

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vývoj extrakčního postupu pro stanovení tokoferolů v
lidském séru**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Bc. Sáva Klabačková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Vývoj extrakčního postupu pro stanovení tokoferolů v lidském séru“ vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použila, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 13. 5. 2016

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucí své diplomové práce RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a především trpělivost při psaní této práce. Stejně díky patří i Mgr. Barboře Červinkové za pomoc s experimentální částí. Děkuji i celému kolektivu III. interní gerontometabolické kliniky ve FN HK za vřelé přijetí.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Sáva Klabačková

Školitel: RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj extrakčního postupu pro stanovení tokoferolů v lidském séru

V předkládané práci byl vypracován miniaturizovaný postup extrakce do kapaliny pro stanovení alfa, beta, gama a delta tokoferolu z lidského séra. Byly optimalizovány jednotlivé kroky extrakce: deproteinace, centrifugace, odpařování a závěrečná filtrace. Pro stanovení tokoferolů byla také testována extrakce do kapaliny podpořená tuhou fází (SLE), která se jeví jako velmi slibná pro využití v bioanalýze. V průběhu vývoje nového extrakčního postupu byl kladen důraz na jednoduchost, rychlost a malou spotřebu vzorků i rozpouštědel. Byla provedena také částečná validace metodiky. Nový extrakční postup je součástí již zavedené UHPLC metody pro stanovení jednotlivých forem tokoferolů a bude sloužit ke stanovení antioxidantní kapacity onkologických pacientů během chemoterapeutické léčby.

Klíčová slova: tokoferoly, LLE, SLE, biologický materiál

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Sáva Klabáčková

Supervisor: RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Development of extraction procedure for determination of tocopherols

In the present work liquid-liquid extraction for determination of alpha, beta, gamma and delta tocopherol from human serum was developed miniaturized. Individual extraction steps as deproteinization, centrifugation, evaporation and final filtration were optimized. Solid supported liquid extraction (SLE) was also tested for determination of tocopherols and seems to be very promising for use in bioanalysis. During the miniaturization of the extraction procedure the main emphasis was placed on simplicity, speed and low consumption of samples and solvents. Method was also partly validated.

The new extraction process is part of an already developed UHPLC method for the determination of individual forms of tocopherols and will serve to determine the antioxidant capacity of cancer patients during the chemotherapy treatment.

Key words: tocopherols, LLE, SLE, biological material

OBSAH

OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 CÍL PRÁCE	8
3 TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 VITAMÍN E	9
3.1.1 <i>Historie</i>	9
3.1.2 <i>Chemická struktura</i>	10
3.1.3 <i>Fyzikální vlastnosti</i>	11
3.1.4 <i>Zdroje</i>	11
3.1.5 <i>Metabolismus</i>	12
3.1.6 <i>Hladiny v krvi</i>	13
3.1.7 <i>Funkce tokoferolů</i>	13
3.2 VITAMÍN A (RETINOL)	15
3.3 EXTRAKČNÍ METODY	16
3.3.1 <i>Centrifugace</i>	16
3.3.2 <i>Filtrace</i>	17
3.3.3 <i>Precipitace proteinů (PP)</i>	17
3.3.4 <i>Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)</i>	18
3.3.5 <i>Extrakce na pevnou fázi (SPE)</i>	19
3.3.6 <i>Extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází (SLE)</i>	20
3.3.7 <i>Další extrakční metody</i>	21
3.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....	28
3.4.1 <i>Trendy v HPLC</i>	28
3.4.2 <i>Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)</i>	29
3.5 CHROMATOGRAFICKÉ METODY PRO STANOVENÍ TOKOFEROLŮ.....	29
3.5.1 <i>Plynová chromatografie</i>	29
3.5.2 <i>Kapalinová chromatografie</i>	29
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL	30
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	31
4.2.1 <i>Standardy</i>	31
4.2.2 <i>Příprava zásobních a pracovních roztoků</i>	31
4.2.3 <i>Mobilní fáze</i>	33
4.3 POUŽITÝ SOFTWARE	33
4.4 PODMÍNKY UHPLC ANALÝZY.....	33
4.5 PŘÍPRAVA A SEPARACE SÉRA	34
4.6 LLE.....	34
4.6.1 <i>Klasická LLE</i>	34
4.6.2 <i>Miniaturizace LLE</i>	35
4.6.3 <i>Optimalizace Mini LLE</i>	35
4.7 SLE	39
4.7.1 <i>Optimalizace SLE</i>	40

5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
5.1	VÝSLEDNÁ LLE EXTRAKCE	42
5.1.1	<i>Postup LLE extrakce.....</i>	42
5.1.2	<i>Opakovatelnost extrakce.....</i>	43
5.1.3	<i>Výtěžnost extrakce (recovery).....</i>	44
5.2	SLE EXTRAKCE	46
5.2.1	<i>Výsledný postup SLE.....</i>	46
6	ZÁVĚR.....	48
7	SEZNAM ZKRATEK.....	49
8	SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK.....	51
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	52

1 ÚVOD

Vitamín E je řazen mezi vitamíny rozpustné v tucích. Pro jeho široké účinky na organismus patří mezi často studované látky. Nejčastěji je popisována jeho antioxidační aktivita proti volným radikálům. Dále se podílí na správném fungování imunitního, nervového a kardiovaskulárního systému.

Pro hodnocení množství vitamínu E v organismu se nejčastěji provádí jeho stanovení v krvi. V klinické praxi patří krev mezi nejčastěji studované biologické materiály, protože je snadno dostupná. Vzhledem k tomu, že její složení odráží různé biochemické pochody v organismu, jsme schopni podle výsledků laboratorního vyšetření určit zdravotní stav pacienta a definovat správnou diagnózu.

V krvi (séru, plazmě) se ovšem nachází obrovské množství látek v širokém rozmezí koncentrací. Pro úspěšné stanovení vitamínu E pomocí LC techniky je nutná jeho extrakce z biologického materiálu.

Preanalytická fáze, kam patří i úprava vzorku, je velmi důležitou součástí celé bioanalýzy. V preanalýze dochází k největšímu počtu chyb během celého procesu stanovení a kromě toho je i nejvíce časově náročná. Bez správného odběru, skladování, transportu a úpravy vzorku bychom ani s nejdokonalejší a nejcitlivější metodou nebyli schopni detekovat a kvantifikovat analyt správně a přesně. Proto je velmi důležité věnovat potřebný čas pro vývoj a optimalizaci úpravy vzorku, abychom docílili správných výsledků.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla optimalizace extrakční metody pro stanovení tokoferolů v lidském séru pro již vypracovanou UHPLC metodu. Hlavní snahou bylo vypracovat rychlý extrakční proces pro extrakci alfa, beta, gama, delta tokoferolu a retinolu využívající jen malá množství vzorku i rozpouštědel, vhodný pro velké série, který bude sloužit pro pacienty III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vitamín E

Pod názvem vitamín E je skryto několik látek s podobnou strukturou. Jedná se o tokoferoly a tokotrienoly. Jsou to látky lipofilní, a proto vitamín E patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích, společně s vitamínem A, D a K. Tyto látky jsou schopné procházet membránami a tím může docházet k jejich kumulaci v organismu [1, 2].

Vitamín E je významný antioxidant, který brání peroxidaci nenasycených mastných kyselin obsažených ve fosfolipidech buněčných membrán. Zabráněním tohoto procesu je zachována správná funkčnost biologických membrán a nedochází ke vzniku pro organismus nebezpečných látek [3].

Pro jeho veliký význam je důležitá jeho analýza. Tokoferoly se stanovují metodami založenými na různých principech. Mezi nejčastější patří metody spektrofotometrické a chromatografické, popřípadě elektrochromatografické. V dnešní době se nejvíce uplatňují metody chromatografické a to v různých obměnách s cílem separovat různé tokoferoly s vysokou citlivostí a určit jejich přesnou koncentraci v krvi [4, 5].

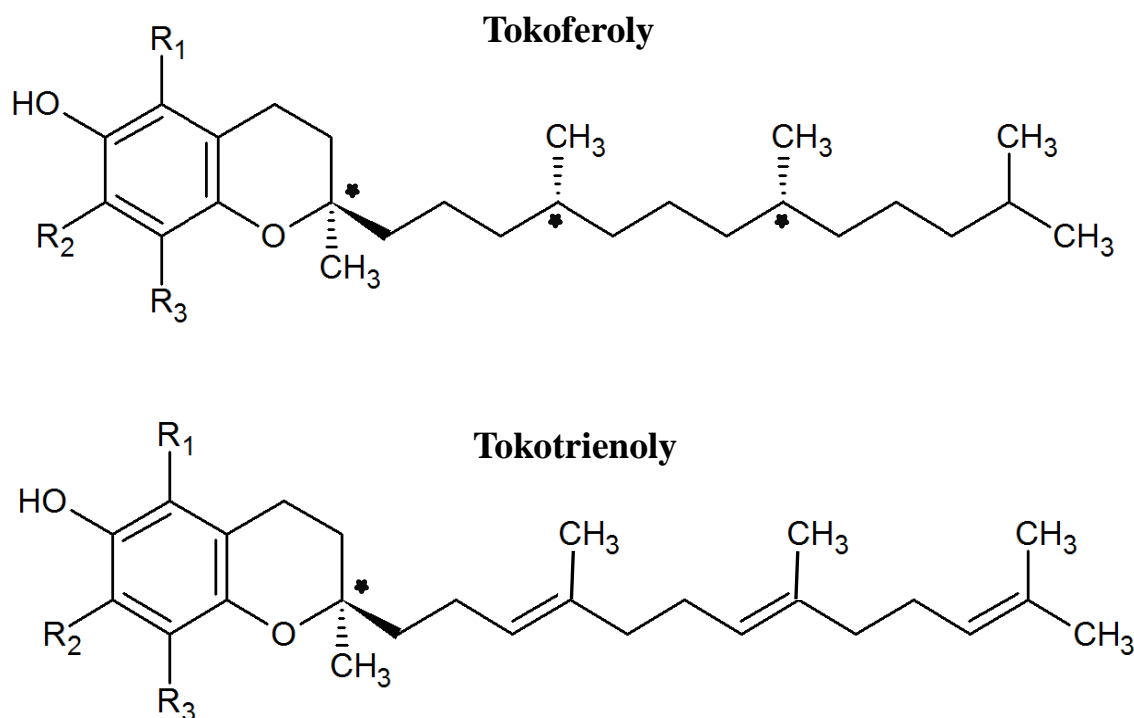
3.1.1 Historie

O objev vitamínu E se roku 1922 zasloužili vědci Evans a Bishop a od té doby je nadále velmi pozorně studován. Byl objeven jako látka, která ovlivňuje plodnost krys. A zřejmě i odtud plyne jeho často používaný název „vitamín plodnosti“ [6]. V roce 1936 byl z pšeničných klíčků prvně izolován α -tokoferol [7]. Původ tohoto pojmenování vychází ze dvou řeckých slov. *Tocos* znamená potomek a *phero* plodit. K objevení jeho chemické struktury a k první syntéze α -tokoferolu došlo o dva roky později [8].

3.1.2 Chemická struktura

Vitamin E se objevuje v 8 různých strukturách. Jedná se o tokoferoly (α -, β -, γ - a δ -) a tokotrienoly (α -, β -, γ - a δ -). Tokoferoly jsou složeny z chromanolového kruhu a ftylového postranního řetězce. Jednotlivé látky se liší počtem a polohou methylových skupin na chromanolovém kruhu. Tokotrienoly jsou jim velmi podobné, jediným rozdílem je přítomnost nenasycených vazeb ve ftylovém řetězci [9].

Tokoferoly ve své struktuře obsahují celkem tři chirální centra. První centrum chiralitity je na uhlíku C2 chromanolového, kruhu a další dvě se nachází na ftylovém řetězci na C4' a C8'. α -Tokoferol se v přírodě vyskytuje pouze v konfiguraci RRR- α -tokoferol (v literatuře značen také jako d- α -tokoferol), zatímco průmyslově vyráběný vitamin E je racemická směs. Ze struktury tokotrienolů vyplývá, že mají pouze jedno chirální centrum na chromanolovém kruhu [1, 10].



R₁	R₂	R₃	Tokoferol/ Tokotrienol
H	H	H	tokol/ tokotrienol
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α
CH ₃	H	CH ₃	β
H	CH ₃	CH ₃	γ
H	H	CH ₃	δ

Obr. 1. Struktura tokoferolů a tokotrienolů (♣ hvězdičkou jsou označena centra chiralit)

3.1.3 Fyzikální vlastnosti

Tokoferoly se při laboratorní teplotě nachází v kapalném stavu v podobě viskózních olejů. Jako čisté látky jsou bezbarvé nebo světle žluté. Díky hydrofobnímu postrannímu řetězci jsou nerozpustné ve vodě a rozpouštějí se v lipofilních rozpouštědlech jako je ether, hexan nebo chloroform. Mají velmi silné redukční schopnosti a snadno dochází k jejich oxidaci. Jsou citlivé na kyslík a jejich citlivost stoupá s počtem methylových skupin. Absorbují v UV oblasti a vykazují fluorescenci. Při delším působení UV záření dochází k jejich rozkladu [11].

3.1.4 Zdroje

Vitamín E si lidské tělo nedokáže syntetizovat, a proto je nutné ho přijímat v potravě. Vyskytuje se především v potravinách rostlinného původu. Nejbohatším zdrojem vitamínu E jsou jedlé rostlinné oleje (slunečnicový, olivový), obilné klíčky, ovesné vločky, ořechy, zelenina a ovoce (například chřest, řepa, špenát, avokádo, maliny, broskve). V potravě živočišného původu se vitamín E vyskytuje také, ale v daleko menším množství [12].

Podle seznamu přídatných látek a aditiv mají tokoferoly v potravinách označení: E306 (extrakt s vysokým obsahem tokoferolů), E307 (α-tokoferol), E308 (γ-tokoferol) a E309 (δ tokoferol) [13].

Denní doporučená dávka je stanovena přibližně na 14 mg α -tokoferolu na den. Přesná hodnota je dána pohlavím a věkem (popsáno v tabulce 1). U zdravých jedinců je nejvyšší tolerovaná dávka na den 1000 mg.

