>
<b>15 mmol/l</b>	653599	51764	12,62652
	725929	58790	12,34783
	351003	27788	12,63146
			<b>12,53527</b>
<b>20 mmol/l</b>	1513227	104985	14,41374
	2011311	106215	18,93622
	1121523	69549	16,12565
			<b>16,49187</b>
<b>25 mmol/l</b>	1427914	69650	20,01278
	1166523	61114	19,08766
	366395	18792	19,49739
			<b>19,69544</b>

Area TMS-chMS



Obr. 17. Kalibrační přímka TMS-cholesterolu pro estery cholesterolu (osa x – koncentrace St esteru cholesterolu = cholesterylpalmitát, osa y – poměr Area (TMS-cholesterol)/Area (IS))

Parametry regresní přímky TMS-cholesterolu pro estery cholesterolu:

$$A_{CH} / A_{IS} = 0,0948 + [0,802 * c \text{ (mmol/l)}]$$

$A_{CH}$ ..... Area (TMS-cholesterol)

$A_{IS}$  .....Area (IS)

Korelační koeficient je 0,998, závislost odezvy detektoru na koncentraci látky je lineární.

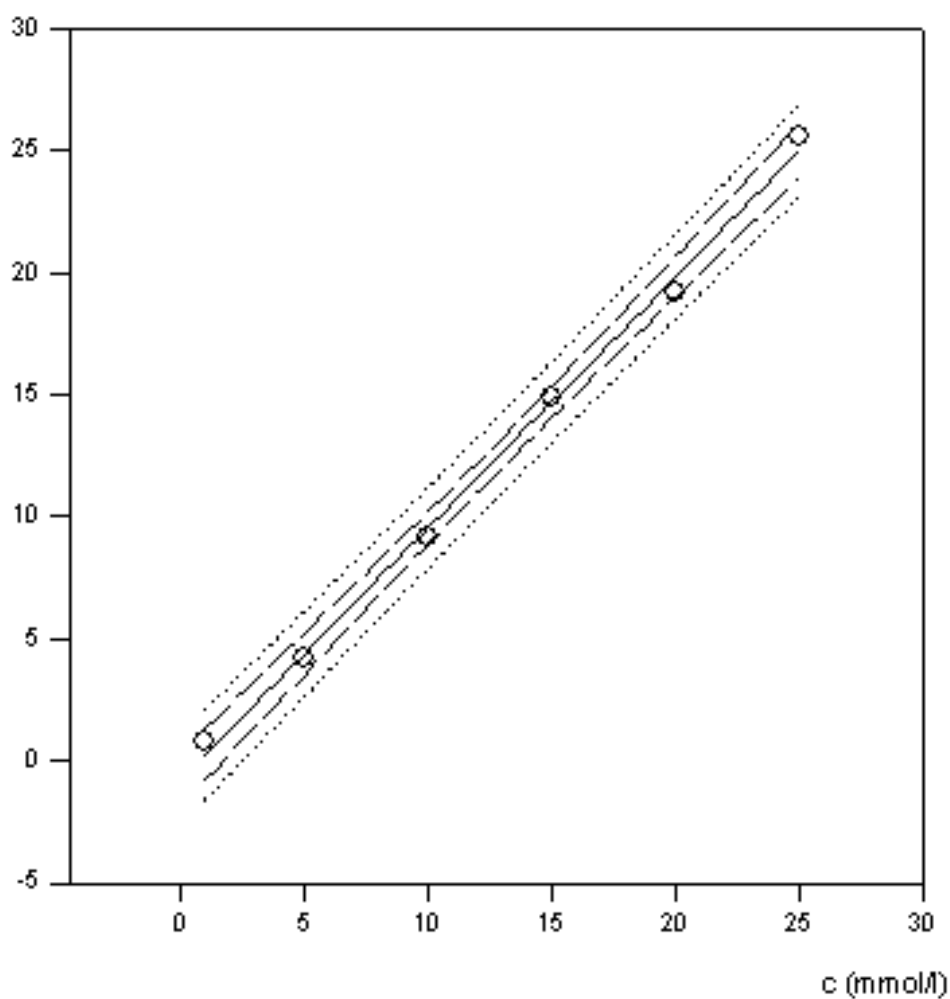
### 5.4.1.2 Volný cholesterol

Linearita byla testována v rozsahu koncentrací 1 mmol/l až 25 mmol/l volného cholesterolu. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr.

Tab. 7 Linearita – volný cholesterol – hodnoty poměru Area (TMS-cholesterol)/Area (IS) při různých koncentracích

<i>c St</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/Area (IS)</i>
<b>1 mmol/l</b>	433589	618074	0,70152
	214921	242978	0,88453
	23240	30649	0,75826
			<b>0,78144</b>
<b>5 mmol/l</b>	1881863	388316	4,84622
	883108	238968	3,69551
	541680	138338	3,91563
			<b>4,15245</b>
<b>10 mmol/l</b>	3919300	397890	9,85021
	2889674	299180	9,65865
	388861	48456	8,02503
			<b>9,17796</b>
<b>15 mmol/l</b>	584145	42933	13,60597
	481127	33400	14,40500
	546740	32993	16,57139
			<b>14,86079</b>
<b>20 mmol/l</b>	803461	41782	19,22984
	76449	4078	18,74669
	468369	23727	19,73992
			<b>19,23881</b>
<b>25 mmol/l</b>	889170	35792	24,84270
	626323	26323	23,79375
	975813	34661	28,15305
			<b>25,59650</b>

Area TMS-chMS



Obr. 18 Kalibrační přímka TMS-cholesterolu pro volný cholesterol  
(osa x – koncentrace  $S_t$  volného cholesterolu, osa y – poměr  
Area (TMS-cholesterol)/Area (IS))

Parametry regresní přímky TMS-cholesterolu pro volný cholesterol:

$$A_{CH} / A_{IS} = -0,754 + [1,031 * c \text{ (mmol/l)}]$$

$A_{CH}$ ..... Area (TMS-cholesterol)

$A_{IS}$  .....Area (IS)

Korelační koeficient je 0,997, závislost odezvy detektoru na koncentraci látky je lineární.

## 5.4.2 Správnost

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídávku ke vzorku (sérum, homogenát nadledvin), přidávány byly tři koncentrační úrovně, od každé koncentrace tři vzorky.

Výtěžnost  $Rec$  byla vypočítána dle vzorce  $Rec = 100 \times c_i/c_o$

$c_o$  . . . . . koncentrace vypočítaná ( koncentrace látky obsažená ve vzorku + koncentrace přidaného standardu)

$c_i$  . . . . . koncentrace stanovená GC metodou

Relativní směrodatná odchylka ( $RSD$ ) byla vypočítána takto:

$$RSD = 100 - Rec$$

### 5.4.2.1 Sérum

#### *Estery cholesterolu*

- Vzorek 3 ×
- Vzorek + 3 mmol/l roztok cholesterylpalmitátu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 5 mmol/l roztok cholesterylpalmitátu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 10 mmol/l roztok cholesterylpalmitátu v hexanu (1 ml) 3 ×

původní koncentrace ve vzorku: 1,842 mmol/l

Tab. 8 Správnost esterů cholesterolu ze séra po přidavku St

<i>c přidaného St (mmol/l)</i>	<i>počet stanovení</i>	<i>c<sub>i</sub> (mmol/l)</i>	<i>c<sub>o</sub> (mmol/l)</i>	<i>Rec (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
3	3	4,241	4,842	87,59	12,41
5	3	5,672	6,842	82,90	17,10
10	3	10,785	11,842	91,07	8,93

