

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra analytickej chémie**

**Vývoj UHPLC metódy pre separáciu ôsmich štruktúrne blízkyh  
derivátov vitamínu E**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Klára Pružinská

## **Abstrakt**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytickej chémie**

**Kandidát:** Klára Pružinská

**Školiteľka:** doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Vývoj UHPLC metódy pre separáciu ôsmych štruktúrne blízkych derivátov vitamínu E

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vyvinúť UHPLC metódu pre separáciu ôsmych derivátov vitamínu E. Patrí medzi ne skupina tokoferolov a skupina tokotrienolov. K dosiahnutiu stanoveného cieľa bola využitá ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia. V priebehu optimalizácie bol dôležitý výber stacionárnej fázy, zloženie mobilnej fázy, jej prietoková rýchlosť, teplota kolóny a čas separácie. Ako najlepšou stacionárnou fázou bola kolóna Ascentis Express F5 (100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), Sigma-Aldrich, na ktorej prebehla separácia ôsmych derivátov vrátane dvoch problematických párov:  $\beta$ -T3 s  $\gamma$ -T3 a páru  $\beta$ -T s  $\gamma$ -T. Mobilnou fázou bola zmes metanolu s acetonitrilom (1:1) a vody v pomere 75:25 s prietokom 1 ml/min, izokratickou elúciou a PDA a FLR detekciou. Pri PDA detekcii bola vlnová dĺžka merania nastavená na 290 nm. U FLR detekcie, ktorá bola citlivejšou, bolo emisná vlnová dĺžka nastavená na 325 nm a excitačná vlnová dĺžka bola nastavená na 280 nm. Čas separácie bol menej než 8 min. Súčasťou vývoja metódy bola validácia, kde bola overená správnosť a presnosť metódy pomocou merania koncentrácie a stanovenia RSD u liečiva  $\alpha$ -tokoferol v kvapkách vo výživovom doplnku.

**Kľúčové slová:** vitamín E; tokoferoly; tokotrienoly; UHPLC; vývoj metódy; separácia

## **Abstract**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of analytical chemistry**

**Candidate:** Klára Pružinská

**Supervisor:** Assoc. prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Title of the diploma thesis:** Development of UHPLC method for separation of eight structurally related derivatives of vitamin E

The aim of this diploma thesis was to develop UHPLC method for the separation of eight derivatives of vitamin E. They include a group of tocopherols and tocotrienols. To achieve the aim ultra-high performance liquid chromatography was used. In process of optimization the most important thing was the choice of stationary phase, consistence of mobile phase, flow speed, temperature of column and the time of separation. The Ascentis Express F5 Column (100 x 3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ), Sigma-Aldrich was the best stationary phase because the separation of all eight derivatives on this column including two problematic pairs:  $\beta$ -T3 with  $\gamma$ -T3 and the pair  $\beta$ -T with  $\gamma$ -T was performed. The mobile phase was a mixture of a methanol with acetonitrile (1:1) and water in the ratio 75:25 with a flow rate 1 ml/min, isocratic elution and PDA and FLR detection. In PDA detection the wavelength was set 290 nm. In more sensitive FLR detection the emission wavelength was 325 nm and the exciting wavelength of exciting was set on 280 nm. The time of separation was less than 8 minutes. The development of the method included validation, where the accuracy and precision of the method was verified by measuring the concentration and determining the RSD for the  $\alpha$ -tocopherol drug drops in the nutritional supplement.

**Key words:** vitamin E; tocopherols; tocotrienols; UHPLC; development of method; separation

## **Prehlásenie**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dňa 13.9.2018

---

Klára Pružinská

## **Podakovanie**

Podakovať sa chcem hlavne doc. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za jej cenné rady, odborné vedenie, čas, trpezlivosť a ústretovosť, ktorými mi pomáhala pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Takisto sa chcem touto cestou poďakovať aj Mgr. Kateřině Plachkej za jej čas a pomoc pri vypracovávaní.

V neposlednom rade patrí vďaka mojej rodine a snúbencovi, vďaka ktorým som mohla študovať na tejto univerzite.