Doporučená dávka α-tokoferolu	(mg/den)
ženy	8 - 10
těhotné ženy	13
ženy (věk > 50 let)	15
muži	10
muži (věk > 50 let)	15
parenterální potřeba/24 hod	10

Tab. 1. Doporučené denní dávky α - tokoferolu [14]

3.1.5 Metabolismus

Příjem vitamínu E do organismu souvisí se vstřebáváním tuků. Je závislý na správné funkci tenkého střeva a vylučování pankreatických enzymů a žluči. Průměrně se vstřebá pouze 30 % vitamínu přítomného v potravě. Tato hodnota je závislá na povaze současně přijatých tuků. Vyšší vstřebávání vitamínu je podporováno nasycenými mastnými kyselinami a naopak k inhibici dochází při příjmu nenasycených mastných kyselin [15, 16].

Ve střevě dochází k hydrolýze esterů tokoferolů přijatých v potravě a tvorbě micel. Micely pasivní difúzí přechází do enterocytů. Protože neexistuje specifický transportní protein z gastrointestinálního traktu, dojde k zabudování vitamínu E do chylomikronů. Ty jsou lymfatickou cestou dopravovány do krevního oběhu, kde lipoproteinová lipáza způsobuje jejich hydrolýzu a tím dojde i k uvolnění volných mastných kyselin společně s vitamínem E do tkání. Zbytky chylomikronů s vitamínem E jsou zachyceny v játrech. Z těch je transportován pomocí VLDL, LDL i HDL do tkání. Na transportu z jater do tkání se podílí i protein α -TTP (α -tocopherol transfer protein) [17]. Je to hlavní regulátor hladiny α -tokoferolu v plazmě. Má afinitu nejen k α - tokoferolu ale i k ostatním formám vitamínu E (β -tokoferol 38%, γ -tokoferol 9%, δ -tokoferol 2%) [18].

Tokoferol se skladuje především v játrech a tukové tkáni, ale v menší míře je přítomen i v ostatních tkáních. Na úrovni buněčných organel jsou tokoferoly uloženy hlavně v plazmatických membránách, v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. Použitý a nadbytečný vitamín E, který se neuloží v organismu, je přeměňován v játrech na hydrofilní látky, které jsou z těla odstraněny močí a stolicí [17].

3.1.6 Hladiny v krvi

Fyziologické hladiny v séru se u dospělých pohybují v rozmezí 19-35 $\mu\text{mol/L}$. Podrobnější informace o hodnotách α -tokoferolu v séru uvádí tabulka 2.

Fyziologické hodnoty α-tokoferolu v séru	$\mu\text{mol/L}$
0 – 1 měsíc	8 – 28
1 – 6 měsíc	10 – 31
6 měsíců – 6 roků	20 – 30
dospělý	19 - 35

Tab. 2. Fyziologické hodnoty α -tokoferolu v séru [14]

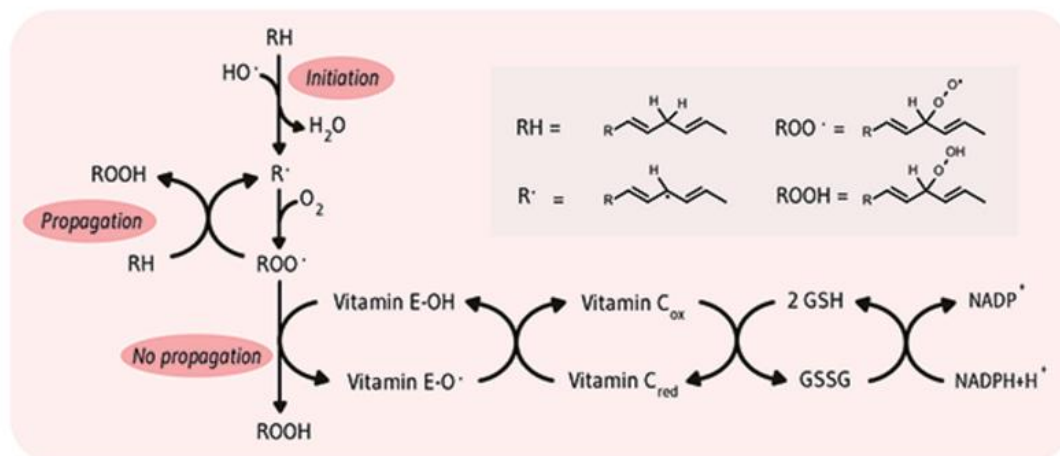
Nedostatečné množství (hypovitaminóza) a absolutní nedostatek (avitaminóza) jsou spojovány především s poruchami příjmu a vstřebávání lipidů nebo chronickým onemocněním jater. Klinické příznaky jsou neurologického charakteru a zahrnují poruchu rovnováhy, snížení reflexů a dále poruchy zraku, ztrátu chuti nebo anémii způsobenou hemolýzou [11, 19].

Toxicita vitamínu E je velmi nízká a vyšší koncentrace (hypervitaminóza) je často nálezem u hyperlipidemie a obstrukce jater. Tyto osoby trpí bolestí hlavy, nauzeou, únavou a svalovou slabostí. V moči lze při hypervitaminóze nalézt zvýšené množství kreatininu s jeho současným poklesem v séru [20].

3.1.7 Funkce tokoferolů

Různé formy vitamínu E nevykazují stejnou biologickou aktivitu. Nejvyšší aktivitu má α -tokoferol a také platí, že přírodní vitamín E má vyšší biologickou aktivitu než syntetický. Biologická aktivita ovšem neodpovídá jeho antioxidační aktivitě [19].

Hlavní funkce α -tokoferolu je ochrana buněk před oxidací volnými kyslíkovými radikály. Na této funkci se společně s α -tokoferolem podílí selen a vitamín C. Jejich role spočívá v tom, že redukují oxidovanou formu využitého α -tokoferolu, aby mohl opět plnit svoji antioxidační funkci [21].



Obr. 2. Antioxidační aktivita vitaminu E [21]

α -Tokoferol je umístěn v membráně buněk v blízkosti polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a chrání je před oxidací, takže nedochází ke vzniku škodlivých lipoperoxidů, které narušují fyziologickou funkci membrán. Vitamín E také zabraňuje oxidaci LDL částic. Jestliže dojde k jejich oxidaci, LDL nejsou rozpoznány svým specifickým receptorem a místo toho jsou odstraněny makrofágy, ze kterých v cévní stěně vzniknou pěnové buňky a dochází k rozvoji aterosklerózy. Bráněním oxidace LDL částic tedy α -tokoferol snižuje riziko vzniku aterosklerózy [22].

β -Tokoferol se rovněž podílí na antioxidační aktivitě vitaminu E, ale nižší měrou než ostatní tokoferoly. Působí především na imunitní systém a posiluje ho.

γ -Tokoferol patří mezi stejně důležité antioxidanty jako α -tokoferol. Jeho hlavní účinek je zamezení vzniku chorob, které jsou spojovány s reaktivními formami dusíku. Mezi zvláště nebezpečné formy dusíku patří oxid dusičitý a peroxydusitan. Tyto toxické produkty se vyskytují u chronického zánětu a γ -tokoferol je schopen snížit zánětlivou reakci. Dále brání před vznikem některých druhů rakoviny a aktivuje geny, které jsou zapojeny do ochrany proti Alzheimerově chorobě. [23, 24].

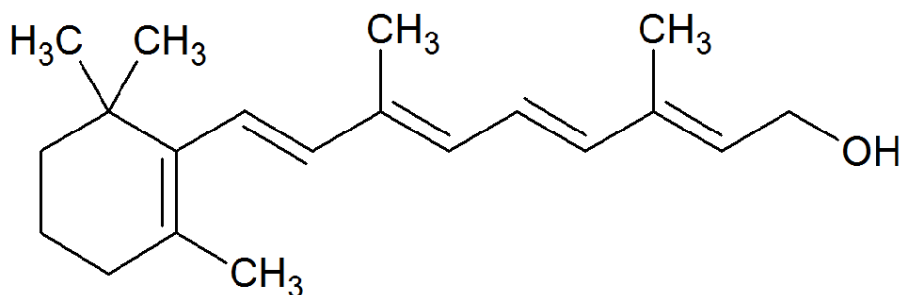
Kromě antioxidačních účinků δ -tokoferolu jsou známy jeho účinky protizánětlivé a antiproliferační. Byla zjištěna indukce apoptózy v různých rakovinových tkáních (rakovina prostaty, prsu). Nezanedbatelnou roli hraje i v ochraně kardiovaskulárního systému [25].

3.2 Vitamín A (retinol)

Retinol je alkoholová forma vitamínu A. Kromě této formy se vitamín A vyskytuje také jako aldehyd (retinaldehyd) a kyselina (kyselina retinová). Vitamín A patří, stejně jako vitamín E, mezi vitamíny rozpustné v tucích. Jeho nedostatek v organismu způsobuje šeroslepost, protože je nezbytný pro tvorbu a funkci rodopsinu. Rovněž hraje důležitou roli jako antioxidant a má protinádorovou aktivitu. Dále se podílí na obnově tkání a epitelii. Kromě zmiňované šerosleposti se jeho nedostatek v organismu projevuje záněty spojivek, rohovatěním kůže, snížením imunity a vyšším sklonem k zánětům. Hypervitaminóza působí teratogenně, způsobuje nechutenství, bolesti hlavy, krvácivé stavy, suchost sliznic a další [26].

Molekula retinolu obsahuje pět konjugovaných dvojných vazeb. První je součástí šestičlenného β -jononového kruhu, další čtyři jsou v postranním řetězci a vytváří příslušné *cis* a *trans*-izomery (celkem 16). Biologickou aktivitu vykazují pouze dva z nich a to *all-trans* a *13-cis, trans*-izomer.

Vitamín A se vyskytuje v potravinách živočišného i rostlinného původu. V rostlinách se nachází ve formě svého provitamínu β -karotenoidu. Nejlepším zdrojem jsou játra, rybí tuk, mléko a další. Ze zeleniny a ovoce je na retinol bohatá mrkev, paprika, špenát, dýně a meruňky [27].



Obr. 3. Struktura retinolu

3.3 Extrakční metody

Pod pojmem extrakce rozumíme separační metodu, při které složka ze směsi látek v jedné fázi (pevné, kapalné) přechází do druhé fáze (nejčastěji kapalné). Extrakce je součástí úpravy vzorku k analýze, při které dochází k přečištění a velmi často i k zakoncentrování stanovované látky v extraktu [28]. Mezi běžné jednoduché techniky patří precipitace proteinů (PP), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na pevnou fázi (SPE). I v této oblasti dochází k modernizaci, a tak se objevují techniky, které mají za svůj cíl zvýšit účinnost metody, snížit objemy vzorku i rozpouštědel a zkrátit její čas. Jako příklad moderních metod můžeme uvést mikroextrakci na tuhé fázi (SPME), mikroextrakci z kapaliny do kapaliny (LPME), molekulárně vtištěné polymery (MIPs), materiál s omezeným přístupem (RAM) a další. Nevýhodou těchto metod bývá větší finanční náročnost.

Mezi základní techniky v laboratoři využívané nejen k extrakčním postupům patří centrifugace a filtrace. Mohou být použity i samostatně k jednoduché úpravě vzorku, ale větší roli hrají jako pomocné metody u složitějších aplikací.

3.3.1 Centrifugace

Centrifugace neboli odstředování je separace částic z roztoku na základě jejich rozdílných hustot pomocí relativní odstředivé síly. Dochází k urychlení rozdělení složek směsi oproti působení pouze gravitační síly. K tomu slouží přístroje nazývané centrifugy. Každá částice vlivem působení odstředivé síly na vzorek sedimentuje úměrně svým fyzikálním vlastnostem a viskozitě vzorku. Nejdůležitějšími částmi centrifugy jsou rotor a motor, který uvádí centrifugu do pohybu. Existuje několik druhů rotorů s různou stavbou, podle které rozlišujeme rotory výkyvné, vertikální a úhlové [29].

Velikost odstředivé síly (F) je závislá na rychlosti rotoru a jeho průměru. K jejímu výpočtu slouží vztah:

$$F = m \cdot r \cdot \omega^2,$$

kde m je hmotnost částice, r je poloměr otáčení a ω je úhlová rychlost

($\omega = 2\pi \cdot f$, kde f je frekvence otáček za sekundu).

Prakticky se ovšem zavedla veličina relativní centrifugační síla (RCF), která uvádí kolikrát je zrychlení vyvolané rotací vyšší než tíhové zrychlení g. Udává se v násobcích g, je bezrozměrná a je dána vztahem $RCF = r \cdot \omega^2/g$. Z této definice plyne často používaný vztah:

$$RCF = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot \text{rpm}^2,$$

kde rpm je počet otáček za minutu a r je poloměr otáčení v cm.

Pro správnou interpretaci je proto vhodnější uvádět hodnotu v RCF, což umožní jednoduchým přepočtem aplikovat postup práce pro konkrétní typ centrifugy. Dále je důležité uvádět teplotu centrifugace vzhledem k velkému vlivu na viskozitu vzorku [30].

3.3.2 Filtrace

Filtrace je způsob oddělování pevných látek z roztoku za pomoci pórovitých materiálů. Úkolem je odstranění nežádoucích nerozpustných látek ze vzorku. Používají se filtry s různou velikostí pórů. Filtry se vyrábějí z různých materiálů (nylon, celulóza, skleněná mikrovlákna), aby byly odolné vůči většině druhů rozpouštědel a měly široké uplatnění. I v této oblasti dochází k pokroku a miniaturizaci. Běžně se na trhu vyskytují stříkačkové filtry pro jednodušší aplikaci a filtrační mikrotitrační destičky [31].

3.3.3 Precipitace proteinů (PP)

Proteiny jsou v roztoku rozpustné díky svému náboji a solvatačnímu obalu. Jestliže dojde k jejich ztrátě, bílkoviny se spojí do nerozpustné sraženiny. Rozlišujeme precipitaci reverzibilní (vratnou) a ireverzibilní (nevratnou). PP je nejrychlejší, nejlevnější a nejjednodušší přístup k úpravě vzorku, vhodná pro hydrofilní i hydrofobní látky.