#### *Volný cholesterol*

- Vzorek 3 ×
- Vzorek + 1 mmol/l roztok volného cholesterolu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 3 mmol/l roztok volného cholesterolu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 5 mmol/l roztok volného cholesterolu v hexanu (1 ml) 3 ×

Původní koncentrace ve vzorku: 1,343 mmol/l

Tab. 9. Správnost volného cholesterolu ze séra po přidavku St

<i>c</i> přidaného St (mmol/l)	počet stanovení	<i>c<sub>i</sub></i> (mmol/l)	<i>c<sub>o</sub></i> (mmol/l)	Rec (%)	RSD (%)
1	3	1,980	2,343	84,51	15,49
3	3	3,556	4,343	81,88	18,12
5	3	5,140	6,343	81,03	18,97

#### 5.4.2.2 Homogenát nadledvin

##### Estery cholesterolu

- Vzorek 3 ×
- Vzorek + 2,5 mmol/l roztok cholesterylpalmitátu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 5 mmol/l roztok cholesterylpalmitátu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 7,5 mmol/l roztok cholesterylpalmitátu v hexanu (1 ml) 3 ×

původní koncentrace ve vzorku: 2,063 mmol/l

Tab. 10. Správnost esterů cholesterolu z homogenátu nadledvin po přidavku St

<i>c</i> přidaného St (mmol/l)	počet stanovení	<i>c<sub>i</sub></i> (mmol/l)	<i>c<sub>o</sub></i> (mmol/l)	Rec (%)	RSD (%)
2,5	3	3,838	4,563	84,11	15,89
5	3	6,152	7,063	87,10	12,90
7,5	3	8,188	9,563	85,62	14,38

##### Volný cholesterol

- Vzorek 3 ×
- Vzorek + 1 mmol/l roztok volného cholesterolu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 3 mmol/l roztok volného cholesterolu v hexanu (1 ml) 3 ×
- Vzorek + 5 mmol/l roztok volného cholesterolu v hexanu (1 ml) 3 ×

Původní koncentrace ve vzorku: 1,718 mmol/l

Tab. 11. Správnost volného cholesterolu z homogenátu nadledvin po přidavku St

<i>c</i> přidaného St (mmol/l)	počet stanovení	<i>c<sub>i</sub></i> (mmol/l)	<i>c<sub>o</sub></i> (mmol/l)	Rec (%)	RSD (%)
1	3	2,356	2,718	86,68	13,32
3	3	3,844	4,718	81,48	18,52
5	3	5,465	6,718	81,35	18,65



### 5.4.3 Přesnost

Směsný vzorek (sérum, homogenát nadledvin) byl rozpipetován do deseti větších vialek s víčkem. Každý vzorek byl zpracován dle popsaného pracovního postupu.

#### 5.4.3.1 Sérum

##### *Estery cholesterolu*

Tab. 12. Přesnost esterů cholesterolu – hodnoty koncentrace analytů v séru

vzorek	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	245698	190361	1,291	1,491
2	205615	158467	1,298	1,500
3	241942	195293	1,239	1,427
4	269278	211436	1,274	1,470
5	283758	220890	1,285	1,484
6	273775	218840	1,251	1,442
7	265877	218644	1,216	1,398
8	232464	184637	1,259	1,452
9	208784	165711	1,260	1,453
10	642065	512615	1,253	1,444

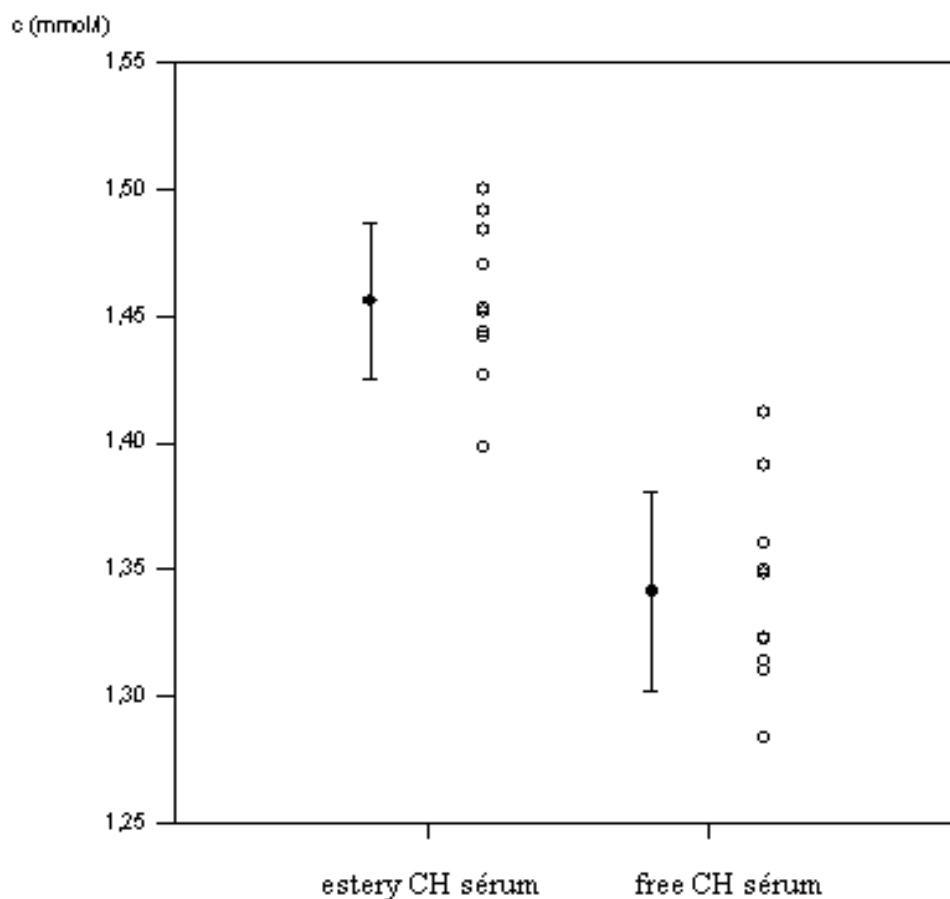
##### *Volný cholesterol*

Tab. 13. Přesnost volného cholesterolu – hodnoty koncentrace analytů v séru

vzorek	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	131569	193426	0,680	1,391
2	116288	179302	0,649	1,360
3	131061	219540	0,597	1,310
4	56949	99997	0,570	1,284
5	143314	224639	0,638	1,350
6	142602	224138	0,636	1,348
7	153777	252098	0,610	1,323
8	113686	186582	0,609	1,322
9	97062	161627	0,601	1,314
10	113429	161656	0,702	1,412

Tab. 14. Přesnost vzorků séra

analyt	průměrná c (mmol/l)	$S_R$	RSD (%)
estery cholesterolu	1,456	0,031	2,137
volný cholesterol	1,342	0,039	2,906



Obr. 19. Statistické porovnání dat – point plot – stanovení přesnosti – vzorky séra (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)

### 5.4.3.2 Homogenát nadledvin

#### Estery cholesterolu

Tab. 15. Přesnost esterů cholesterolu – hodnoty koncentrace analytů v homogenátu nadledvin

vzorek	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	67428	47221	1,428	1,662
2	84230	55412	1,520	1,777
3	98307	63837	1,540	1,802
4	76293	48491	1,573	1,844
5	27624	17182	1,608	1,886
6	49987	29929	1,670	1,964
7	40789	27927	1,461	1,703
8	45043	29036	1,551	1,816
9	42524	24577	1,730	2,039
10	69109	48809	1,416	1,647

