

## **Aplikace technologie nových stacionárních fází v HPLC analýze biologicky aktivních látek - stanovení vitamínu E**

(Abstrakt)

Cílem diplomové práce bylo nalézt vhodnou stacionární fázi pro úpravu biologického materiálu (krevní plazmy) technikou SPE k izolaci vitamínu E ( $\alpha$ -tokoferolu) a jeho následného stanovení HPLC analýzou pomocí vyvinuté metody. SPE tak měla nahradit užívanou techniku LLE. Při vlastní práci jsem také použil standard vitamínu A (retinolu), jelikož je možnost současného stanovení obou vitamínů pro laboratoř GMK FN HK výhodnou kombinací. Hlavní důraz byl ale kladen na vitamin E.

Příprava vzorku - optimalizovaný postup SPE metody:

Krev byla odebrána z periferní žíly po dvanácti hodinovém lačnění. Vzorky pak byly centrifugovány (1600×g, 10 min, 4°C) a plazma oddělena. 250  $\mu$ l plazmy bylo deproteinováno čistým ethanolem (650  $\mu$ l, 10 min, 4°C). Po centrifugaci (1600×g, 15 min, 4°C) byl supernatant oddělen a nanesen na SPE kolonku. Před aplikací vzorku byla kolonka aktivována 1 ml methanolu a pak promyta 1 ml vody. Po nanesení vzorku byl precipitát rozpuštěn v 625  $\mu$ l čistého ethanolu, centrifugován (1900×g, 25 minut, 4°C) a všechny supernatant byl opět aplikován na SPE kolonku. 2 ml n-hexanu bylo použito jako eluční činidlo. N-hexan byl odpařen při 45°C, odparek rozpuštěn v 250  $\mu$ l methanolu a aplikován do analytické kolony za těchto podmínek:

- mobilní fáze - 100% methanol
- kolona - Monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
- průtok mobilní fáze - 2,5 ml/min
- nástřik - 50  $\mu$ l
- doba analýzy - 2 min
- detekce - 325 nm v čase 0-1 min. pro retinol
- detekce - 295 nm v čase 1-1,8 min. pro  $\alpha$ -tokoferol

Podle tohoto postupu jsem zpracoval 10 vzorků, extrahoval z nich vitamíny a stanovil je pomocí HPLC s průměrnou výtěžností pro retinol 80,51 % a pro  $\alpha$ -tokoferol 98,97 %. Relativní směrodatná odchylka byla pro retinol 7,21% a pro  $\alpha$ -tokoferol 3,18%.  $\alpha$ -tokoferol splnil požadavek pro RDS < 5 %.

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku ke vzorku plazmy. Bylo připraveno 6 vzorků, z toho 3 vzorky s čistou plazmou a 3 vzorky plazmy se standardními přídatky. Průměrná výtěžnost byla pro retinol 82,92 % a  $\alpha$ -tokoferol 98,26 %. Dále byla správnost ověřena pomocí kontrolního setu BIO-RAD Laboratories, kdy naměřená množství retinolu i  $\alpha$ -tokoferolu byla v jeho akceptovatelném rozsahu.

Metoda SPE byla úspěšně vyvinuta pro stanovení výše uvedených vitamínů v reálných vzorcích biologického materiálu dodaných Fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Nalezené hladiny vitamínů odpovídaly rozmezím, které byly naměřeny pomocí používané metody LLE.