Vysolování je technika, kdy při použití vhodných koncentrací solí lze z roztoku precipitovat různé frakce bílkovin. Proteiny zůstávají v nativním stavu a lze je opět rozpustit a dále s nimi pracovat. Přidáním neutrálních solí k roztoku dojde k narušení vazeb protein-voda a převládnu vazby protein-protein, čímž dojde k vysrážení proteinů z roztoku. Nejčastěji se používají soli amonné, alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin.

Precipitace solemi těžkých kovů je nevratná, dochází k tvorbě nerozpustných komplexních sloučenin a bílkovina ztrácí náboj. Při nadbytku solí těžkých kovů může náboj opět získat a dojde k jejímu opětovnému rozpuštění, ale už nedojde k obnově funkce proteinu, protože byla narušena jeho sekundární struktura.

Další možností k vysrážení bílkovin je použití minerálních kyselin (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl) nebo organických kyselin (trichloroctová, sulfosalicylová).

Vůbec nejčastěji se však bílkoviny precipitují nepolárními organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou. Jedná se především o aceton, ethanol, methanol, isopropylalkohol a diethylether. Při této technice probíhá srážení nejčastěji za nízké teploty ($< 5\text{ }^\circ\text{C}$), která podpoří účinnost organického rozpouštědla [32].

Výše uvedené precipitační techniky jsou založeny na chemickém působení, nicméně proteiny lze precipitovat i za použití fyzikálních veličin. K precipitaci se využívá zvýšená teplota (většina proteinů precipituje okolo $40\text{ }^\circ\text{C}$), také již zmíněná snížená teplota, změna pH nebo ultrazvuk. Dalším typem precipitace je afinitní precipitace či imunoprecipitace. Jedná se o velmi selektivní metody [33].

Výhodou precipitace je, že se jedná o metodu velmi rychlou, levnou a jednoduchou na provedení, pro kterou laboratoř nemusí disponovat složitým instrumentálním vybavením. Nevýhodou je ale možnost vzniku extraktů s velkým množstvím balastních látek a tuto metodu nelze použít, jestliže dochází k vazbě sledovaného analytu na precipitát.

3.3.4 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

Principem LLE je přechod sledované látky z výchozího vzorku (obvykle vodná fáze) do rozpouštědla (organická fáze) na základě její rozdílné rozpustnosti v těchto fázích. Použité kapaliny musí být nemísitelné, aby se mezi nimi vytvořilo fázové rozhraní a ustanovila se rovnováha. Důležité je, aby analyt byl rozpustný ve zvoleném organickém rozpouštědle. Rozpuštění dosáhneme upravením pH původního vodného roztoku. Nejjednodušší provedení je vytřepávání v dělicí nálevce. Pro vyšší výtěžnost je potřeba extrakci opakovat. Postupem času došlo k automatizaci tohoto procesu a k náhradě dělicích nálevek zkumavkami a mikrozkuškami ve snaze snížit objemy vzorků a rozpouštědel. Tato metoda není vhodná pro hydrofilní látky kvůli jejich nedostatečnému přechodu do organické fáze. Další nevýhodou je tvorba emulzí a příliš

vysoká spotřeba organických rozpouštědel. Někdy je nutné použít rozpouštědlo odpařit a analyt rozpustit ve více kompatibilním rozpouštědle, což je další krok navíc. Extrakce z kapaliny do kapaliny je však velmi jednoduchá a není třeba využívat složitou instrumentaci [34].

3.3.5 Extrakce na pevnou fázi (SPE)

Jedná se o široce používanou techniku přečištění a zakoncentrování vzorku v laboratořích nejrůznějšího zaměření. Je založena na rozdělení mezi kapalnou a pevnou fází díky vzniku nepolárních, polárních i iontových interakcí. Metoda je principem podobná kapalinové chromatografii. Podle vlastností analytu a požadované selektivity rozhodujeme o použitém sorbentu. Základním typem je různě modifikovaný silikagel. Rozlišujeme sorbenty polární, nepolární, iontově-výměnné, polymerní, vícemodální a imunosorbenty. Existuje široká škála různých druhů a výběr sorbentu patří mezi klíčové kroky pro úspěšnou extrakci. Sorbent se většinou používá v uspořádání kolony nebo disku.

Proces SPE se skládá z několika kroků:

Kondicionace

Prvním krokem je aktivace sorbentu. Kolona či disk se propláchne předepsaným rozpouštědlem a tím dojde ke správné poloze navázaných skupin, což je nezbytné pro zachycení analyzované sloučeniny. Dále se použije rozpouštědlo nebo pufr, čímž se upraví prostředí vhodné pro použití vzorek.

Dávkování vzorku

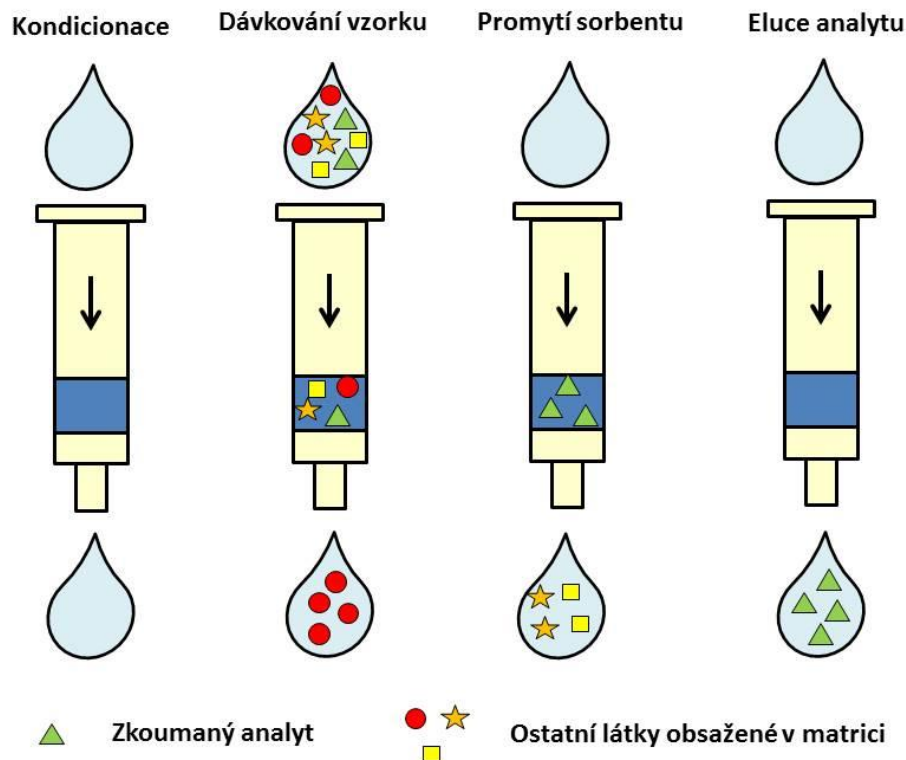
Následuje aplikace vzorku. Požadovaný analyt se zachycuje v sorbentu. Probíhající sorbce musí být reverzibilní.

Promývání sorbentu

Promývání kolony (disku) vhodným rozpouštědlem vede k odstranění zbytků matrice vzorku. Promývací činidlo má větší afinitu k matrici. Analyt je v něm nerozpustný, takže zůstává zachycený v sorbentu.

Eluce analytu

V tomto kroku dochází k uvolnění (desorpci) analytu z pevné fáze pomocí elučního rozpouštědla, které je selektivní pro danou látku. Získaný eluát se použije pro další analýzu.



Obr. 4. Princip SPE

Pro zvýšení rychlosti průtoku kapalin se využívá obvykle podtlak. SPE lze přímo spojit s analytickou metodou (nejčastěji HPLC). Toto zapojení se nazývá online SPE. Jedná se o plně automatizovaný proces s možností použití biologického materiálu bez předchozí úpravy vzorku. Výhodou SPE je dobrá výtěžnost a nižší spotřeba rozpouštědel. Nezbytné je speciální instrumentální vybavení. SPE kolonky jsou pouze na jedno použití, proto jsou cenově náročnější. Objevují se i problémy s reprodukovatelností výsledků mezi kolonkami různých šarží [34, 35].

3.3.6 Extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází (SLE)

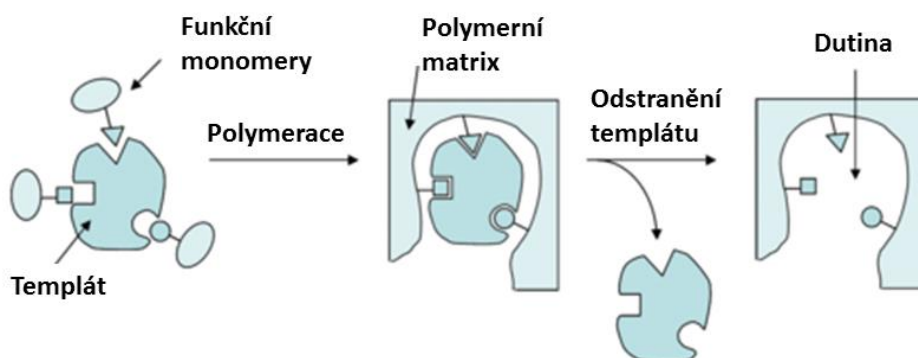
Pro zjednodušení přípravy vzorku můžeme použít i extrakci SLE (Simplified liquid extraction) neboli podporovanou extrakci kapalina – kapalina na povrchu syntetické křemeliny. Tato křemelina má stejné vlastnosti jako vodná fáze při tradiční LLE. Výhodou syntetické křemeliny je to, že jde o poměrně symetrické částice. Tím je zajištěna vyšší opakovatelnost extrakce než u přírodního materiálu. Extrakce probíhá na kolonkách nebo mikrodestičkách, lze tedy zpracovávat velké i malé objemy. V postupu jsou odstraněny kroky třepání a centrifugace, což výrazně snižuje dobu přípravy vzorku. Nedochozí ke vzniku emulzí a tím je snížena spotřeba vzorku. Tato metoda se dá snadno automatizovat, čímž se zvyšuje efektivita techniky [36].

3.3.7 Další extrakční metody

Přestože dochází k modernizaci extrakčních technik, úprava vzorku je stále nejpomalejším krokem analýzy. To vede k vývoji stále nových postupů ve snaze zkrátit čas potřebný na přípravu vzorku. Dalšími požadavky na nové techniky je snížení spotřeby rozpouštědel a vzorku, zvýšení selektivity, snížení počtu kroků na minimum (omezení vzniku chyb) a možnost snadné automatizace. Proto dochází k rozvoji online technik, velmi selektivních metod a mikroextrakcí.

3.3.7.1 Molekulárně vtištěné polymery (MIPs – Molecularly imprinted polymers)

Metoda MIPs je velmi selektivní pro určené látky. To je dáno tím, že si sorbent uchovává sterickou a chemickou paměť pro templát, který byl použit při jeho výrobě. Jako templát se použije látka velmi podobná stanovovanému analytu. Dochází ke vzniku komplexu templátu s funkčními monomery, následuje jejich polymerace a odstranění templátu, po kterém se vytvoří komplementární dutiny. Templátem není přímo stanovovaná látka, nýbrž se vybírá její strukturní analog. V tomto případě nedochází k tzv. krvácení templátu, kdy jeho nedostatečné odstranění ze sorbentu způsobuje neschopnost správné kvantifikace látek ve stopových koncentracích. Hlavní výhodou je vysoká selektivita a stabilita sorbentu, který lze použít opakovaně. Výrobní proces ještě není dokonalý, protože vzniká nedostatečné množství vazebných míst pro analyt, což vede k nízké výtěžnosti. Vazba není vždy plně specifická a prozatím existuje pouze malé množství sorbentů pro určité použití především v oblasti léčiv a jejich metabolitů [37].



Obr. 5. Příprava molekulárně vtištěných polymerů (MIPs) [38]

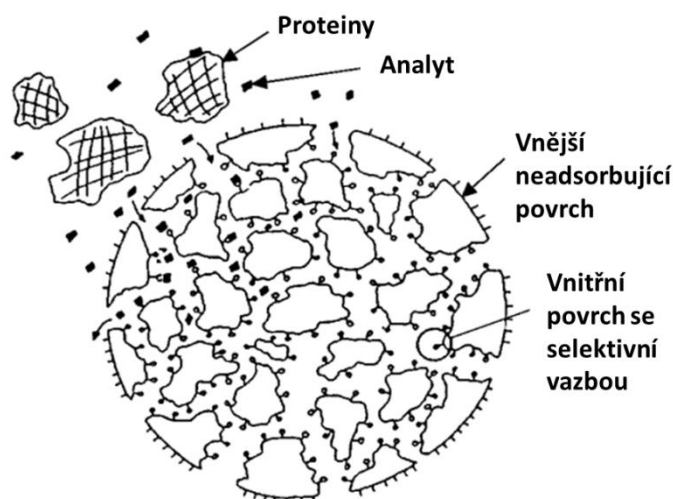
3.3.7.2 Imunoafinitní SPE (IA-SPE – Immunoaffinity solid phase extraction)

Jedná se o selektivní verzi klasické SPE. Na povrch sorbentu je navázaná specifická protilátka proti stanovovanému analytu a selekce probíhá na podkladě vazby antigen-protilátka. To vede k velmi vysoké specifitě a možnosti separovat velmi podobné struktury. Využívají se polyklonální i monoklonální protilátky. Vývoj specifické protilátky je mezním krokem při přípravě IA-SPE. Látky s velkou molekulou (např. hormony, peptidy, enzymy) nepředstavují problém, ale malé molekuly jsou málo imunogenní, a proto je získání protilátky velmi obtížné.

Mezi výhody patří velice selektivní extrakce, možnost opakovaného použití a online zapojení do chromatografického systému pomocí vícecestného ventilu a tím kompletní automatizace. Nevýhodou je limitované množství na trhu dostupných SPE imunoafinitních kolonek pouze pro určité stanovované látky. Jedná se především o léčiva a další biologicky aktivní látky. Běžně dostupné jsou komerční SPE kolonky pro stanovení aflatoxinů a ochratoxinu A [39].