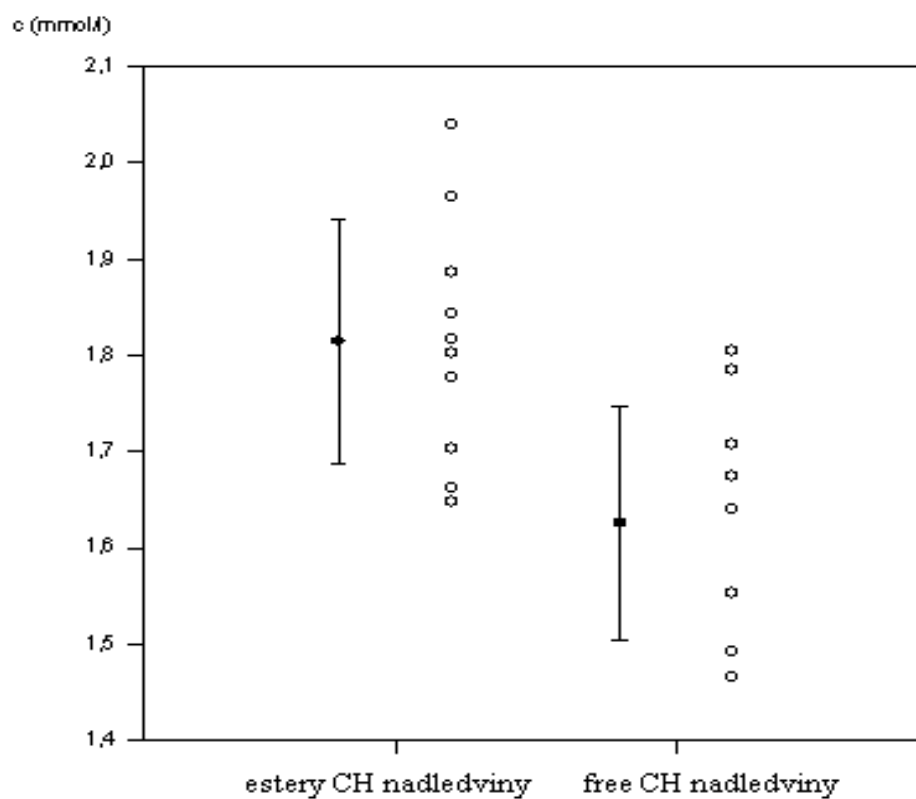
## Volný cholesterol

Tab. 16. Přesnost volného cholesterolu – hodnoty koncentrace analytů v homogenátu nadledvin

vzorek	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	52253	51950	1,006	1,707
2	52788	62336	0,847	1,553
3	38133	48594	0,785	1,492
4	50689	52141	0,972	1,674
5	32511	29399	1,106	1,804
6	43907	46849	0,937	1,640
7	27372	25199	1,086	1,785
8	43907	46849	0,937	1,640
9	35647	47095	0,757	1,465
10	32923	41979	0,784	1,492

Tab. 17. Přesnost vzorků homogenátu nadledvin

analyt	průměrná c (mmol/l)	$S_R$	RSD (%)
estery cholesterolu	1,814	0,127	6,975
volný cholesterol	1,625	0,122	7,483



Obr. 20. Statistické porovnání dat – point plot – stanovení přesnosti – vzorky homogenátu nadledvin (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)

#### **5.4.4 Detekční a kvantifikační limit**

Limit detekce (LOD) byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 1  $\mu\text{mol/l}$  pro oba analyty.

Limit kvantifikace (LOQ) byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 5  $\mu\text{mol/l}$  pro oba analyty.

#### **5.4.5 Stabilita**

Do testu byly vzaty 3 vzorky esteru cholesterolu o koncentraci 1 mmol/l, 5 mmol/l a 10 mmol/l a dále 3 vzorky volného cholesterolu o koncentraci 1 mmol/l, 5 mmol/l a 10 mmol/l. Stabilita derivátu byla testována po dobu 30 dnů (den 0, 10, 20, 30) při uchování v lednici (4 °C) a v mrazáku (-25 °C).

### 5.4.5.1 Estery cholesterolu – uchování v lednici (4 °C)

Tab. 18. Stabilita vzorku esteru cholesterolu ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) uchovávaného po dobu 30 dnů v lednici

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	133016	154907	0,85868	0,95247	
10	83975	96524	0,86999	0,96657	-0,01410
20	71584	83616	0,85610	0,94926	0,00322
30	105574	127300	0,82933	0,91588	0,03660

Tab. 19. Stabilita vzorku esteru cholesterolu ( $c = 5 \text{ mmol/l}$ ) uchovávaného po dobu 30 dnů v lednici

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	344780	86364	3,99217	4,85957	
10	287987	72541	3,96999	4,83191	0,02766
20	221652	58795	3,76991	4,58243	0,27713
30	129489	35564	3,64101	4,42171	0,43785

Tab. 20. Stabilita vzorku esteru cholesterolu ( $c = 10 \text{ mmol/l}$ ) uchovávaného po dobu 30 dnů v lednici

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	593840	73812	8,04530	9,91335	
10	423310	52900	8,00208	9,85945	0,05390
20	434444	55698	7,79999	9,60747	0,30588
30	321458	41578	7,73144	9,52200	0,39135

### 5.4.5.2 Estery cholesterolu – uchování mrazáku (-25 °C)

Tab. 21. Stabilita vzorku esteru cholesterolu (c = 1 mmol/l) uchovávaného po dobu 30 dnů v mrazáku

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	119562	138349	0,86421	0,95936	
10	98625	115803	0,85166	0,94372	0,01564
20	106830	125111	0,85388	0,94649	0,01287
30	84526	97874	0,86362	0,95863	0,00073

Tab. 22. Stabilita vzorku esteru cholesterolu (c = 5 mmol/l) uchovávaného po dobu 30 dnů v mrazáku

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	352009	89088	3,95125	4,80854	
10	169778	42980	3,95016	4,80719	0,00136
20	257001	65235	3,93962	4,79404	0,01450
30	511900	129410	3,95564	4,81402	-0,00548

Tab. 23. Stabilita vzorku esteru cholesterolu (c = 10 mmol/l) uchovávaného po dobu 30 dnů v mrazáku

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	284219	36229	7,84507	9,66368	
10	334383	42651	7,83998	9,65733	0,00635
20	275373	35214	7,81999	9,63240	0,03128
30	580063	73297	7,91387	9,74947	-0,08579

### 5.4.5.3 Volný cholesterol – uchování v lednici (4 °C)

Tab. 24. Stabilita vzorku volného cholesterolu (c = 1 mmol/l) uchovávaného po dobu 30 dnů v lednici

den	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/ Area (IS)	c (mmol/l)	S <sub>R</sub>
0	214921	242978	0,88452	1,58926	
10	434868	526489	0,82598	1,53247	0,05679
20	78905	99874	0,79005	1,49762	0,09164
30	23240	31649	0,73430	1,44355	0,14571

Tab. 25. Stabilita vzorku volného cholesterolu (c = 5 mmol/l) uchovávaného po dobu 30 dnů v lednici

den	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/ Area (IS)	c (mmol/l)	S <sub>R</sub>
0	451513	108968	4,14354	4,75028	
10	231456	55074	4,20264	4,80760	-0,05732
20	862369	215476	4,00216	4,61315	0,13713
30	99875	25505	3,91590	4,52948	0,22079

Tab. 26. Stabilita vzorku volného cholesterolu (c = 10 mmol/l) uchovávaného po dobu 30 dnů v lednici

den	Area (TMS-ch)	Area (IS)	Area (TMS-ch)/ Area (IS)	c (mmol/l)	S <sub>R</sub>
0	2889674	299180	9,65865	10,09956	
10	1212167	125874	9,63000	10,07178	0,02778
20	972539	102848	9,45608	9,90309	0,19647
30	993077	105258	9,43469	9,88234	0,21722