## Obsah

1 Úvod .....	10
2 Cieľ práce .....	11
3 Teoretická časť .....	12
3.1 Vitamín E .....	12
3.2. Farmakologické vlastnosti vitamínu E .....	12
3.3 Fyzikálne-chemické vlastnosti vitamínu E .....	13
3.4 Publikované metódy analýz tokoferolov a tokotrienolov .....	16
3.5 Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia .....	20
3.5.1 Systém ultra-vysokoučinnnej chromatografie a jeho výhody .....	20
3.5.2 Inštrumentácia UHPLC .....	22
3.5.3 Stacionárna fáza .....	23
3.5.4 Povrchovo porézne častice .....	25
3.6 Validácia metódy .....	26
4 Experimentálna časť .....	28
4.1 Použité prístroje a chemikálie .....	28
4.1.1 Štandardné látky .....	28
4.1.2 Pomôcky a prístrojové vybavenie .....	28
4.1.3 Chemikálie .....	28
4.1.4 Výživový doplnok .....	29
4.2 Príprava roztokov .....	29
4.2.1 Príprava zásobných roztokov štandardných látok .....	29
4.2.2 Príprava pracovných roztokov štandardných látok .....	29
4.2.3 Príprava roztokov pre UHPLC analýzu .....	30
4.3 Podmienky UHPLC metódy .....	30
4.4 Validácia metódy .....	30

4.4.1 Kalibračná závislosť.....	30
4.4.2 Stanovenie presnosti a správnosti.....	31
5 Výsledky a diskusia.....	33
5.1 Výsledky získané na kolóne CSH PFP .....	33
5.2 Výsledky získané na kolóne CSH Phenyl-Hexyl .....	38
5.3 Výsledky získané na kolóne CSH C18 .....	39
5.4 Výsledky získané na kolóne Kinetex PFP.....	40
5.5 Výsledky získané na kolóne Ascentis Express Cyano .....	40
5.6 Výsledky získané na kolóne Ascentis Express F5 .....	41
5.7 Validácia metódy .....	44
5.7.1 Kalibračná závislosť.....	44
5.7.2 Presnosť a správnosť metódy .....	48
6 Záver.....	50
Bibliografia .....	51

## **Zoznam použitých skratiek:**

**ACN** – acetonitril

**BEH** – hybridný sorbent (bridged ethylsiloxane–silica hybrid)

**CSH** – hybridná stacionárna fáza s nabitým povrchom (charged surface hybrid)

**DDD** – denná doporučená dávka

**FLR** – fluorescenčný

**H, HETP** - Výškový ekvivalent teoretickej priehradky (veličina)

**HIC** – hydrofóbná interakčná chromatografia (Hydrophobic interaction chromatography)

**HILIC** - hydrofilná interakčná chromatografia (Hydrophilic interaction chromatography)

**HPLC** – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high performance liquid chromatography)

**HRMS** – hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (high resolution mass spectrometry)

**HSS** – vysoko odolný silikagél (high strength silica)

**ICH** – Medzinárodná konferencia pre harmonizáciu (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use)

**IPA** - isopropylalkohol

**IU** – medzinárodná jednotka

**LLE** – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny

**LLM** - mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny

**LOD** - limit detekcie

**MeOH** - metanol

**MSPD** – disperzia matrice na tuhej fáze (matrix solid phase dispersion)

**NP** – normálne fázy

**PDA** – detektor s diódovým poľom (photo diode array)

**PFP** - pentafluorofenyl

**RP** - reverzné fázy

**SEC** – molekulová vylučovacia chromatografia (size-exclusion chromatography)

**STD** – štandardný roztok/štandardná látka

**T** - tokoferol



**T3** - tokotrienol

**UHPLC** – ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia (ultra-high performance liquid chromatography)

**UV** – ultrafialový (detektor), (ultraviolet)

**VIS** – viditeľné svetlo (visible)

**$\alpha$ -TTP** -  $\alpha$ -tokoferol transferový proteín ( $\alpha$ -tocopherol transfer protein)

**$\beta$ -CD** -  $\beta$ -cyklodextrin

**2-HP- $\beta$ -CD** - 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin

## 1 Úvod

Vitamín E patrí medzi lipofilné vitamíny. Táto látka dôležitá pre život je tvorená hlavne dvoma skupinami a to skupinou tokoferolov a tokotrienolov. Každá z nich je ďalej tvorená derivátmi, konkrétne:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tokoferol a rovnako z rady tokotrienolov:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tokotrienol.