3.3.7.3 Materiál s omezeným přístupem (RAM - Restricted access materials)

Tato metoda byla vyvinuta pro analýzu molekul s nízkou molekulovou hmotností ve složitých biologických maticích. Předností této metody je to, že nevyžaduje předešlou úpravu vzorku a matici lze dávkovat přímo. Interakce mezi analytem a sorbentem probíhá uvnitř pórů, kam mají přístup pouze malé molekuly a makromolekuly (například proteiny) jsou odstraněny. Dochází k retenci díky interakcím dle typu sorbentu. K odstranění makromolekul zde slouží buď velikost pórů (fyzikální bariéra) nebo hydrofilní skupiny a polymerní sítě vázané na povrchu sorbentu (chemická bariéra) [40, 41].

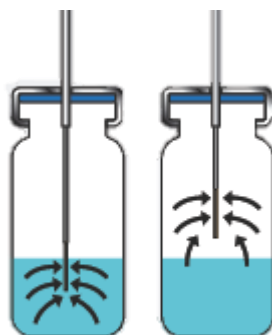


Obr. 6. Struktura materiálu s omezeným přístupem (RAM) [42]

3.3.7.4 Mikroextrakce na principu SPE

Mikroextrakce na tuhé fázi (SPME – Solid phase microextraction)

Jde o velmi jednoduchou a přitom účinnou adsorbční či absorbční metodu, která slouží pro zakoncentrování analytu. Zařízením SPME je speciální stříkačka, jejíž nejdůležitější částí je křemenné vlákno, dlouhé asi 1 cm, které je pokryto stacionární fází. Nejčastěji se používají polymery, především PDMS (polydimethylsiloxan). Metodu lze použít pro extrakci polárních, nepolárních, těkavých i netěkavých látek. Vzhledem k vlastnostem sledovaného analytu vybíráme stacionární fázi. Na účinnosti extrakce má vliv tloušťka vrstvy stacionární fáze, doba sorbce, zahřívání vzorku, míchání vzorku i objem vzorku. Existují dva způsoby použití SPME. První se označuje jako přímá SPME, známa pod zkratkou DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které dochází k přímému ponoření vlákna do vzorku. Takto se zpracovávají kapalné vzorky. Druhým způsobem je headspace SPME (HS-SPME). Principem je extrakce v prostoru nad hladinou vzorku v uzavřené nádobě k analýze těkavých sloučenin. Nespornou výhodou této metody je absence rozpouštědel. Nevýhodou je křehkost vlákna a časová náročnost k ustálení rovnováhy analytu při sorpci i desorbci [43, 44].



Obr. 7. Rozdíl techniky DI-SPME a HS-SPME [45]

Mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu

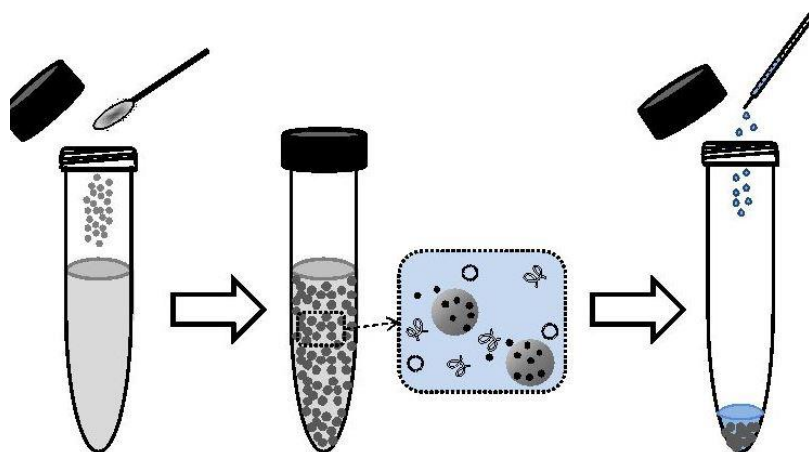
(MEPS – Microextraction by packed sorbent)

Tato metoda je založena na miniaturizaci klasického SPE. Využívá daleko nižších objemů (v jednotkách mikrolitrů) a lze ji snadno automatizovat. Sorbent není uložen v koloně, ale v injekční jehle, která je spojena s mikroinjekční stříkačkou. Vzorek se opakovaně vtáhne do jehly se sorbentem, čímž dochází k vazbě analytu na sorbent. Následuje promytí balastních látek vhodným promývacím rozpouštědlem. Eluce

probíhá přímo do injektoru chromatografického systému. Významnou výhodou je i daleko vyšší životnost než u klasického SPE na jedno použití. Podle typu matrice se může jednat až o sto extrakcí na jediném sorbentu. Metoda je i vysoce robustní a časově nenáročná [46].

Disperzní SPE (dSPE)

Sorbent pro plnění klasických kolon se použije jako sypká směs a přidá se ke vzorku. Tím dochází ke snadnějšímu kontaktu analytu se sorbentem, čímž se zvýší účinnost extrakce. K separaci sorbentu od matrice se používá centrifugace. Dalším krokem je eluce analytu ze sorbentu vhodným rozpouštědlem.



Obr. 8. Princip dSPE [47]

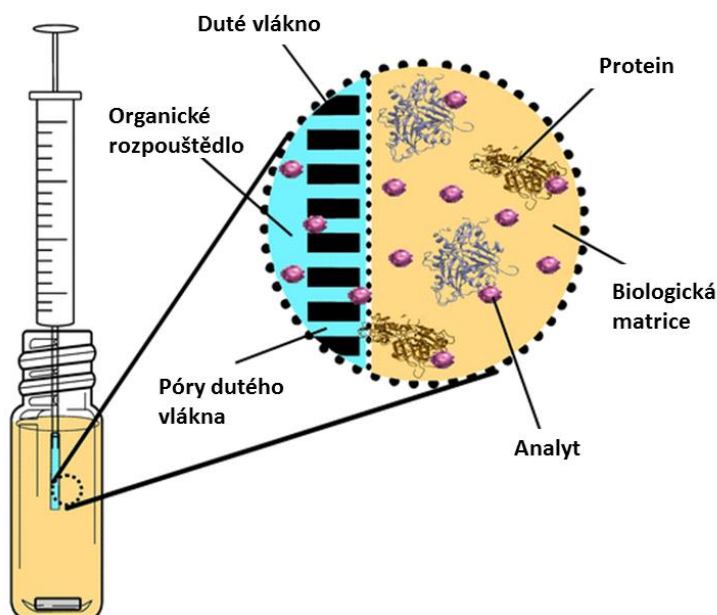
Na principu dSPE pracuje i metoda zvaná QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Její vlastnosti jsou shrnuty již v názvu: je rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní a bezpečná. Metoda nachází využití především v analýze pesticidů v potravinách, ale její modifikací ji lze použít pro různé analyty a matrice. Zahrnuje postup: extrakci rozpouštědlem (acetonitril, ethylacetát, aceton), vysolování přidávkem bezvodého síranu hořečnatého se směsí různých solí, disperzní SPE a analýzu pomocí HPLC [48].

3.3.7.5 Mikroextrakce na principu LLE

Extrakce v kapaln  fázi pomocí dutého vlákna

(HF-LPME – Hollow fibre liquid phase microextraction)

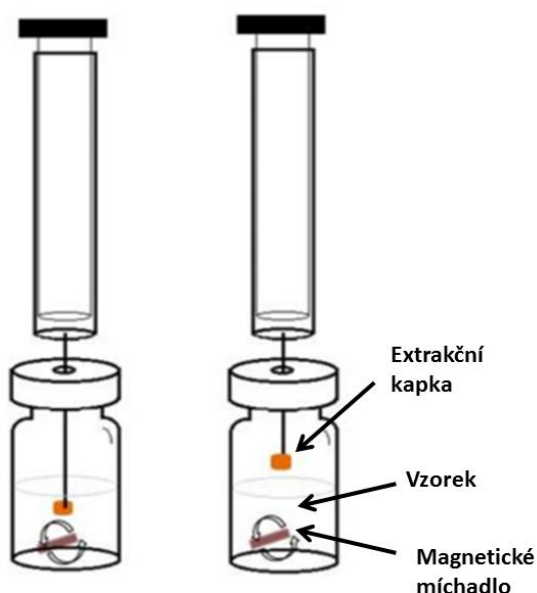
Tato extrakce vyu ziv  dutého vlákna, kter  slu e jako ochrann  vrstva. Hydrofobní vlákno je porézní a uvnitř p r  se nachází rozpouřt dlo. Je-li rozpouřt dlo organick , jedná se o dvouf zov  HF-LPME. P r padn  je-li vodn , mluvíme o t r f zov  HF-LPME. Extrakce probíhá z vodn ho vzorku do rozpouřt dla v p rech vlákna. Takto funguje dvouf zov  HF-LPME. T r f zov  HF-LPME má navíc tzv. supported liquid membrane (SLM) tvořenou organick m rozpouřt dlem a přes n  prochází do vodn  vnitřní fáze. Proto se někdy mluví o technice HF-LLLME (hollow fiber liquid-liquid-liquid micro-extraction). Výhodou je vyřř  u innost a možnost analýzy komplexních vzorků kvůli ochraně extrakční fáze vláknem. Vlákno je bohužel hodn  křehk  a hrozí jeho zni en  [49].



Obr. 9. Extrakce v kapaln  fázi pomocí dutého vlákna (HF-LPME) [50]

Extrakce do jedné kapky rozpouštědla (SDME – Single drop microextraction)

Principem je stejně jako klasická LLE ustanovení rovnováhy mezi analytem a vhodným rozpouštědlem. V této metodě se používá opravdu minimální množství extrakčního rozpouštědla a to pouze jediná kapka. Jedná se o objemy až 1-2 μl . Praktické použití se provádí pomocí Hamiltonovy stříkačky, ve které je obsaženo vybrané rozpouštědlo, které je nemísitelné s vodou. Stříkačkou se propíchnou septum vialky a ponoří se do vzorku. Na konci jehly se vytvoří jediná kapka rozpouštědla. Vzorek je neustále míchán magnetickým míchadlem. Po vytvoření rovnováhy se kapka znovu vtáhne do stříkačky. Nevýhody této metody jsou vysoká nestabilita kapky (utrnutí kapky), dlouhý extrakční čas a je nutná určitá zručnost pracovníka [51]. Přesněji tuto metodu nazýváme DI-SDME (Direct immersion single-drop microextraction). Je možné aplikovat i HS-SDME (Headspace single-drop microextraction), kdy se kapka rozpouštědla umístí nad hladinu matrice. V tomto případě dochází k několika krokům najednou. Vzorek se extrahuje, koncentruje a je-li v kapce rozpouštědla přítomné derivatizační činidlo, tak i derivatizuje. Lze použít vodné i organické rozpouštědlo, protože vzorek s ním není ve styku. Metodu lze ovšem využít jen na těkavé látky.



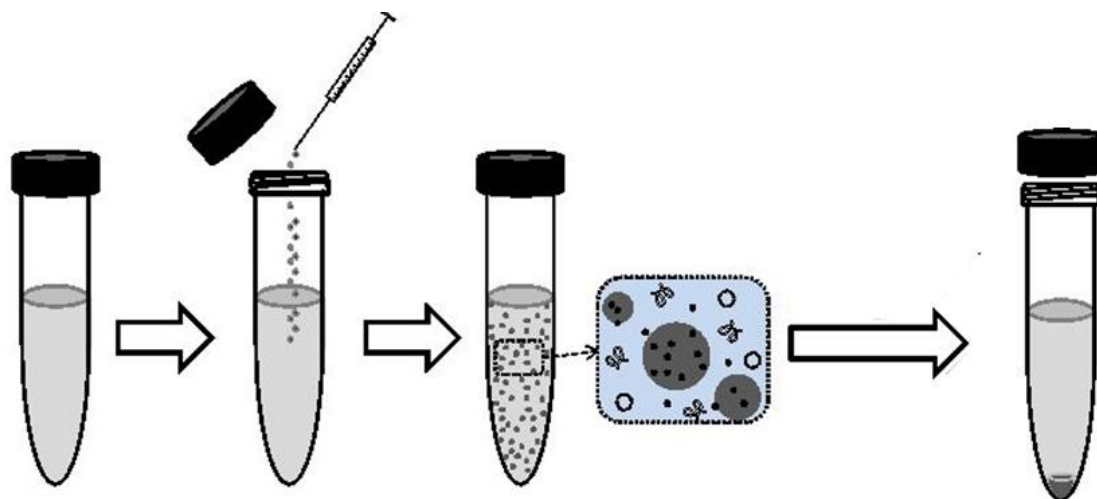
Obr. 10. Metoda mikroextrakce do jedné kapky, vlevo DI-SDME a vpravo HS-SDME [52]

Tato metoda se v průběhu vývoje a času dočkala několika modifikací. Můžeme zmínit drop to drop mikroextrakce (DDME), mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (LLLME) a mikroextrakce na přímo suspendované kapce (DSDME).

Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

(DLLME – Dispersive liquid-liquid microextraction)

Při této mikroextrakci se používají dva typy rozpouštědel – extrakční a disperzní. Principem je přidání obou rozpouštědel do vzorku, čímž vzniká disperzní systém. Tím dochází k velmi rychlé extrakční rovnováze, což je velkou výhodou. Poté je nutné systémy od sebe oddělit a toho se docílí použitím centrifugace. Protože se jako extrakční činidla používají rozpouštědla, která jsou těžší než voda (chloroform, nitrobenzen, brombenzen), extrahovaná fáze se usadí na dně. Jako disperzní rozpouštědlo se používají látky polární mísitelné s vodou (aceton, acetonitril, methylalkohol). Technika je to velmi levná a snadná, ale obtížně se automatizuje. Rozpouštědla jsou používána v malém množství, ale jejich výběr je obtížnější než u ostatním metod, protože jsou vysoce nebezpečná pro životní prostředí [53, 54].



Obr. 11. Princip disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny [47]

3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Obecně je chromatografie fyzikálně-chemická separační metoda, založená na odlišném chování látek mezi mobilní a stacionární fází. V kapalinové chromatografii je mobilní fáze v kapalném stavu a její pohyb kolonou se stacionární fází je dán zvýšeným tlakem [55]. HPLC umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení a je známá pro svou vysokou citlivost, opakovatelnost a robustnost. Tyto vlastnosti z ní dělají jednu z nejpoužívanějších technik v dnešní době a to napříč různými odvětvími [29].