#### 5.4.5.4 Volný cholesterol – uchování v mrazáku (-25 °C)

Tab. 27. Stabilita vzorku volného cholesterolu ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) uchovávaného po dobu 30 dnů v mrazáku

<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	433589	618074	0,70152	1,41175	
10	316714	448952	0,70545	1,41557	-0,00382
20	141587	210104	0,67389	1,38496	0,02680
30	36663	54218	0,67621	1,38721	0,02454

Tab. 28. Stabilita vzorku volného cholesterolu ( $c = 5 \text{ mmol/l}$ ) uchovávaného po dobu 30 dnů v mrazáku

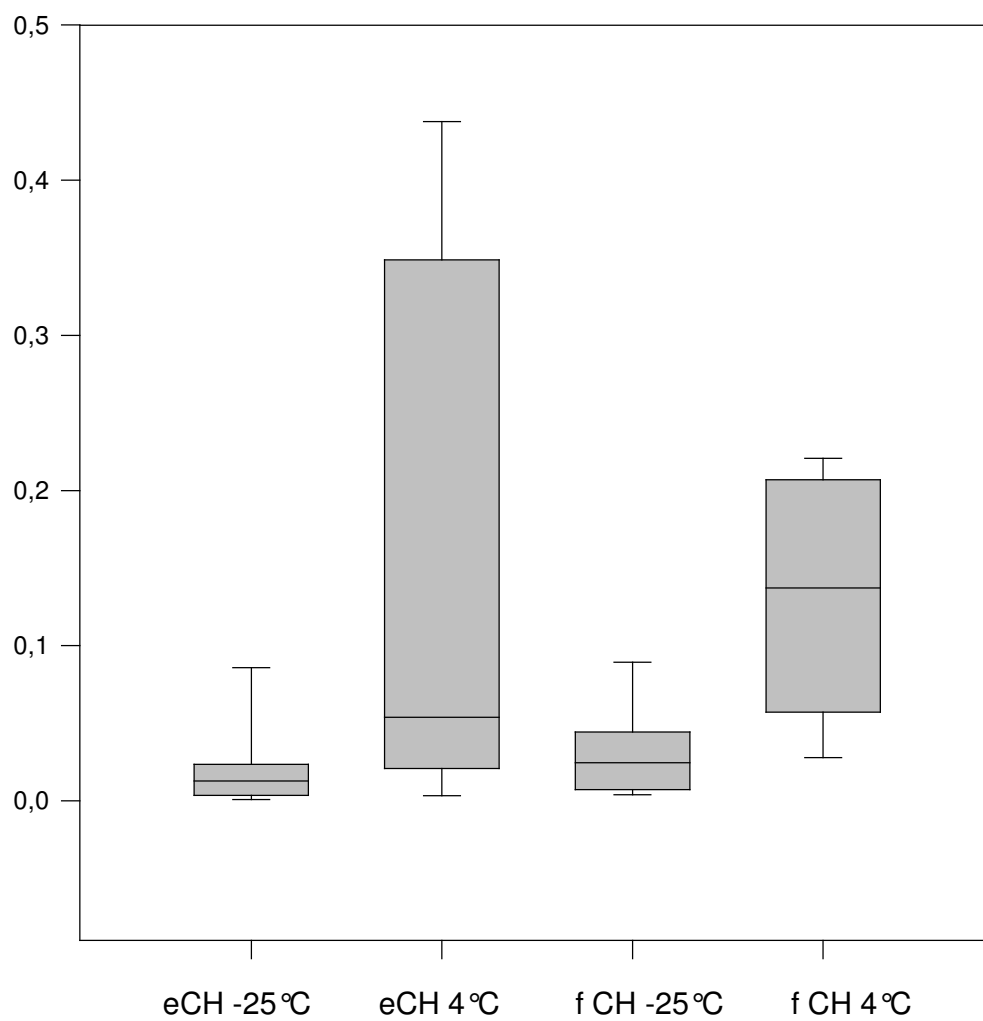
<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	1881863	478316	3,93435	4,54738	
10	692541	180241	3,84231	4,45810	0,08928
20	542680	138338	3,92286	4,53623	0,01115
30	409875	105698	3,87779	4,49253	0,05486

Tab. 29. Stabilita vzorku volného cholesterolu ( $c = 10 \text{ mmol/l}$ ) uchovávaného po dobu 30 dnů v mrazáku

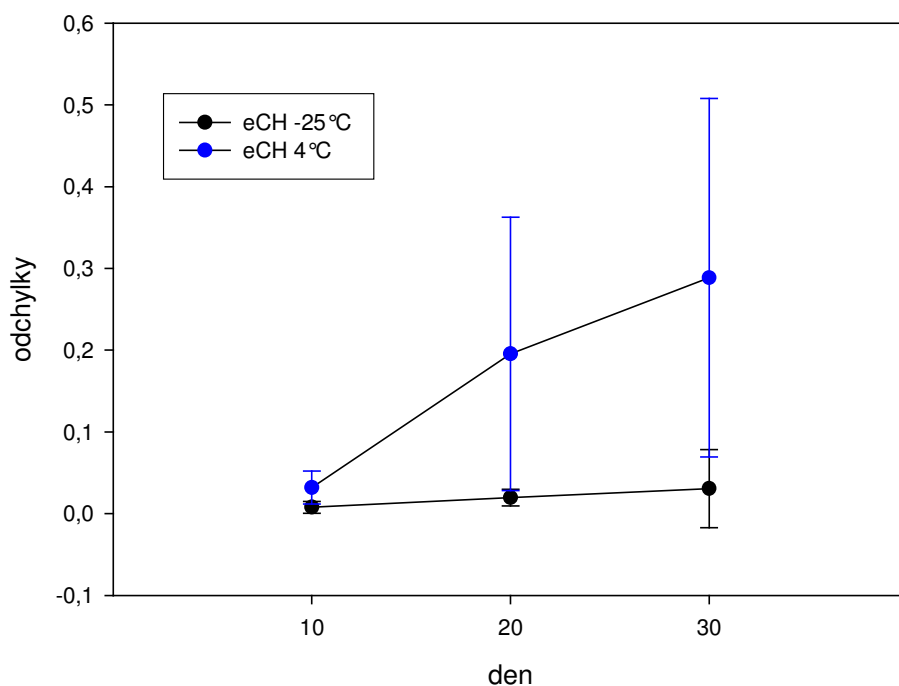
<i>den</i>	<i>Area (TMS-ch)</i>	<i>Area (IS)</i>	<i>Area (TMS-ch)/ Area (IS)</i>	<i>c (mmol/l)</i>	<i>S<sub>R</sub></i>
0	3919300	397890	9,85021	10,28536	
10	488861	49456	9,88477	10,31888	-0,03352
20	1526489	154897	9,85486	10,28988	-0,00452
30	2606192	264857	9,84000	10,27546	0,00991