V tejto diplomovej práci bola hľadaná optimálna metóda na separáciu uvedených derivátov vitamínu E. Na splnenie tejto úlohy bola použitá metóda ultra-vysokúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC). Doposiaľ vyvinuté metódy boli hlavne praktizované na reverzných fázach HPLC. Zväčša boli zamerané na separáciu len istých derivátov vitamínu E, jeho metabolitov, alebo na separáciu viacerých lipofilných zložiek v rôznych biologických vzorkách, napr.: sérum, plazma, vybrané vnútorné orgány. Okrem biologických vzoriek bola využívaná HPLC alebo UHPLC metóda aj v prípade liečivých prípravkov alebo výživových doplnkov, výťažkov z rastlín a potravín.

Vitamín E je jedna z mnohých pre život dôležitých látok, ktorej sa Katedra analytickej chémie v Hradci Králové venuje aj práve pre jeho významné účinky na ľudský organizmus, ktoré boli objavené približne pred 100 rokmi. Medzi najdôležitejšie a zároveň najznámejšie vlastnosti patrí antioxidantný a antiabortívny účinok.

## 2 Cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť optimálnu metódu pre separáciu zadaných ôsmich derivátov vitamínu E z rady skupiny tokoferolov (T) a tokotrienolov (T3). Jedná sa o:  $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T a  $\alpha$ -T3,  $\beta$ -T3,  $\gamma$ -T3,  $\delta$ -T3. Tento cieľ bol realizovaný pomocou separačnej metódy UHPLC. Boli hľadané podmienky, ktoré by zaručovali dostatočnú selektivitu a najmä rozlíšenie pri separácii všetkých derivátov vitamínu E pri čo najnižšom čase.

Pri výbere vhodnej stacionárnej fázy boli testované kolóny Acquity UPLC CSH, kolóny Ascentis Express a Kinetex (bližšie parametre vid' kap. 4.1.2). V prípade mobilnej fázy, boli skúšané rôzne pomery organickej (methanol, acetonitril) a vodnej zložky, ku ktorej v niektorých meraniach bol pridaný isopropanol. Pri výbere optimálnej detekcie bola porovnaná citlivosť PDA a FLR detekcie. Vhodné spojenie týchto parametrov tak malo viesť k dosiahnutiu toho cieľa.

Pri vývoji metódy ako vhodnej na daný účel bolo dôležité jej overenie pomocou validačných parametrov ako je správnosť, presnosť, citlivosť a linearita prostredníctvom zostrojenia kalibračnej krivky a merania koncentrácie liečiva vo výživovom doplnku.

## **3 Teoretická časť**

### **3.1 Vitamín E**

Vitamíny sú esenciálne látky dôležité pre správne fungovanie organizmu, ale nie sú zdrojmi energie. V organizme môžu vystupovať ako ko-faktory, ko-enzýmy, príp. vplývajú na génovú transkripciu. Vitamín E spolu s vitamínmi A, D a K patrí medzi lipofilné vitamíny, t.j. vitamíny rozpustné v tukoch. Vo všeobecnosti má vitamín E dôležité pozitívne účinky na ľudský organizmus. Jedna z najdôležitejších vlastností je tzv. antisterilita. Znamená to, že má antiabortívne čiže protipotratové účinky a zabraňuje strate spermatogenézy u mužov. O nič menej dôležitý je aj antioxidantný účinok. Je to schopnosť látok vychytávať voľné radikály a tak degradovať pre telo významné zložky, napr.: hormóny, enzýmy, tuky, lipoproteíny, fosfolipidy biomembrán a iné. Táto vlastnosť sa tiež označuje ako cytoprotektívna vlastnosť. Zároveň môže spomaliť rýchlosť starnutia [1, 2, 3, 4].