3.4.1. Trendy v HPLC

V každém odvětví dochází k pokroku a tato metoda se vyvíjí především dvěma směry. První přístup se zabývá zlepšováním vlastností a vzniku nových stacionárních fází (SF) a přístup druhý se zaměřuje na celkovou instrumentaci HPLC.

Výběr stacionární fáze patří mezi nejdůležitější kroky analýzy, protože druh stacionární fáze ovlivňuje výsledek separace. Obecně se SF dělí na normální (SF je polární) a reverzní (SF je nepolární). Reverzní uskupení je mnohem používanější, zejména díky nižší toxicitě mobilních fází, které se s tímto typem SF pojí. Nejběžnější reverzní SF je modifikovaný silikagel (C18, C8, fluorované fáze, fenylové fáze a další) [55].

Velikost částic je určující veličina pro separační účinnost analýzy. Jejich zmenšování z původní velikosti 10 μm došlo až na velikosti 1,7 μm . Zmenšování částic s sebou nese i mnohá negativa. Jedná se o vyšší zpětný tlak, ucpávání kolon a jejich cena. Společně se zmenšením částic dochází ke zvýšení separační účinnosti a tím ke zkrácení celkové doby analýzy (nabízí se tím i uplatnění kolony s menšími rozměry). Kvůli vyšším zpětným tlakům bylo nutné vyvinout instrumentaci, která těmto tlakům odolá [56].

Na trhu se objevily kromě plně porézních kolon i nové technologie. Jmenovat můžeme porézní částice s neporézním jádrem nebo monolitické kolony druhé generace, umožňující použití v UHPLC systému.

3.4.2. Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

UHPLC je označení separační techniky, která při analýze využívá vysoké tlaky (40 MPa a vyšší). Často se v literatuře objevuje i označení UPLC, což je obchodní značka firmy Waters Corporation [57].

Oproti technice HPLC přináší možnosti kratší doby analýzy, zvýšení separační účinnosti a citlivosti. Nevýhodou je vyšší finanční náročnost, nejen kvůli nezbytnosti vysokotlakých čerpadel, která jsou schopna pracovat za vysokých tlaků. Metoda UHPLC využívá kolony s částicemi menšími než 2 μm , což umožňuje zvýšení separační účinnosti. Použití částic o takto malé velikosti vede k vzrůstajícímu tlaku na koloně, k čemuž je technika UHPLC uzpůsobena. Nejsou kladeny jen požadavky na mechanickou odolnost vůči vysokým tlakům, ale také na rychlost sběru dat a použití nízkoobjemové detekční cely [58].

Vzrůstající oblíbenost této metody je dána především jejími vlastnosti, jako je vysoká účinnost, rychlost, citlivost a nízká spotřeba rozpouštědel a vzorku.

3.5 Chromatografické metody pro stanovení tokoferolů

3.5.1 Plynová chromatografie (GC)

V minulosti byly tokoferoly nejčastěji stanovovány metodou plynové chromatografie. I dnes je stanovení obsahu α -tokoferolu podle Českého lékopisu prováděno pomocí GC za použití dotriakontanu R jako vnitřního standardu [59].

3.5.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Mezi vůbec nejpoužívanější techniku pro stanovení tokoferolů patří kapalinová chromatografie (HPLC a UHPLC) ve spojení s UV/PDA detekcí.

HPLC lze využít jak na normální tak reverzní fázi. Při použití normální fáze je možné separovat tokoferoly a tokotrienoly. Přesto se nejčastěji pracuje na reverzní fázi s ohledem na šetrnost k životnímu prostředí. Nejběžněji se používá jako mobilní fáze methanol, který je buď 100%, nebo s malým přídatkem modifikátoru [5, 60, 61].

Pro detekci se využívá absorpce tokoferolů v UV oblasti 292-298 nm nebo fluorescence s excitačním maximem v 291-300 nm a emisním v 324-329 nm [5].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístrojové vybavení a materiál

Kapalinový chromatograf UHPLC Nexera, Shimadzu (Kyoto, Japonsko):

- Nexera Liquid chromatograph LC-30AD
- Degasér DGU 20A3
- Pumpa LC-30- AD (2x)
- Autosapler SIL/30AC
- Rack Changer II.
- Kolonový termostat CT-20AC
- Komunikační modul CMB-20A
- UV/VIS detektor SPD-20A

Analytické váhy LE 623-OCE, Sartorius (Göttingen, Německo)

Centrifuga D3024R Scilogex (Rocky Hill, USA)

Koncentrátor AD 5301 Eppendorf (Hamburg, Německo)

Laboratorní třepačka Genie 2T SI-0256, Scientific Industries (New York, USA)

Mechanické pipety mLine, Sartorius (Göttingen, Německo)

pH metr Sentron (Leek, Nizozemí)

SPE 24 Position Vacuum Manifold, Phenomenex (Torrance, USA)

Vakuové čerpadlo Vacc space 50, Chromservis (Praha, Česká republika)

Vakuový manifold pro mikrotitrační destičky, Pall Life Science (Port Washington, USA)

Hydrofilní polypropylenové membránové filtry, 47 mm, 0,2 μm , Pall Life Science (Port Washington, USA)

Novum SLE kolonky, 3 ml tube, Phenomenex (Torrance, USA)

4.2 Použité chemikálie

Ethanol p.a. (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

Ethylacetát LC-MS CHROMASOLV (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

Hexan HPLC-grade (Merck Millipore, Darmstadt, Německo)

Methanol LC-MS CHROMASOLV (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

Voda LC-MS CHROMASOLV (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

Octan amonný LC-MS (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

4.2.1. Standardy

Tocopherol set Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) obsahuje α - tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol a δ -tokoferol

Retinol (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)

Tokol 50 mg/mL, rozpuštěno v hexanu (Matreya, State College, USA)

4.2.2. Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky

Zásobní roztok α -tokoferolu $c = 2031,06 \mu\text{mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 43,741 mg α -tokoferolu v hexanu a doplněn kvantitativně do 50 mL.

Zásobní roztok β -tokoferolu $c = 2399,08 \mu\text{mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 19,993 mg β -tokoferolu v hexanu a doplněn kvantitativně do 20 mL.

Zásobní roztok γ -tokoferolu $c = 2495,92 \mu\text{mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 20,800 mg γ -tokoferolu v hexanu a doplněn kvantitativně do 20 mL.

Zásobní roztok δ -tokoferolu $c = 999,63 \mu\text{mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 8,050 mg δ -tokoferolu v hexanu a doplněn kvantitativně do 20 mL.

Zásobní roztok tokolu $c = 500 \mu\text{mol/L}$ byl připraven naředěním roztoku tokolu $c = 50 \text{ mg/mL}$ methanolem.

Zásobní roztok retinolu $c = 547,52 \mu\text{mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 3,137 mg retinolu v methanolu a doplněn kvantitativně do 20 mL.

Pracovní roztoky

Zásobní roztok α -tokoferolu o koncentraci $c = 2031,06 \mu\text{mol/L}$ byl naředěn methanolem na pracovní roztoky o koncentracích:

$$c = 5,64 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 11,28 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 30,00 \mu\text{mol/L}$$

Zásobní roztok β -tokoferolu o koncentraci $c = 2399,08 \mu\text{mol/L}$ byl naředěn methanolem na pracovní roztoky o koncentracích:

$$c = 1,19 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 5,33 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 5,55 \mu\text{mol/L}$$

Zásobní roztok γ -tokoferolu o koncentraci $c = 2495,92 \mu\text{mol/L}$ byl naředěn methanolem na pracovní roztoky o koncentracích:

$$c = 0,69 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 5,55 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 3,00 \mu\text{mol/L}$$

Zásobní roztok δ -tokoferolu o koncentraci $c = 999,63 \mu\text{mol/L}$ byl naředěn methanolem na pracovní roztoky o koncentracích:

$$c = 0,36 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 0,57 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 3,04 \mu\text{mol/L}$$

Zásobní roztok retinolu o koncentraci $c = 547,52 \mu\text{mol/L}$ byl naředěn methanolem na pracovní roztoky o koncentracích:

$$c = 1,52 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 3,04 \mu\text{mol/L}$$

$$c = 11,28 \mu\text{mol/L}$$

4.2.3. Mobilní fáze

Jako mobilní fázi jsme používali směs 100% methanolu a 1% octanu amonného (AMAC) v poměru 84:16 (v/v).

Příprava 1% AMAC: Navážit 2 g na analytických vahách a rozpustit v LC-MS H₂O v 200 mL odměrné baňce. Nechat rozpustit a doplnit do 200 mL. Přefiltrovat přes hydrofilní polypropylenové membránové filtry, 47 mm, 0,2 µm, pomocí vakuového čerpadla Vacc space 50.

4.3 Použitý software

Pro vytvoření seznamu citací jsme použili program Reference Manager 12.0.3 (Thomson Reuters, Carlsbad, USA), tvorba tabulek a grafů probíhala v Microsoft Excel 2010, úprava a tvorba obrázků v Microsoft PowerPoint 2010, psaní textu v Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), vytvoření struktur analytů v DiagramStudio 5.7 (Gadwin Systems, Tula, Rusko) a pro UHPLC analýzu byl využit software LC Solution (Kyoto, Japonsko).

4.4 Podmínky UHPLC analýzy

Tato diplomová práce navazuje na diplomovou práci „Separace tokoferolů s využitím HPLC a UHPLC techniky“, která se zabývá výběrem podmínek pro chromatografickou analýzu pro stanovení tokoferolů. Vybrané podmínky a parametry, které byly použity:

mobilní fáze: 84% methanol + 16 % AMAC (1%)

kolona: PFP Kinetex 150x4,6 mm, velikost částic 2,6 µm

průtok mobilní fáze: 2,2 mL/min

nástřík: 7 µL

doba analýzy: 7,5 min

detekce: fluorescenční detektor:

tokoferoly EX 295 nm, EM 325 nm, retinol EX 325 nm, EM 480 nm

teplota: 50 °C

4.5 Příprava a separace séra

Krev byla odebrána na odběrovém sále do odběrových zkumavek. K separaci séra od krevních buněk byla krev centrifugována při 1600 g, 10 minut a 16 °C.

4.6 LLE

Tokoferoly a retinol patří mezi nejvíce studované analyty ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky FNHK. Proto jsme se kromě tokoferolů věnovali i analýze retinolu. V laboratoři již byla vyvinuta metoda pomocí LLE, která slouží pouze pro stanovení retinolu a α -tokoferolu. Naším úkolem bylo tuto původní metodu optimalizovat i pro další tokoferoly (beta, gama, delta) a snížit objem použitých rozpouštědel i séra a především také docílit rychlejší analýzy, což umožní zpracování více vzorků v jedné sérii. Při vývoji a testování jednotlivých podmínek extrakce jsme vždy pracovali se směsí standardů a biologickým materiálem bez přídavku standardů (blank) a s přídavkem standardů (spik).

4.6.1 Klasická LLE

Optimalizovali jsme již vyvinutou metodu z roku 2006. Původní metoda vypadala takto:

1. K 500 μ L séra přidat 500 μ L denaturovaného ledového ethanolu a poté 5 minut třepat.
2. Přidat 2500 μ L hexanu a poté 5 minut třepat.
3. Centrifugace 1600 g při 0 °C 10 minut.
4. Odebrat 2000 μ L supernatantu, který se odpaří pod dusíkem (60 °C).
5. Odparek rozpustit v 400 μ L methanolu [62].

Tato metoda se provádí ve skleněných zkumavkách a třepání probíhá na velké třepačce. Používá větší objemy rozpouštědel, což je zbytečně neekonomické. Časy třepání i centrifugace jsou příliš dlouhé, což prodlužuje celkový čas analýzy. Navíc díky použitým zábrusovým zkumavkám nelze centrifugovat větší množství vzorků najednou.

Metoda byla původně vyvinuta jen pro stanovení α -tokoferolu a retinolu, zjistili jsme ale, že tuto metodu lze využít pro extrakci i ostatních forem tokoferolů.

Proto jsme se rozhodli základní parametry této původní metody využít a dále ji miniaturizovat tím, že jsme snížili použité objemy rozpouštědel.

4.6.2 Miniaturizace LLE

Klasickou LLE jsme zminiaturizovali snížením objemů rozpouštědel a séra, které nám umožnilo použít jednorázové eppendorff zkumavky místo klasických skleněných. Tím došlo i k odstranění následného komplikovaného mytí skleněných zkumavek po extrakci. Čistšího extraktu jsme docílili především zvýšením centrifugační síly a změnou poměru rozpouštědel. Také jsme přidali krok zakoncentrování pro zvýšení citlivosti pro jednotlivé tokoferoly, které se v séru vyskytují v nízkých koncentracích..

Postup je následující:

1. K 400 μ L séra přidat 400 μ L ledového ethanolu a 5 minut třepat.
2. Přidat 1200 μ L hexanu a znovu 5 minut třepat.
3. Centrifugace 13 000 g při 4 °C 10 minut.
4. Odebrat 1200 μ L supernatantu a odpařit při 45 °C.
5. Odparek rozpustit v 200 μ L methanolu.

Tuto zminiaturizovanou metodu jsme dále optimalizovali úpravou parametrů v jednotlivých krocích postupu.

4.6.3 Optimalizace Mini LLE

Při optimalizaci jsme si dali za cíl: zmenšit objemy vzorku i rozpouštědel, zrychlit stávající metodiku a umožnit extrakci většího množství vzorků. Soustředili jsme se na úpravu několika kroků, kterými byly odpařování, třepání a centrifugace. Kromě toho jsme využili vnitřní standard, který je velice důležitý pro práci s biologickým materiálem. Nejlepší podmínky jsme vybírali podle výsledných chromatogramů.