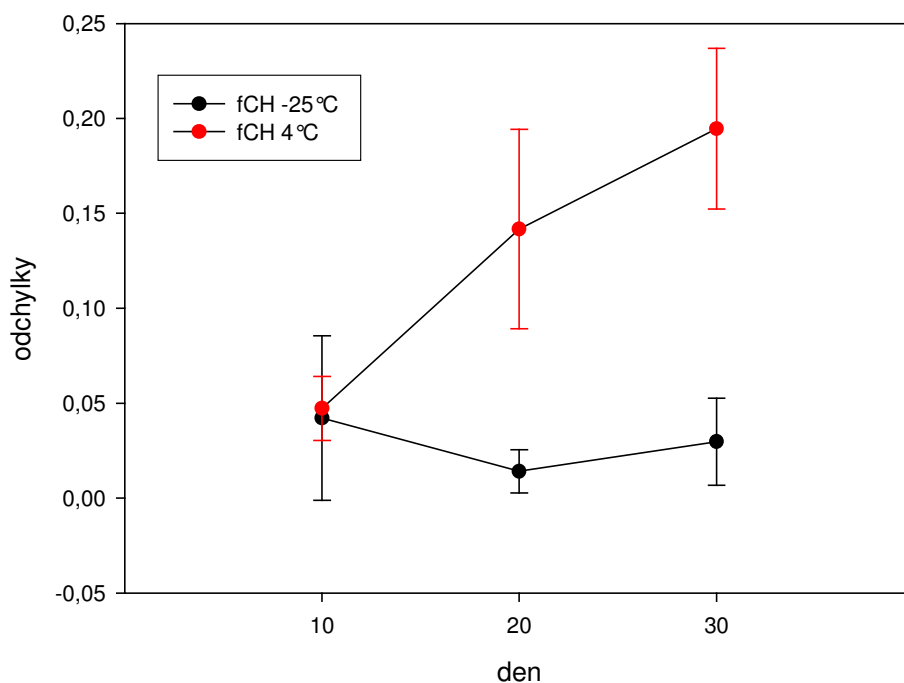
odchylky



Obr. 21. Statistické porovnání dat – stabilita derivátů – box plot (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)



Obr. 22. Statistické porovnání dat – sigma plot – stabilita esterů cholesterolu při uchování v lednici a mrazáku po dobu 30 dnů (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)



Obr. 23. Statistické porovnání dat – sigma plot – stabilita volného cholesterolu při uchování v lednici a mrazáku po dobu 30 dnů (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)

## 5.5 Využití metody v klinickém výzkumu

Ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Hradci Králové byly provedeny pilotní studie sledující vliv cholesterolu v dietě na syntézu cholesterolu a vliv septického šoku na syntézu cholesterolu. Změny metabolismu lipidů patří u kriticky nemocných do obrazu metabolických adaptací na stres a dochází často k hypocholesterolémii. Pro stanovení rychlosti syntézy cholesterolu lze využít inkorporace substrátu označeného deuteriem. Deuterium je stabilní izotop vodíku a využívá se jako metabolický tracer, aplikovaný formou deuterium oxidu (těžká voda). Jako modelové zvíře bylo zvoleno prase, vzhledem k podobnosti lipidového a hormonálního metabolismu s člověkem. Byla sledována inkorporace deuteria do molekuly neesterifikovaného a esterifikovaného cholesterolu.

### 5.5.1 Studie sledující vliv cholesterolu v dietě na syntézu cholesterolu

Do pilotní studie byla zařazena 4 zvířata, 2 na bezcholesterolové dietě (H3 a H4) a 2 na dietě s přidavkem 200 mg cholesterolu/10 ml olivového oleje 2x denně (H5 a H6). Primingová dávka traceru byla aplikována intravenózně v dávce  $0,75 \times 0,003 \times \text{hmotnost zvířete (kg)}$  jako fyziologický roztok. Dávka byla kalkulována na 3g/kg celkové tělesné vody. Veškerá voda v dietě byla obohacena o deuterium oxid v množství 4,5ml/l napájecí vody. Zvířata byla utracena třetí den experimentu a byla odebrána krev a orgány. Vzorky byly extrahovány metodou SPE popsanou v diplomové práci a derivatizovány za vzniku trimethylsilylderivátu. Metodou GC-MS byla stanovena míra inkorporace deuteria do cholesterolu a vypočten IE podle vzorce:

$$IE = TTR / (1 + TTR)$$

$$TTR = [(Area M+1/ Area M) - k_1] + 2 [(Area M+2/ Area M) - k_2]$$

(koeficienty  $k_1$  a  $k_2$  odečítají přirozený výskyt izotopů  $^2\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  a hodnoty se získají analýzou standardů)

Projekt pokusu byl schválen odbornou komisí podle §23 zákona č. 246/1992 Sb na ochranu zvířat proti týrání

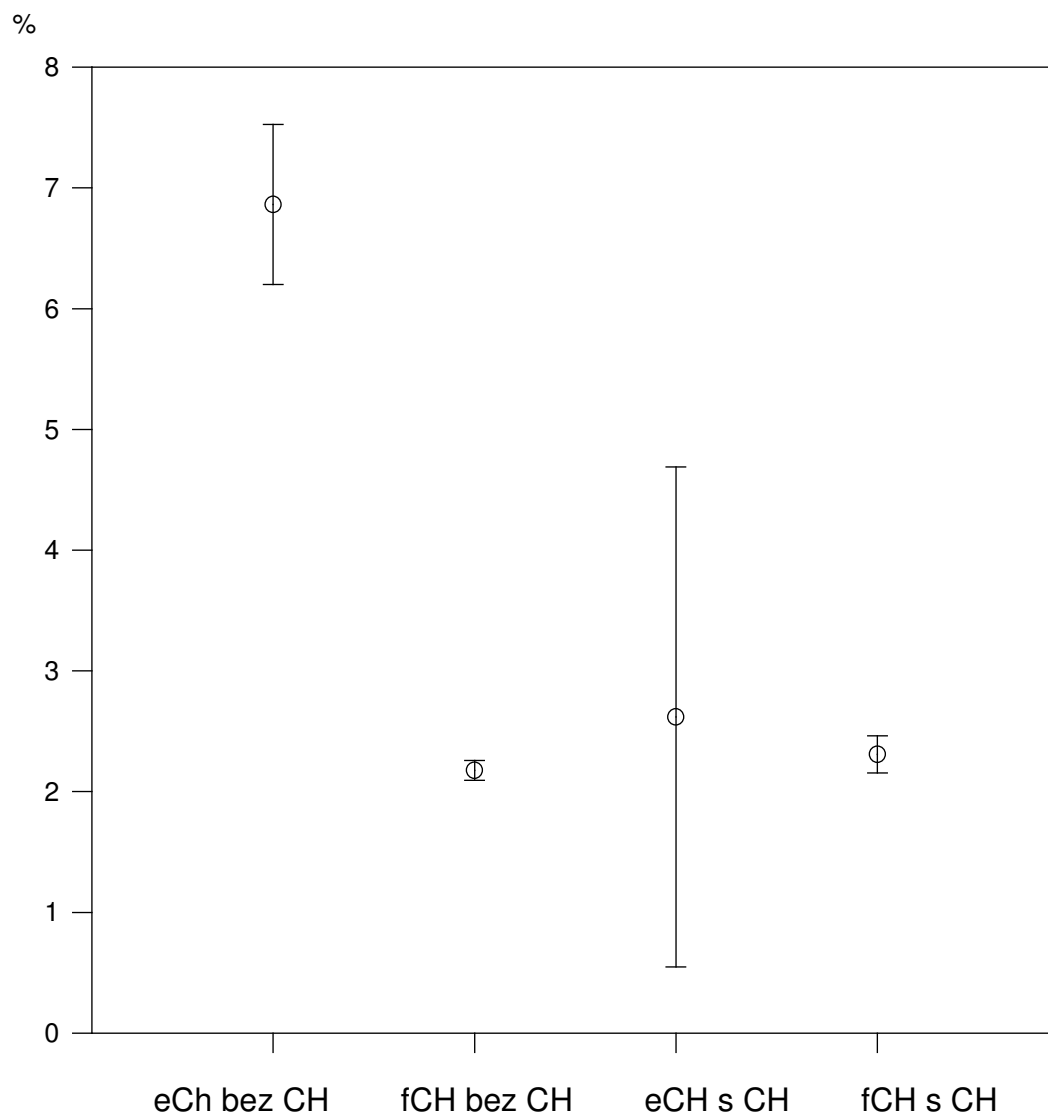


Tab. 30 Výsledky studie sledující vliv cholesterolu v dietě na syntézu cholesterolu – vzorek nadledviny