Nedostatok tohto vitamínu spôsobuje vážne negatívne prejavy ako anémia, hemolýza, poškodenie sietnice, poruchy trávenia, neplodnosť, alergie. Postupne ubúda svalová hmota a nervové tkanivo. Nedostatok vitamínu sa prejavuje hlavne u porúch príjmu a absorpcie potravy (tukov), u intravenózneho výživy a u novorodencov [2, 5].

Podľa štúdií vitamín E môžeme nájsť najčastejšie a v najväčšej miere práve v rastlinných olejoch, orechoch, ovsených vločkách a v ľudskom mlieku [2, 5, 6].

### **3.2. Farmakologické vlastnosti vitamínu E**

Pre svoje pozitívne účinky pri plodnosti sa odporúča aj v indikáciách spojených s počatím a tehotenstvom. O farmakoterapii a dávkovaní v tehotenstve, období laktácie a pri zníženej plodnosti rozhoduje lekár. Rovnako sa odporúča u žien pri problémoch a ťažkostiach s menštruáciou, napr. ako je zvýšené krvácanie a bolesť.

Denná doporučená dávka (DDD) u žien predstavuje 12 mg a u mužov 15 mg. U kojacich žien je DDD až 19 mg. Hodnoty obsahu vitamínu E sa u liečivých prípravkov zvyknú uvádzať v IU, pričom 1 IU = 1 mg D/L- $\alpha$ -tokoferolu = 0,67 mg D- $\alpha$ -tokoferolu. Platí, že u lipofilných vitamínov môže byť nadmerný príjem toxický pre organizmus z dôvodu akumulácie a následne zvýšenej hladiny - hypervitaminózy [2, 5, 7].

Z pohľadu farmakokinetiky je vstrebávanie  $\alpha$ -tokoferolu na úrovni 20 – 80% a je závislé na prítomnosti žlče a správnej funkcii pankreasu. Pri podaní vyšších dávok je vstrebávanie nižšie. Vitamín E je absorbovaný do lymfatického systému a vychytávaný pečeňou. Do krvi a iných tkanív okrem pečene sa dostáva najmä  $\alpha$ -tokoferol vďaka  $\alpha$ -tokoferol transferovému proteínu ( $\alpha$ -TTP). Ostatné izoméry tokoferolu majú veľmi nízku afinitu k  $\alpha$ -TTP, a preto sa nedostávajú do krvi v toľkej miere. Časť je metabolizovaná pomocou pečene enzýmom glukuronidázou na glukuronidy kyseliny tokoferonovej a jej  $\gamma$ -laktóny. Podobne ako u  $\beta, \gamma, \delta$ -tokoferolov, tak aj v druhej podskupine vitamínu E, tokotrienolov, neprestupujú tieto izoméry v dostatočnej miere z pečene do krvi. V tomto prípade sa jedná hlavne o  $\gamma$ -tokotrienol a  $\delta$ -tokotrienol. Väčšina izomérov ( $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T a  $\gamma$ -T3 s  $\delta$ -T3) spolu s istým podielom  $\alpha$ -T majú inú metabolizačnú dráhu. Druhý spôsob metabolizmu vedie cez degradáciu postranného reťazca, ktorá je zahájená  $\omega$ -oxidáciou a pokračuje  $\beta$ -oxidáciou postranných reťazcov. Terminálnymi metabolitmi druhej metabolickej dráhy sú napr.: karboxyetylhydroxychromony a ich prekurzory karboxymetylbutylhydroxychromony [8].

Z metabolitov ďalej vznikajú glukuronidy a sulfáty. V tkanivách a telových tekutinách sa nachádzajú ako konjugované formy, tak aj voľné formy [8].

Časť sa vylučuje močom, ale väčšina sa postupne vylučuje žľočou.  $\alpha$ -tokoferol má schopnosť prechádzať do materského mlieka, ale placentou prestupuje veľmi obmedzene [1].