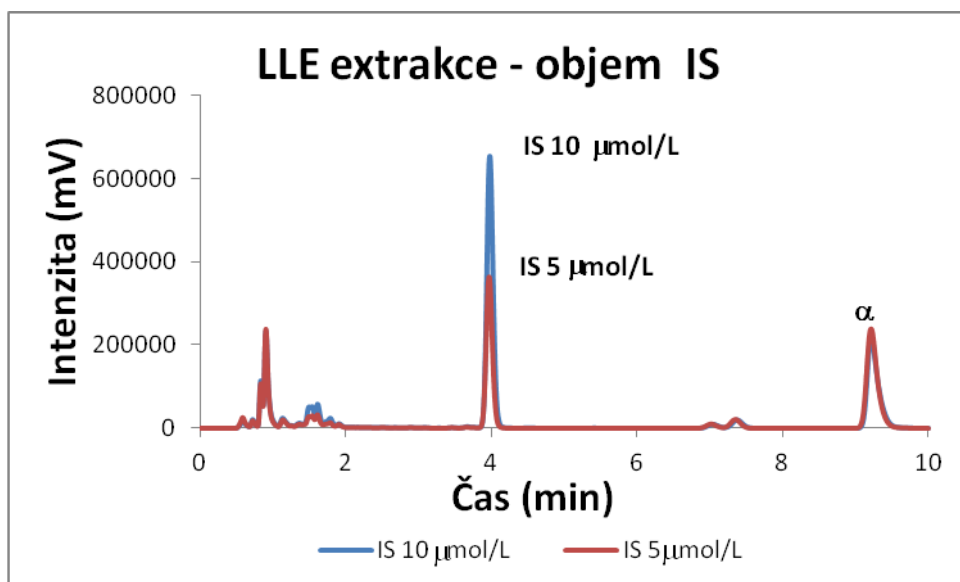
4.6.3.1 Vnitřní standard (IS)

V původní metodě nebyl vnitřní standard zahrnut, proto jsme se rozhodli ho do nové metody přidat. Jako IS se pro stanovení tokoferolů používá nejčastěji tokol. Přídavek IS jsme testovali následujícím postupem: do eppendorff zkumavek jsme napipetovali malé množství IS (objem byl optimalizován) a nechali odpařit přibližně 3 minuty. Při větší sérii vzorků je dostačující čas k odpaření pouze napipetování IS do všech eppendorff zkumavek. Proto lze ihned pokračovat v práci a není nutno čas analýzy zbytečně prodlužovat. Zkoušené objemy:

Do první série eppendorff zkumavek jsme zkoušeli pipetovat **4 μL IS 500 $\mu\text{mol/L}$** tokolu a nechali odpařit a následně přidali 400 μL séra. Výsledná koncentrace IS v séru byla 5 $\mu\text{mol/L}$.

Do druhé série eppendorff zkumavek jsme pipetovali **8 μL IS 500 $\mu\text{mol/L}$** tokolu a nechali odpařit. Přidali jsme 400 μL séra. Výsledná koncentrace IS v séru byla 10 $\mu\text{mol/L}$.

Výsledek: Při použití 8 μL standardu byl pík IS nepřiměřeně vysoký k hodnotám tokoferolů. Proto ve výsledné extrakci pipetujeme do eppendorff zkumavek **4 μL IS o výsledné koncentraci 5 $\mu\text{mol/L}$ ve 400 μL séru.**



Chromatogram 1. Optimalizace použitého objemu IS při extrakci LLE

(Při optimalizaci koncentrace IS byly použity jiné chromatografické podmínky, než byly nakonec vybrány, proto je analýza delší.)

Dále jsme se věnovali postupu krok za krokem a postupně upravovali tyto podmínky:

4.6.3.2 Třepání

Třepání séra na vortexu s ledovým ethanolem (deproteinace) v původní metodě bylo **5 minut**. Čas byl zkrácen pouze na **1 minutu**.

Výsledek: Kratší doba třepání než **5 minut** se nám neosvědčila, protože deproteinace nebyla úplná a v extraktu zůstávala spousta balastních látek.

Třepání směsi séra s ethanolem převrstvené hexanem bylo původně **5 minut**. Čas potřebný na přestup analytů do organické vrstvy jsme se pokusili zkrátit na **3 minuty**.

Výsledek: Kratší doba třepání se neosvědčila ani v druhém případě třepání. Analyty do organické vrstvy nepřešly v dostatečné koncentraci a výtěžnost by byla příliš nízká, proto výsledné třepání je **5 minut**.

4.6.3.3 Centrifugace

Dále jsme testovali podmínky centrifugace extraktu. Původní přetížení bylo 13 000 g po dobu 10 minut. Pro dosažení cílů optimalizace jsme zvýšili přetížení a zkrátili čas točení. Vyzkoušeli jsme tyto možnosti:

Centrifugace při **21 000 g, 10 min, 4 °C**

Centrifugace při **21 000g, 5 min, 4 °C**

Pulzní centrifugace na maximum (**21 380 g**) a nechat centrifugu zabrzdit. Celkově tento krok trvá asi **90 vteřin**. Taktéž při 4 °C.

Výsledek: Jako nejlepší se jeví pulzní centrifugace při **21 380 g** s celkovým časem **90 sekund**. Tento čas je nejkratší a přesto plně dostačující na oddělení vodné a organické vrstvy.

4.6.3.4 Odpařování

Odpaření organické vrstvy v koncentrátoru probíhá při **45 °C**. Pokusili jsme se odpaření urychlit zvýšením teploty na **60 °C**.

Výsledek: Ve výsledné extrakci jsme využili teplotu **45 °C**, při které odpaření trvá **15 minut**. Při 60 °C se čas odpařování příliš nezkrátil a navíc docházelo k mírné degradaci analytů.

4.6.3.5 Rozpouštění

K rozpouštění odparku v methanolu jsme si zvolili čas **2 minuty** na třepačce. Tento čas je optimální, protože je dostatečný k tomu, aby se odparek rozpustil.

4.6.3.6 Závěrečná filtrace

Před nástřikem vzorku na kolonu je třeba vzorek zfiltrovat. Původní extrakční postup byl spojen s HPLC analýzou a extrakty nebyly filtrovány. Nová metoda pro tokoferoly byla vyvinuta na UHPLC systému, proto bylo nutné filtrační krok do postupu zařadit. Zjistili jsme, že při použití manifoldu pro mikrotitrační destičky v průběhu filtrace často docházelo k odpařování methanolu i přes veškerá opatření (jako rychlost filtrace, zakrývání jamek apod.) a tím k nechtěnému zakoncentrování vzorku. Proto jsme zvolili jiné řešení, kterým bylo použití centrifugačních eppendorff zkumavek s filtrem.

Zvolili jsme tento postup:

Rozpuštěný odparek v methanolu byl přepipetován do centrifugačních eppendorff zkumavek s filtrem a centrifugován za následujících testovaných podmínek:

Centrifugace při 14 000 g, **7 min**, 4 °C

Centrifugace při 14 000 g, **10 min**, 4 °C

Výsledek: V tomto bodě jsme nuceni vybrat jako vhodnou dobu centrifugace **10 min**, protože při kratší době se nepřefiltrovala všechna tekutina, ale zůstávala v eppendorff zkumavce nad filtrem. Urychlit tento krok zvýšením přetížení již není možné, protože **14 000 g** je maximální dovolené přetížení výrobcem eppendorff zkumavek s filtrem.

4.7 SLE

Během vývoje extrakční metody stanovení tokoferolů metodou LLE se na trhu objevily nové SLE kolonky, které by mohly být vhodné pro extrakci analytů našeho zájmu. Proto jsme se kromě metody LLE rozhodli vyzkoušet i metodu SLE.

Protože jsme s metodou SLE neměli žádné zkušenosti, pracovali jsme podle přiloženého návodu, který byl velmi obecný. Obecný postup zahrnuje kroky:

1. Úprava vzorku
2. Dávkování vzorku na SLE kolonku
3. Eluce

Nejdůležitějšími kroky bylo rozhodnutí, zda je nutné upravovat biologický materiál a jaké bude zvoleno eluční činidlo.

Úprava biologického materiálu zahrnovala dle návodu dvě možnosti:

- Precipitace proteinů
- Ředění biologického materiálu

Jako kandidáty na vhodné eluční činidlo jsme zvolili ethylacetát, hexan a methanol.

Jako základní postup jsme zvolili modifikaci vyvinuté LLE extrakce:

1. Do eppendorf zkumavky napipetovat 4 μL IS (tokol) a nechat odpařit asi 3 minuty.
2. Napipetovat sérum a denaturovaný líh a 5 minut třepat.
3. Centrifugovat na max. otáčky (21 380 g) 90 vteřin při 4 °C.
4. Supernatant nanést na SLE kolonku s použitím SPE vany a 5 minut čekat až vzorek nasákne kolonkou.
5. Na SLE kolonku nanést eluční rozpouštědlo.
6. Odpařit eluát v koncentrátoru při 45 °C.
7. Rozpustit odparek v 200 μL methanolu.
8. Přefiltrovat přes centrifugační eppendorf zkumavky.

4.7.1 Optimalizace SLE

Podle výsledných chromatografických záznamů jsme vybrali nejlepší podmínky pro extrakci pomocí SLE.

4.7.1.1 Precipitace proteinů

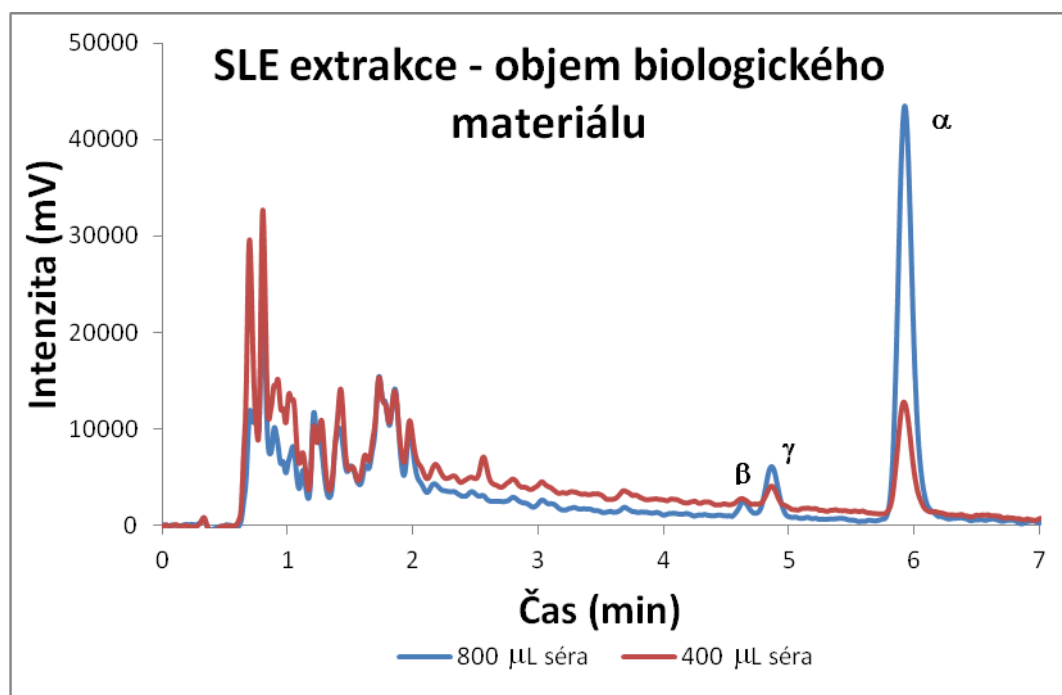
Při prvním pokusu jsme prováděli precipitaci v poměru **1:1** (sérum: denaturovaný líh) tedy 400 μL séra a 400 μL denaturovaného lihu. Jako druhý pokus jsme zvolili variantu **bez precipitace**.

Výsledek: Chromatografické záznamy vzorku, ve kterém jsme vynechali krok precipitace, dosahuje lepších hodnot, proto **precipitační krok není** v extrakci potřeba.

4.7.1.2 Ředění a objem biologického materiálu

V prvních pokusech jsme vzorek **neředili** vůbec. V dalších jsme zvolili ředění **1:1** (sérum: voda). Pracovali jsme s objemy **400 μL** nebo **800 μL** séra.

Výsledek: Záznam s neředěným sérem dává 3x větší odezvu než 400 μL séra ředěných 400 μL vody. Proto jsme zvolili vzorek **neředit**.



Chromatogram 2. Zobrazení rozdílu extrakce SLE při použití 800 μL a 400 μL neředěného séra

4.7.1.3 Dávkování na SLE kolonku

Při optimalizaci objemu supernatantu, který se nanáší na SLE kolonku, jsme testovali objem **400 µL** nebo **800 µL**. Vždy bylo nutné 5 minut čekat, než se kolonka nasákne.

Výsledek: Množství sorbentu bylo pro 400 µL supernatantu příliš velké, nedocházelo k jeho úplnému nasáknutí, proto jsme zvolili ve výsledné extrakci **800 µL** supernatantu.

4.7.1.4 Eluce

Eluci jsme prováděli různými rozpouštědly o objemu 1800 µL. Testovali jsme **ethylacetát, hexan a methanol**.

Výsledek: Nejlepší eluci analytů ze SLE kolonky vykazuje rozpouštědlo **ethylacetát**. Methanol a hexan se jako dobrá eluční činidla neosvědčila.

4.7.1.5 Odpaření

Optimalizovali jsme také podmínky potřebné k odpaření eluátu.

Výsledek: Je nutné k odpaření použít pouze organickou vrstvu, protože i nepatrná příměs vodné fáze dobu odpařování zbytečně prodlužujeme nebo k odpaření nedojde vůbec. Výsledné odpaření probíhá při **45 °C**.

Vybrali jsme nejvhodnější podmínky v jednotlivých krocích a tím jsme vytvořili postup pro extrakci tokoferolů pomocí SLE (finální podmínky jsou shrnuty v kapitole Výsledky a diskuze). Tento postup je pouze prvním pokusem a rozhodně není dokonalý. Je nutná jeho další optimalizace, ale provedli jsme první pokus o využití techniky SLE pro extrakci tokoferolů z lidského séra.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledná LLE extrakce

Původní LLE extrakci jsme nejdříve zminiaturizovali použitím eppendorff zkumavek, což vedlo ke snížení objemů rozpouštědel. Přidali jsme vnitřní standard a tuto miniaturizovanou LLE extrakci jsme krok za krokem optimalizovali. Hledali jsme vhodné podmínky jako čas, objemy vzorku i rozpouštědel, teplotu, čas i sílu centrifugace. Optimalizace probíhala ve všech krocích extrakčního procesu. Do extrakčního procesu byl také zahrnut krok filtrace.