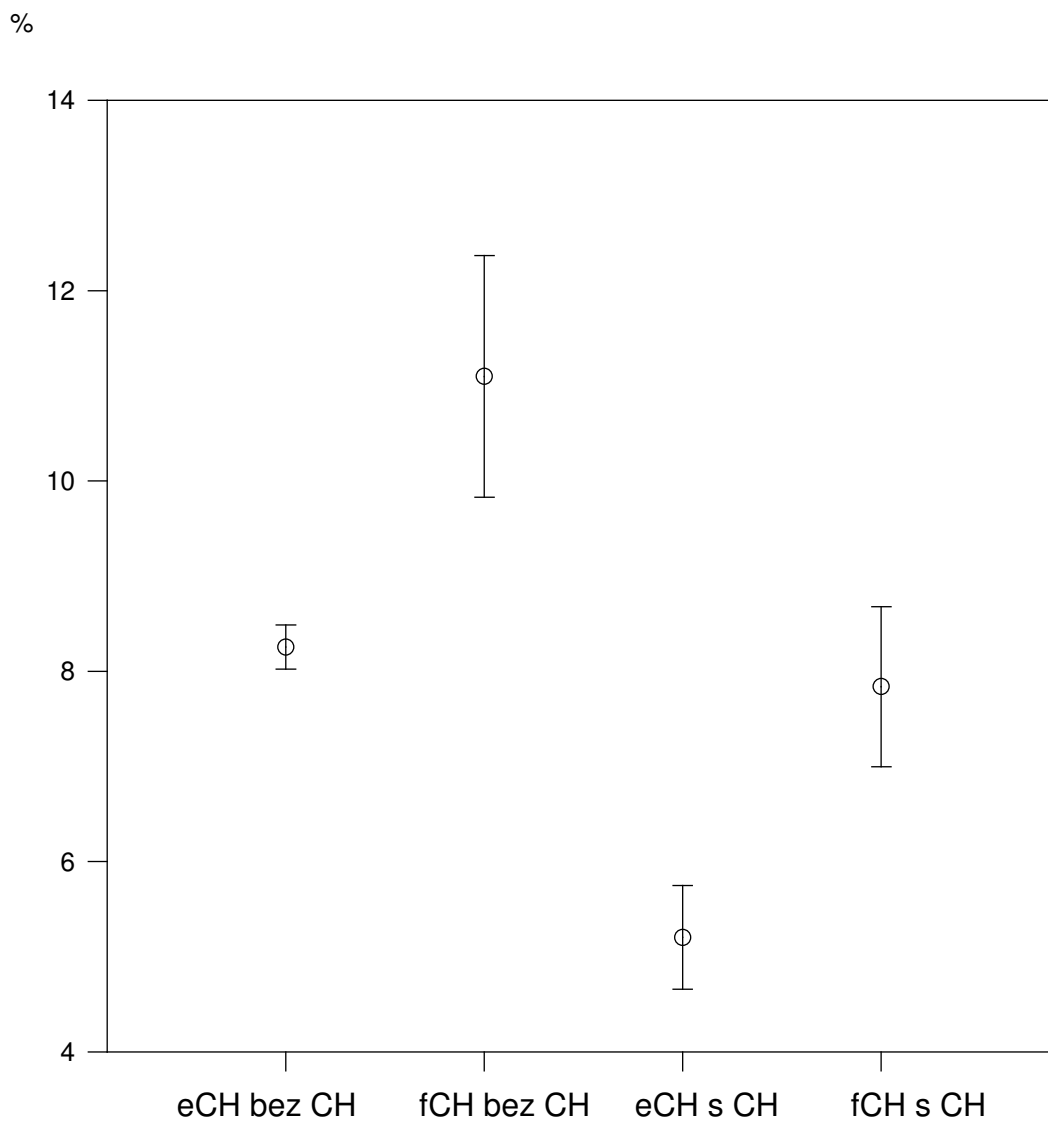
	<b>M</b>	<b>M+1</b>	<b>M+2</b>	<b>M+1 / M</b>	<b>M+2 / M</b>			
	368	369	370					
standard	22753	6233	644	0,273942	0,028304			
<b>nadledviny</b>	<b>M</b>	<b>M+1</b>	<b>M+2</b>	<b>M+1 / M</b>	<b>M+2 / M</b>	<b>TTR</b>	<b>IE</b>	<b>%</b>
H3 ester	506908	155044	26307	0,305862	0,051897	0,079106	<b>0,073307</b>	7,331
H4 ester	38084	11696	1747	0,307111	0,045872	0,068305	<b>0,063938</b>	6,394
H5 ester	22716	6416	679	0,282444	0,029891	0,011676	<b>0,011541</b>	1,154
H6 ester	23691	7033	903	0,296864	0,038116	0,042545	<b>0,040809</b>	4,081
H3 free	8028	2201	318	0,274165	0,039611	0,022838	<b>0,022328</b>	2,233
H4 free	5963	1650	225	0,276706	0,037733	0,021622	<b>0,021164</b>	2,116
H5 free	24294	6996	818	0,287972	0,033671	0,024764	<b>0,024166</b>	2,417
H6 free	22652	6527	735	0,288142	0,032447	0,022487	<b>0,021993</b>	2,199

Tab. 31 Výsledky studie sledující vliv cholesterolu v dietě na syntézu cholesterolu – vzorek séra

	<b>M</b>	<b>M+1</b>	<b>M+2</b>	<b>M+1 / M</b>	<b>M+2 / M</b>			
	368	369	370					
standard	74173	21388	3195	0,288353	0,043075			
<b>sérum</b>	<b>M</b>	<b>M+1</b>	<b>M+2</b>	<b>M+1 / M</b>	<b>M+2 / M</b>	<b>TTR</b>	<b>IE</b>	<b>%</b>
H3 ester	54972	17143	3040	0,31185	0,055301	0,091902	<b>0,084167</b>	8,417
H4 ester	36769	11547	1922	0,314042	0,052272	0,088036	<b>0,080913</b>	8,091
H5 ester	39502	11763	1816	0,297782	0,045972	0,059177	<b>0,055871</b>	5,587
H6 ester	23177	6916	959	0,298399	0,041377	0,050604	<b>0,048166</b>	4,817
H3 free	24834	7118	2238	0,286623	0,090118	0,13631	<b>0,119959</b>	11,996
H4 free	37860	12215	2300	0,322636	0,06075	0,113586	<b>0,102001</b>	10,200
H5 free	47799	14654	2439	0,306575	0,051026	0,078078	<b>0,072423</b>	7,242
H6 free	54034	16806	3015	0,311026	0,055798	0,092073	<b>0,08431</b>	8,431



Obr. 24 Statistické porovnání dat – studie sledující vliv cholesterolu v dietě na syntézu cholesterolu – vzorek nadledviny – scatter plot (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)



Obr. 25 Statistické porovnání dat – studie sledující vliv cholesterolu v dietě na syntézu cholesterolu – vzorek séra – scatter plot (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)

Interpretace výsledků:

Ve skupině bez cholesterolové suplementace byl zjištěn v nadledvinách vyšší IE za 72 hodin pro estery cholesterolu. V séru byly nalezeny hodnoty IE vyšší jak pro estery cholesterolu, tak i pro volný cholesterol.