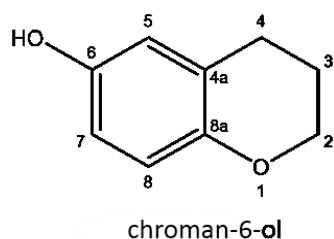
### 3.3 Fyzikálne-chemické vlastnosti vitamínu E

Ako už bolo spomenuté, vitamín E patrí medzi vitamíny rozpustné v tukoch. Túto vlastnosť vyjadruje rozdeľovací koeficient P, ktorý určuje pomer celkovej koncentrácie látky rozpustenej v lipidovej fáze ( $c_L$ ) k celkovej koncentrácii liečiva rozpusteného vo vodnej fáze ( $c_V$ ) (viď Rovnica 1). Táto veličina sa používa v logaritmickej forme. U vitamínu E sa  $\log P = 10$ . Podľa platného Českého lékopisu 2017 je tento vitamín prakticky nerozpustný vo vode, ľahko rozpustný v acetóne, v etanole bezvodom a v mastných olejoch. V etanole 96% je dobre rozpustný [9, 10, 11].

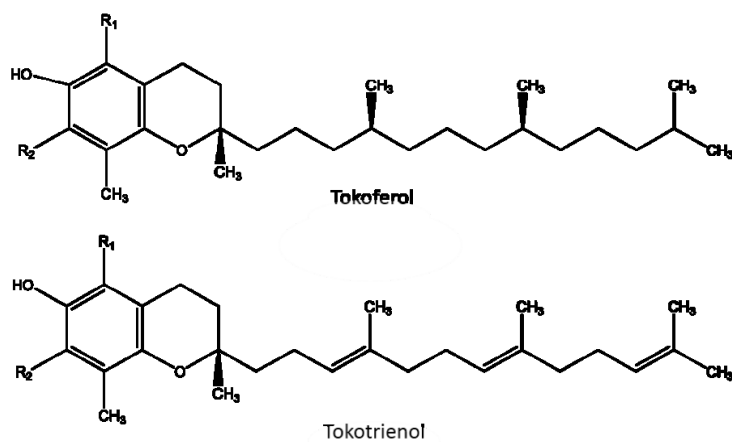
Rovnica 1: Výpočet rozdeľovacieho koeficientu P [11]

$$P = \frac{c_L}{c_V}$$

Základom štruktúry vitamínu E je chromanolový cyklus, ktorý je substituovaný metylovými ( $-\text{CH}_3$ ) skupinami (viď obr. 1). Štruktúrne sa vitamín E skladá z tokoferolov a tokotrienolov. Jedná sa o osem derivátov:  $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T a z rady tokotrienolov:  $\alpha$ -T3,  $\beta$ -T3,  $\gamma$ -T3,  $\delta$ -T3. Uvedené deriváty majú spoločný základ (viď obr. 2) a ich štruktúra je ďalej modifikovaná rôznym počtom a polohou metylových skupín v daných derivátoch (viď obr. 2). Izoméria je jednou z modifikácií štruktúry molekúl a príkladom takejto modifikácie je aj vitamín E. Izoméry sú látky, ktoré majú rovnaký sumárny vzorec, ale líšia sa štruktúrnym usporiadaním a tak sa izoméry môžu líšiť fyzikálnymi či chemickými vlastnosťami alebo môžu vykazovať rôzne vlastnosti v oboch ohľadoch [12, 13].



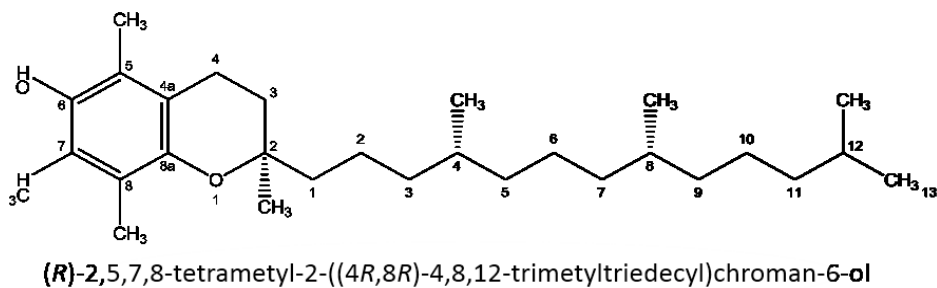
obr. 1: Základ štruktúry vitamínu E. Nakreslené v programe ChemBioDraw [14].