5.1.1 Postup LLE extrakce

1. 4 μL IS (tokol) napipetovat do 2 mL eppendorff zkumavky a nechat odpařit.
2. Přidat 400 μL séra a 400 μL denaturovaného ledového ethanolu a 5 minut třepat.
3. Přidat 1200 μL hexanu a znovu 5 minut třepat.
4. Stočit pulzní centrifugací na maximální otáčky (21 380 g) při teplotě 4 °C (celkový čas je 90 sekund včetně brzdění centrifugy).
5. Odebrat 1200 μL supernatantu do nových 1,5 mL eppendorff zkumavek.
6. Odpařit 15 minut při 45 °C.
7. Rozpustit v 200 μL methanolu a třepat 2 minuty.
8. Přepipetovat do centrifugačních eppendorff zkumavek s filtrem a centrifugovat 10 minut při 14 000 g a 4°C.
9. Nastříknout vzorek do systému.

5.1.2 Opakovatelnost extrakce

Po stanovení optimálních podmínek pro extrakci jsme testovali opakovatelnost nově vyvinutého postupu.

Opakovatelnost extrakce se podle FDA definuje jako analýza vzorků za stejných provozních podmínek (stejně materiály, činidla i pracovník) během krátkého časového intervalu. Pro výpočet opakovatelnosti extrakce je nutné změřit nejméně pět vzorků na třech koncentračních hladinách. Vyjadřuje se výpočtem relativní směrodatné odchylky plochy pro jednotlivé analyty:

$$RSD (\%) = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Opakovatelnost jsme stanovovali v blankovém séru a séru spikovaném (2 koncentrace – spik 1 a spik 2) vždy po 6 vzorcích, které byly jednotlivě zpracovány. V biologickém materiálu se pro splnění požadavků hodnota relativní směrodatné odchylky plochy musí pohybovat do 15 % [63].

	c (μmol/L)	
	spik 1	spik 2
α-tokoferol	5,64	11,28
β-tokoferol	1,19	5,33
γ-tokoferol	0,69	5,54
δ-tokoferol	0,36	7,11
Retinol	1,52	3,04

Tab. 3. Koncentrace analytů ve spikovaném séru

stanovované analyty	area RSD %		
	počet vzorků = 6		
	blank	spik 1	spik 2
α-tokoferol	5,35	7,65	2,87
β-tokoferol	4,79	9,67	5,70
γ-tokoferol	5,24	8,15	3,36
δ-tokoferol	8,43	2,83	1,41
retinol	5,17	7,97	3,91

Tab. 4. Výsledné hodnoty relativní směrodatné odchylky v blankovém a spikovaných sérech

Z tabulky 4 vyplývá, že byl splněn požadavek RSD < 15%.

5.1.3 Výtěžnost extrakce (recovery)

Výtěžnost extrakce udává poměr množství analytu, kterou jsme danou metodou získali (naměřená hodnota) a správnou referenční hodnotou (spočítaná), která udává 100% výtěžnost [63].

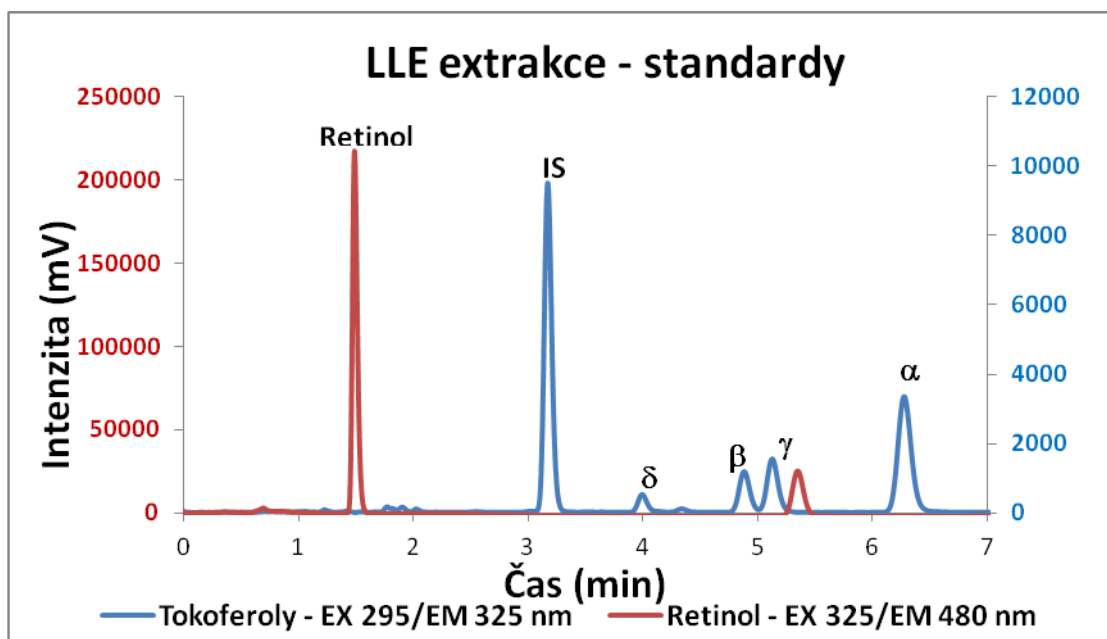
$$R (\%) = 100 \times \frac{\text{naměřená hodnota}}{\text{spočítaná hodnota}}$$

Analyt	Spik 1			Spik 2		
	C1 (μmol/L)	C2 (μmol/L)	R (%)	C1(μmol/L)	C2 (μmol/L)	R (%)
α-tokoferol	5,64	5,25	93,09	30,00	33,03	110,10
β-tokoferol	1,19	1,07	89,59	5,55	5,45	98,20
γ-tokoferol	0,69	0,65	94,25	3,00	2,84	94,67
δ-tokoferol	0,36	0,31	87,00	3,04	3,17	104,27
Retinol	1,52	1,59	104,48	11,28	10,87	96,37

C1- spočítaná koncentrace, C2- změřená koncentrace, R- výtěžnost

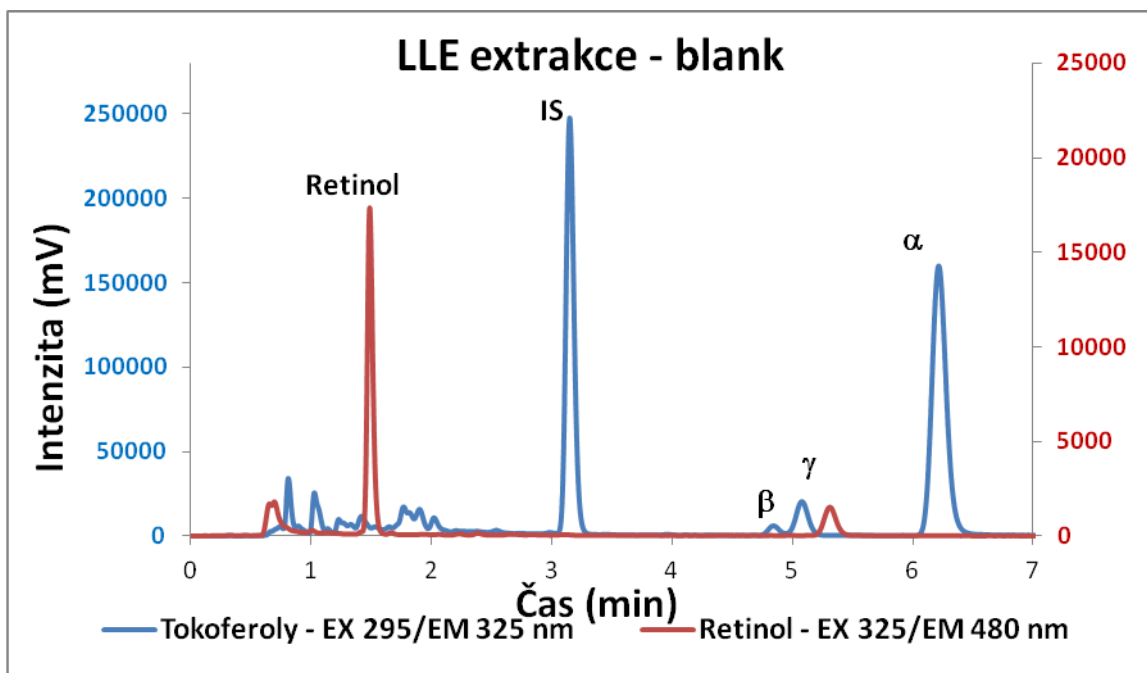
Tab. 5 Výtěžnost LLE extrakce na dvou koncentračních úrovních

Na zobrazeném chromatogramu 3 je výsledná analýza standardů retinolu a tokoferolů rozpuštěných v methanolu po extrakci novou LLE.



Chromatogram 3. Extrakce standardů metodu LLE podle výsledného postupu

Zobrazení chromatogramu analýzy séra metodu LLE. Přítomny jsou píky všech tokoferolů kromě δ -tokoferolu, který je v séru v nízkých koncentracích.



Chromatogram 4. Extrakce blankového séra metodu LLE podle výsledného postupu

5.2 SLE extrakce

Metodu SLE jsme na našem pracovišti zkoušeli poprvé. Nejdříve bylo nutné vybrat podmínky pro základní kroky extrakce. Jedná se především o úpravu biologického vzorku a výběr elučního činidla.

Jako úpravu biologického materiálu jsme zkoušeli jeho ředění vodou v různých poměrech a dále precipitaci ledovým denaturovaným ethanolem. Zjistili jsme, že bez jakékoliv úpravy vzorku dostáváme nejlepší výsledky.

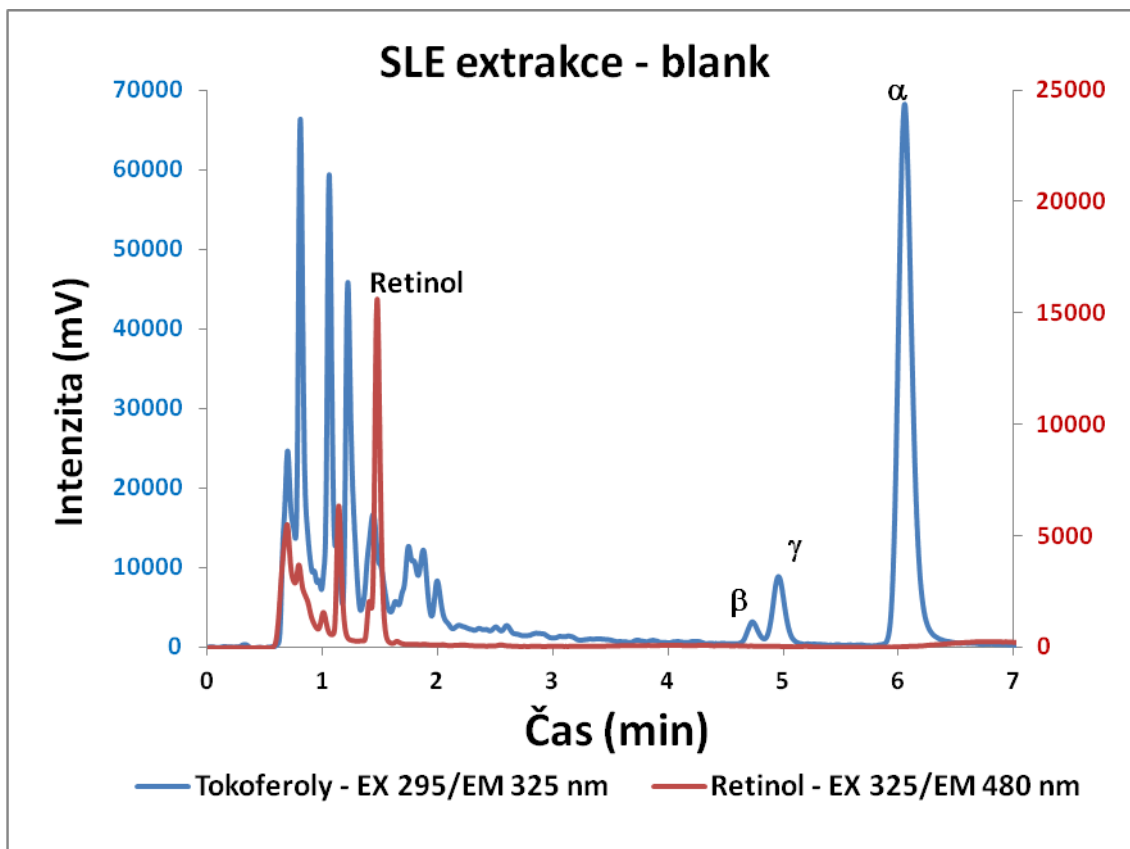
Jako eluční činidlo jsme zkoušeli ethylacetát, hexan a methanol. Jako nejlepší eluční činidlo byl vybrán ethylacetát, protože ostatní dvě rozpouštědla neeluovala analyty z SLE kolonky v dostatečných koncentracích.

Závěrečná filtrace probíhá jako při miniaturizované LLE pomocí centrifugačních eppendorf zkumavek s filtrem.

5.2.1 Výsledný postup SLE

1. Na SLE kolonku nanést 800 μL séra.
2. Eluovat 1800 μL ethylacetátu.
3. K odpaření použít pouze horní organickou vrstvu. Odpařit při 45 °C v koncentrátoru.
4. Rozpustit odparek v 200 μL methanolu.
5. Přefiltrovat pomocí centrifugační eppendorf zkumavky 10 minut, 14 000 g a 4 °C.

Chromatogram 5 ukazuje separaci cílových analytů (retinol a tokoferoly) metodou SLE. Tuto metodu bude třeba dále optimalizovat, ale je jasné, že má dobré vyhlídky pro budoucí použití.



Chromatogram 5. Extrakce blankového séra metodou SLE podle výsledného postupu

6 ZÁVĚR

V diplomové práci byla optimalizována nová extrakce z kapaliny do kapaliny pro stanovení jednotlivých forem tokoferolů (α -, β -, γ - a δ -) a retinolu z lidského séra. Metoda vychází z extrakce do kapaliny pro stanovení retinolu a alfa tokoferolu z roku 2006, která je ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové často využívána pro řadu klinických studií. Do extrakční metody byl zahrnut vnitřní standard, došlo k miniaturizaci a nový postup se ukázal jako vhodný pro všechny cílové formy tokoferolu. Díky miniaturizaci se v budoucnu umožní stanovení velkých sérií vzorků. Byla provedena také částečná validace. Nový extrakční postup je součástí UHPLC metody pro stanovení jednotlivých tokoferolů a retinolu, která bude v budoucnu publikována a zařazena do spektra vyšetření Výzkumné laboratoře. V průběhu vývoje byla také testována technika extrakce do kapaliny podpořená tuhou fází, která se osvědčila, jako jedna z možností dalšího využití pro potřeby Výzkumné laboratoře.