## 5.5.2 Studie sledující vliv septického šoku na syntézu cholesterolu

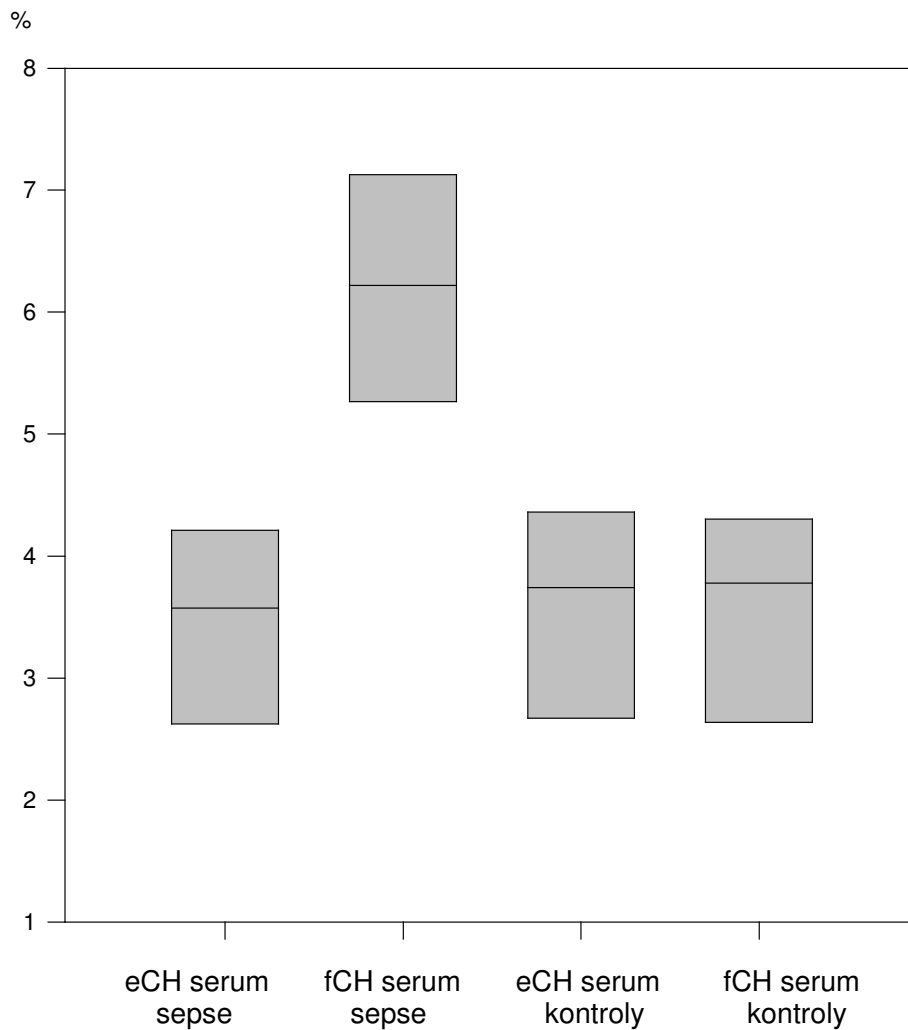
Do pilotní studie bylo zařazeno 10 zvířat, 5 zvířatům bylo aplikováno 2 ml suspenze *Escherichia coli* ( $10^9$  cfu/ml), ostatních 5 zvířat bylo kontrolních - tj. bez aplikace *E.coli* a navození septického šoku. Primingová dávka traceru byla aplikována intravenózně v dávce  $0,75 \times 0,003 \times$  hmotnost zvířete (kg) jako fyziologický roztok. Zvířata byla utracena ve 24. hodině experimentu, byla odebrána krev a orgány. Vzorky byly extrahovány metodou popsanou v diplomové práci a derivatizovány za vzniku trimethylsilylderivátu. Metodou GC-MS byla stanovena míra inkorporace deuteria do cholesterolu a vypočten IE.

Projekt pokusu byl schválen odbornou komisí podle §23 zákona č. 246/1992 Sb na ochranu zvířat proti týrání.

Tab. 32 Výsledky studie sledující vliv septického šoku na syntézu cholesterolu – vzorek séra

	M	M+1	M+2	M+1 / M	M+2 / M			
	368	369	370					
<b>standard</b>	22753	6233	644	0,273942	0,028304	<b>TTR</b>	<b>IE</b>	<b>%</b>
<b>ESTERY</b>								
sepse1	62662	17905	2864	0,285739	0,045706	0,046601	0,044526	4,4525684
sepse2	113084	31950	4810	0,282533	0,042535	0,037053	0,035729	3,5729153
sepse3	31510	8837	1287	0,280451	0,040844	0,031589	0,030622	3,0621866
sepse4	11246	3011	479	0,26774	0,042593	0,022376	0,021886	2,1885954
sepse5	3662	1062	150	0,290005	0,040961	0,041378	0,039734	3,9733975
kontrola 1	17432	4747	698	0,272315	0,040041	0,021848	0,021381	2,1380939
kontrola 2	99290	27548	4565	0,27745	0,045976	0,038853	0,0374	3,7399848
kontrola 3	62163	13777	4414	0,221627	0,071007	0,033091	0,032031	3,2030998
kontrola 4	76779	21909	3498	0,285351	0,045559	0,04592	0,043904	4,3904216
kontrola 5	1232	319	72	0,258929	0,058442	0,045262	0,043302	4,3301944
<b>FREE</b>								
sepse1	154785	45637	7133	0,294841	0,046083	0,056458	0,053441	5,3440808
sepse2	147056	43817	8204	0,297961	0,055788	0,078988	0,073206	7,3205673
sepse3	222490	66343	11884	0,298184	0,053414	0,074462	0,069301	6,9301351
sepse4	72992	21615	3677	0,296128	0,050375	0,066329	0,062203	6,2203386
sepse5	16946	5335	597	0,314824	0,03523	0,054733	0,051893	5,1892615
kontrola1	105966	31607	4358	0,298275	0,041126	0,049978	0,047599	4,7599001
kontrola2	44366	12141	2035	0,273656	0,045868	0,034843	0,033669	3,3669468
kontrola3	21705	6201	921	0,285695	0,042433	0,04001	0,038471	3,8470748
kontrola4	11779	3138	609	0,266406	0,051702	0,039261	0,037778	3,7777678
kontrola5	15192	4093	612	0,269418	0,040284	0,019437	0,019066	1,9066423





Obr. 26 Statistické porovnání dat – studie sledující vliv septického šoku na syntézu cholesterolu – vzorek séra – box plot (software SigmaStat, Systat Software GmbH, Německo)

Interpretace výsledků:

Data byla porovnána a byly nalezeny signifikance IE (%) u skupiny septické v inkorporaci deuteria do volného cholesterolu oproti ostatním skupinám.

## 6 Závěr

V současné době je v popředí zájmu v oblasti metabolismu lipidů především rozvoj aterosklerózy. Nedílnou součástí v metabolismu však tvoří i problematika hypocholesterolémii, především u pacientů v kritické péči. Hypocholesterolemie je možným indikátorem prognózy u těchto pacientů. Jednou z otázek je problematika deprivace pacientů na bezcholesterolové dietě. Jednotlivé mechanismy působící v této oblasti metabolismu jsou diskutabilní a jsou hledány nové metody pro jejich objasnění.