7 SEZNAM ZKRATEK

AMAC	A mmonium a cetate, octan amonný
α-TTP	α-t ocopherol transfer p rotein
QuEChERS	Q uick, E asy, C heap, E ffective, R ugged and S afe
DDME	D rop to d rop m icroextraction, mikroextrakce z kapky do kapky
DI-SDME	D irect i mmersion S DME, přímá SDME
DI- SPME	D irect i mmersing S PME, přímá SPME
DLLME	D ispersive liquid-liquid m icroextraction, disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
DSDME	D irectly suspended d roplet m icroextraction, mikroextrakce na přímo suspendované kapce
dSPE	D ispersive S PE, disperzní SPE
FNHK	F akultní n emocnice H radec K rálové
GC	G as c hromatography, plynová chromatografie
GMK FN HK	G erontologická a m etabolická k linika F akultní n emocnice H radec K rálové
HDL	H igh d ensity lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
HF-LLLME	H ollow f iber liquid-liquid-liquid m icro-extraction, vícenásobná extrakce z kapaliny do kapaliny pomocí dutého vlákna
HF-LPME	H ollow f ibre L PME, extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna
HPLC	H igh p erformance liquid c hromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS-SDME	H eadspace S DME
HS-SPME	H eadspace S PME
IA-SPE	I mmunoaffinity S PE, imunoafinitní SPE
IS	I nternal standard, vnitřní standard
LC	L iquid c hromatography, kapalinová chromatografie
LDL	L ow d ensity lipoprotein, lipoprotein o nízké hustotě
LLE	L iquid-liquid extraction, extrakce z kapaliny do kapaliny
LLLME	L iquid-liquid-liquid m icroextraction, mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět

LPME	Liquid phase microextraction , mikroextrakce kapalnou fází
MeOH	methanol
MEPS	Microextraction by packed sorbent , mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu
MIPs	Molecularly imprinted polymers , molekulárně vtištěné polymery
MS	Mass spectrometry , hmotnostní spektrometrie
PDA	Photodiode array , detektor diodového pole
sdPDMS	Polydimethylsiloxane , polydimethylsiloxan
pH	potential of Hydrogen , potenciál vodíku, vodíkový exponent
PP	Protein precipitation precipitace proteinů
PUFA	Polyunsaturated fatty acids , polynenasycené mastné kyseliny
rpm	Revolutions per minute , otáčky za minutu
RSD	Relative standard deviation , relativní směrodatná odchylka
RAM	Restricted access materials , materiál s omezeným přístupem
SD	Standard deviation , směrodatná odchylka
SDME	Single drop microextraction , extrakce do jedné kapky rozpouštědla
SF	stacionární fáze
SLE	Simplified liquid extraction , extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází
SLM	Supported liquid membrane , zakotvená kapalinová membrána
SPE	Solid phase extraction , extrakce na pevnou fází
SPME	Solid phase microextraction , mikroextrakce na tuhé fází
tr	Retention time , retenční čas
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography , ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultraviolet, ultrafialové záření
VLDL	Very low density lipoprotein , lipoproteiny o velmi nízké hustotě

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1. Struktura tokoferolů a tokotrienolů

Obr. 2. Antioxidační aktivita vitamínu E

Obr. 3. Struktura retinolu

Obr. 4. Princip SPE

Obr. 5. Příprava MIPs

Obr. 6. Struktura RAM

Obr. 7. Rozdíl techniky DI-SPME a HS-SPME

Obr. 8. Princip dSPE

Obr. 9. Extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna (HF-LPME)

Obr. 10. Metoda mikroextrakce do jedné kapky

Obr. 11. Princip disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

Chromatogram 1. Optimalizace použitého objemu IS při extrakci LLE

Chromatogram 2. Zobrazení rozdílu extrakce SLE při použití 800 μL a 400 μL neředěného séra

Chromatogram 3. Extrakce standardů metodu LLE podle výsledného postupu

Chromatogram 4. Extrakce blankového séra metodu LLE podle výsledného postupu

Chromatogram 5. Extrakce blankového séra metodu SLE podle výsledného postupu

Tab. 1. Doporučené denní dávky α - tokoferolu

Tab. 2. Fyziologické hodnoty α -tokoferolu v séru

Tab. 3. Koncentrace analytů ve spikovaném séru

Tab. 4. Výsledné hodnoty relativní směrodatné odchylky v blankovém a spikovaných sérech

Tab. 5. Výtěžnost LLE extrakce na dvou koncentračních úrovních

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. MUSTACICH, D. J., BRUNO, R. S., TRABER, M. G.: Vitamin E. Vitam. Horm. 76, 1-21, 2007.
2. SIXTUS, H.: Speciální farmakologie. Díl VI - Hormony a vitamíny. Karolinum 2. přeprac. vyd. Praha ISBN 8024604167, 2002.
3. PREDDY V.R., WATSON R.R.: Wallingford, Oxon, UK ; Cambridge, MA: CABI xvi, 962. ISBN 9781845930752., 2007.
4. MURPHY, M. E., KEHRER, J. P.: Simultaneous measurement of tocopherols and tocopheryl quinones in tissue fractions using high-performance liquid chromatography with redox-cycling electrochemical detection. J Chromatogr. 421, 71-82, 1987.
5. BELL, E. C., JOHN, M., HUGHES, R. J., PHAM, T.: Ultra-performance liquid chromatographic determination of tocopherols and retinol in human plasma. J Chromatogr. Sci. 52, 1065-1070, 2014.
6. EVANS, H. M., BISHOP, K. S.: On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. Science 56, 650-651, 1922.
7. EMERSON, O. H., EMERSON, G. A., EVANS, H. M.: The isolation from cottonseed oil of an alcohol resembling alpha tocopherol from wheat germ oil . Science 83, 421, 1936.
8. NIKI, E., TRABER, M. G.: A history of vitamin E. Ann. Nutr. Metab 61, 207-212, 2012.
9. BELLOCK O.H.: New topics in vitamin E research. New York: Nova Science 163 p. ISBN 9781600213274, 2007.
10. RUPEREZ, F. J., MARTIN, D., HERRERA, E., BARBAS, C.: Chromatographic analysis of alpha-tocopherol and related compounds in various matrices. J. Chromatogr. A 935, 45-69, 2001.
11. AUST, O., SIES, H., STAHL, W., POLIDORI, M. C.: Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. J. Chromatogr. A 936, 83-93, 2001.
12. BENDER D.A.: Nutritional Biochemistry of the Vitamins. Cambridge University Press, New York, 2. vydání ISBN 978-0-511-06365-7, 2003.
13. Seznam Éček, (online) cit. 15.4.2016 dostupné na: <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek?query=tokoferol&column=text>.

14. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi (online) cit. 17.4.2016, dostupné na: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVASE.htm>.
15. SCHMOLZ, L., BIRNINGER, M., LORKOWSKI, S., WALLERT, M.: Complexity of vitamin E metabolism. *World J. Biol. Chem.* 7, 14-43, 2016.
16. RIGOTTI, A.: Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol. Aspects Med.* 28, 423-436, 2007.
17. TRABER, M. G.: Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 347-362, 2007.
18. HOSOMI, A., ARITA, M., SATO, Y., KIYOSE, C., UEDA, T., IGARASHI, O., ARAI, H., INOUE, K.: Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.* 409, 105-108, 1997.
19. TRABER, M. G., ATKINSON, J.: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 4-15, 2007.
20. ZIMA, T.: *Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-372-3. *vyd. Praha: Galén 2016.*
21. COLOMBO, M. L.: An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules.* 15, 2103-2113, 2010.
22. WALLERT, M., SCHMOLZ, L., GALLI, F., BIRNINGER, M., LORKOWSKI, S.: Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. *Redox. Biol.* 2, 495-503, 2014.
23. Life extension magazine (online), cit. 1.4.2016, dostupné na: http://www.lifeextension.com/magazine/2006/4/report_gamma/Page-01.
24. COONEY, R. V., FRANKE, A. A., HARWOOD, P. J., HATCH-PIGOTT, V., CUSTER, L. J., MORDAN, L. J.: Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 1771-1775, 1993.
25. SMOLAREK, A. K., SUH, N.: Chemopreventive activity of vitamin E in breast cancer: a focus on gamma- and delta-tocopherol. *Nutrients.* 3, 962-986, 2011.
26. SOMMER, A., VYAS, A. S.: A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *Am J Clin Nutr.* 2012 Nov;96(5):1204S-6S.
27. HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L.: *Vitaminy.* Praha: Grada, 2004. ISBN 9788024703732. Grada, 2004.
28. KARLÍČEK, R.: *Analytická chemie pro farmaceuty. 3. vyd.* Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1453-3

29. Cibiček, N. and Vacek, J. Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně: 1.vyd.Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, v. 159 s. ISBN 978-80-244-3951-8. 2014.
30. Odstřed'ování, (online) cit. 25.3.2016, dostupné na: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVACO.htm>.
31. Laboratorní technika, (online), 24.3.2016, dostupné na: <http://lat.zshk.cz/vyuka/filtrace.aspx>.
32. KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O.: Laboratorní techniky biochemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
33. Bílkoviny-praktika, (online), cit. 28.3.2016, dostupné na: http://che1.lf1.cuni.cz/html/Bilkoviny_praktika.pdf.
34. Příprava vzorku k analýze, (online), cit. 5.4.2016, dostupné na: <http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf>.
35. Extrakce, (online), cit. 4.4.2016, dostupné na: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>.
36. SILVESTRO, L., SAVU, S. R.: An update on solid phase-supported liquid extraction. *Bioanalysis*. 7, 2177-2186, 2015.
37. LASAKOVA, M., JANDERA, P.: Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction. *J. Sep. Sci.* 32, 799-812, 2009.
38. VASAPOLLO, G., SOLE, R. D., MERGOLA, L., LAZZOI, M. R., SCARDINO, A., SCORRANO, S., MELE, G.: Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *Int. J Mol. Sci.* 12, 5908-5945, 2011.
39. STEVENSON, D.: Immuno-affinity solid-phase extraction. *J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745, 39-48, 2000.
40. CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MORAES, M. C., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B.: Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. *Bioanalysis*. 1, 577-594, 2009.
41. SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L.: Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 801, 141-156, 2004.
42. PERRY, J. A.: The internal surface reversed phase. Concept and applications. *Journal of Liquid Chromatography* 13: 1047-1074 1991.
43. VAS, G., VEKEY, K.: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.* 39, 233-254, 2004.

44. RISTICEVIC, S., NIRI, V. H., VUCKOVIC, D., PAWLISZYN, J.: Recent developments in solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 781-795, 2009.
45. Labsphere, (online), cit.25.4.2016, dostupné na: <http://www.labsphere.biz/ctc-combipal.php>.
46. ABDEL-REHIM, M.: Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *J Chromatogr. A* 1217, 2569-2580, 2010.
47. Jos,A., Aguilar-Artega,K., Dez, C., Barrado, E., Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples. *Herbicides - Advances in Research* (online), cit. 30.4.1016, dostupné na: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-advances-in-research/recent-advances-in-the-extraction-of-triazines-from-water-samples>.
48. QuEChERS (online), cit. 30.4.2016, dostupné na: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/index.php?nav1o=1&nav2o=0&nav3o=0>.
49. PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E.: Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A* 1184, 132-142, 2008.
50. Saraji, M., Boroujeni, M.K., Analysis of narcotic drugs in biological samples using hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection (online) cit. 28.4.2016, dostupné na: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00604-011-0612-5>.
51. ZHAO, E., HAN, L., JIANG, S., WANG, Q., ZHOU, Z.: Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. *J. Chromatogr. A* 1114, 269-273, 2006.
52. PADRON, M. E., AFONSO-OLIVARES, C., SOSA-FERRERA, Z., SANTANA-RODRIGUEZ, J. J.: Microextraction techniques coupled to liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of organic micropollutants in environmental water samples. *Molecules.* 19, 10320-10349, 2014.
53. XU, L., BASHEER, C., LEE, H. K.: Chemical reactions in liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 1216, 701-707, 2009.
54. REZAEI, M., ASSADI, Y., MILANI HOSSEINI, M. R., AGHAEE, E., AHMADI, F., BERIJANI, S.: Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116, 1-9, 2006.
55. MEYER V.: *Practical high-performance liquid chromatography.* 5th ed. Chichester, U. K. : Wiley 412 p. ISBN 9780470682173, 2010.
56. ŠVEC, F.: Co dnes hybe kapalinovou chromatografií. *Chem Listy* 2009; 103: 266. 270. 2009.
57. Waters, (online), cit. 21.3.2016, dostupné na: http://www.waters.com/waters/en_CZ/ACQUITY-UPLC/nav.htm?cid=10131966&locale=en_CZ.

58. Chromservis, (online) cit. 21.3.2016. dostupné na: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc>.
59. Lékopis, (online), cit. 27.3.2016, dostupné na: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Tocoferolum_alfa.htm.
60. KAMAL-ELDI, A., GORGEN, S., PETTERSSON, J., LAMPI, A. M.: Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *J Chromatogr. A* 881, 217-227, 2000.
61. FRANKE, A. A., MORRISON, C. M., CUSTER, L. J., LI, X., LAI, J. F.: Simultaneous analysis of circulating 25-hydroxy-vitamin D3, 25-hydroxy-vitamin D2, retinol, tocopherols, carotenoids, and oxidized and reduced coenzyme Q10 by high performance liquid chromatography with photo diode-array detection using C18 and C30 columns alone or in combination. *J Chromatogr. A* 1301, 1-9, 2013.
62. URBANEK, L., KRCMOVA, L., SOLICHOVA, D., MELICHAR, B., OPLETALOVA, V., SOLICH, P.: Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects. *J Sep. Sci.* 29, 2485-2493, 2006.
63. FDA doporučení (online), cit. 30.4.2016 <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>.