Cílem předkládané diplomové práce bylo vypracování a validace analytické metody pro separaci volného a esterifikovaného cholesterolu v různých druzích biologického materiálu. Metoda je přínosná především při stanovení inkorporace tracerů (deuteria) do molekuly cholesterolu při jeho syntéze in vivo. Použití tracerů vyžaduje účinnou a spolehlivou metodu při extrakci cholesterolu ve tkáni.

Pro separaci volného a esterifikovaného cholesterolu byla nejprve využita metoda TLC. Tato metoda se však ukázala pro předpokládané aplikace v klinickém výzkumu nevhodná, vzhledem k získanému malému množství extraktu po separaci pro následnou derivatizaci a analýzu GC-MS. Stanovení by tak bylo realizovatelné s nedostatečnou přesností a správností. Byla zvolena extrakce SPE metodou, která byla optimalizována na dané analytické a chromatografické podmínky.

Metoda byla validována a bylo dosaženo následujících výsledků : přesnost stanovení esterů cholesterolu ve vzorcích krevního séra 2,14%, ve vzorcích homogenátu nadledvin byla 6,98%, přesnost stanovení volného cholesterolu byla v séru 2,91% a homogenátu nadledvin 7,48%. Limit detekce byl stanoven 1  $\mu\text{mol/l}$  a limit kvantifikace 5  $\mu\text{mol/l}$ . Linearita v rozsahu koncentrací 1  $\text{mmol/l}$  – 25  $\text{mmol/l}$  byla u esterů cholesterolu s korelačním koeficientem 0,998, u volného cholesterolu 0,997. Stabilita derivátu byla testována po dobu 30 dnů za teploty 4  $^{\circ}\text{C}$  a – 25  $^{\circ}\text{C}$ , derivát byl stabilní po celou dobu testování při výše uvedených teplotách. Laboratorní teplota, vzhledem k vysoké těkavosti rozpouštědla derivátu nebyla testována.

Metoda byla úspěšně aplikována ve studiích sledujících vliv cholesterolu v dietě a vliv septického šoku na syntézu cholesterolu. Použitá metoda se

ukázala být velmi vhodná a aplikovatelná v různých druzích biologického materiálu a rozšiřuje možnosti stanovení v klinických a experimentálních studiích v oblasti lipidologie a farmakologie.

Předkládaná diplomová práce byla v rámci řešení Výzkumného záměru MZO 00179906.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] Dršata J., Palička V.: Úvod do klinické biochemie, 1.vyd., SPN Praha 1989
- [2] Zima T.: Laboratorní diagnostika, 2. dopl. a přeprac. vyd., Galén Praha 2007
- [3] Racek J. et al.: Klinická biochemie, 2.přeprac. vyd., Galén Praha 2006
- [4] Doležalová V. a kol.: Principy biochemických vyšetřovacích metod, 2. opr. vyd., Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno 1995
- [5] Káš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie, 1. vyd., VŠCHT Praha 2006
- [6] Češka R. :Cholesterol a ateroskleróza, 2. přeprac. vyd., Maxdorf 1999
- [7] Český lékopis 2002, Grada Publishing Praha 2002
- [8] Voet D., Voet J. G.: Biochemie, 1. vyd., Victoria Publishing Praha 1995
- [9] Murray R. K. et al.: Harperova biochemie, 2. české vyd., H & H Praha 1998
- [10] Schneidera P. a kol.: Vybrané kapitoly z klinické biochemie, 1. vyd., Karolinum Praha 1998
- [11] Masopust J., Průša R.: Patobiochemie metabolických drah, 1. vyd., 2. LF UK Praha 1999
- [12] Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: Biochemie pro studující medicíny, I.díl, 1.vyd., Karolinum Praha 2004
- [13] Chromý V. et al.: Bioanalytika-analytická chemie v laboratorní medicíně, 1.vyd., Masarykova univerzita Brno 2002
- [14] Liebisch G., Binder M., Schifferer R., Langmann T., Schulz B., Schmitz G., Biochim. Biophys. Acta 1761 (2006) 121-128
- [15] Ahmida M., Bertucci P., Franzó L., Massoud R., Cortese C., Lala A., Federici G., J. Chromatogr. B 842 (2006) 43-47
- [16] Prates M., Queresma G., Bessa B., Fontes A., Alfaia, Food Chem. 94 (2006) 469-477
- [17] Bragagnolo N., Rodriguez-Amaya, Food Chem. 79 (2002) 255-260
- [18] Hwang B., Wang J., Choong Y., J. Food Comp. Anal. 16 (2003) 169-178
- [19] Hojo K., Hakamata H., Ito A., Kotani A., Furukawa Ch., Hosokawa Y., Kusu F., J. Chromatogr. A 1166 (2007) 135-141
- [20] Kemmo S., Ollilainen V., Lampi A., Piironen V., Food Chem., 101 (2007) 1438-1445

- [21] Palmgrén J., Toyras A., Mauriala T., Monkkonen J., Auriola S., J. Chromatogr. B 821 (2005) 144-152
- [22] Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, 3.vyd., Karolinum Praha 2007
- [23] Klouda P.: Moderní analytické metody, 1.vyd., Pavel Klouda Ostrava 1996
- [24] Štulík K. a kol.: Analytické separační metody, 1.vyd., Karolinum Praha 2004
- [25] Churáček J.: Analytická separace látek, 1.vyd., SNTL Praha 1990
- [26] Holzbecher Z., Churáček J.: Analytická chemie, 1.vyd., SNTL Praha 1987
- [27] Davídek J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin, 2.nezm. vyd., SNTL Praha 1981
- [28] Volka K.: Analytická chemie II., 1.vyd., VŠCHT Praha 1997
- [29] Kitson F. G., Larsen B. S., McEwen Ch. N.: Gas chromatography and mass spectrometry-A practical guide, Academic press 1993
- [30] Vřešťál J.: Hmotnostní spektrometrie, 2.dopl. vyd., Masarykova univerzita v Brně 2000
- [31] McFadden W.: Techniques od combined GC/MS applications in organic analysis, Space science laboratory University od Kalifornia, Berkley, A wilen-interscience publication 1973
- [32] Procházková D., Extrakce na tuhou fázi, CHEMagazín, 2003, roč. 13, č.1
- [33] Christie W. W.: Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids, Advances in lipid methodology – one, Oily Press, 1992
- [34] <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, 9. 4. 2008, 21:45
- [35] Bitman,J., Wood,D.L., Hamosh,M., Hamosh,P. and Mehta,N.R., Am. J. Clin. Nutr., 38 (1983) 300-312
- [36] Hamilton,J.G. and Comai,K., Lipids, 23 (1988) 1146-1149
- [37] Wang,S.T., Peter,F., J. Chromatography, 276 (1983) 249-256
- [38] Kaluzny M. A., Duncan L. A., Meritt M. V., Epps D. E., J. Lip. Res. 26 (1985) 135
- [39] Pinkart H. C., Devereux R., Chapman P. J., J. Microbial Methods 34 (1998) 9

- [40] Burdge G. C., Wright P., Jones A. E., Wootton S. A., Br. J. Nutr. 84 (2000) 781
- [41] Giacometti J., Milošević A., Milin Č.: Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction, J. Chromatogr. A, 976 (2002) 47-54
- [42] Beylot M., Diraison F., Pachiaudi C.: Measuring lipogenesis and cholesterol synthesis in humans with deuterated water, J. mass spectrom., 32 (1997), 81-86
- [43] Holík M.: Příručka validace analytických metod, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, katedra teoretické a fyzikální chemie, Brno
- [44] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), Federal Register 62 (1997) 27463 - 27467