Derivát	R1	R2
$\alpha$	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$
$\beta$	$\text{CH}_3$	H
$\gamma$	H	$\text{CH}_3$
$\delta$	H	H

obr. 2: Štruktúra tokoferolov a tokotrienolov.  $R_1$  a  $R_2$  predstavujú substituenty uvedené v tabuľke pre jednotlivé deriváty. Nakreslené v ChemBioDraw [14].

Hlavným predstaviteľom, a zároveň biologicky najúčinnnejším izomérom je RRR- $\alpha$ -tokoferol, chemicky (2R)-2,5,7,8-tetrametyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-chroman-6-ol (viď obr. 3). V praxi sa používa vo forme acetátu. Ostatné izoméry vykazujú nižšiu biologickú aktivitu, napr.:  $\beta$ -tokoferol má 50% účinnosť oproti  $\alpha$ -tokoferolu a v prípade  $\delta$ -tokoferolu sú to 3% účinnosti na rozdiel od  $\alpha$ -tokoferolu. Skupina tokotrienolov má nižšiu biologickú aktivitu celkovo asi o 60% a to kvôli prítomnosti dvojitych väzieb. Antioxidačný účinok je úzko spojený s prítomnosťou hydroxylovej skupiny v polohe 6 chromonového cyklu [4, 9, 10, 12].



obr. 3: RRR-alfa-tokoferol. Nakreslené v programe ChemBioDraw [9].

### 3.4 Publikované metódy analýz tokoferolov a tokotrienolov

Doposiaľ bolo uskutočnených a predstavených niekoľko rôznych metód, ktoré sa zaoberali separáciou vzoriek, príp. aj kvantifikáciou obsahu. V nasledujúcej tabuľke (viď Tabuľka 1, Tabuľka 2, Tabuľka 3) sa nachádzajú publikované metódy, ktoré sú zamerané na účinnú separáciu vitamínu E spojenú s vývojom optimálnej HPLC alebo UHPLC metódy. Najčastejšie prebiehala separácia na reverzných fázach s použitím FLR detekcie. Častou zložkou mobilnej fázy bol metanol, voda, acetonitril v rôznych pomeroch. Stacionárna fáza bola zastúpená rôznymi kolónami. Navyše sú uvedené biologické vzorky, rastlinné výťažky, liečivá, zložky výživy a potravín. V niektorých metódach sa v rámci analytu vyskytuje aj iná, väčšinou lipofilná zložka, ktorá je charakteristická pre daný biologický materiál ( $\gamma$ -oryzanoly, retinol,  $\beta$ -karotén a pod.). Medzi časovo najrýchlejšie analýzy patrili analýza biologického materiálu séra a plazmy a analýza vitamínového prípravku v tobolkách a detských kvapkách. U analýzy vitamínového prípravku separácia lipofilných vitamínov a medzi nimi aj vitamínu E prebiehala na reverzných fázach HPLC s PDA detekciou a vyššou prietokovou rýchlosťou. Jednou z vyskúšaných kolón bola aj Ascentis Express F5. Mobilné fázy boli acetonitril s metanolom a vodná zložka v rôznych pomeroch.

Zdroje, ktoré boli použité na tvorbu tejto tabuľky, sú uvedené priamo v tabuľke.



Tabuľka 1: Publikované metódy analýz T a T3

Analyt	Biologická vzorka	Extrakčná metóda	Separáčna metóda	Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Čas (min)	Prietok (ml/min)	LOD	Zdroj
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3, $\gamma$ -oryzanoly	Ryžové otruby a ich olej	LLM	RP – HPLC	FLR (MS u oryzanolov)	Kinetex PFP (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)	MeOH:H <sub>2</sub> O 85:15	20	1	3-34 ng/ml	[15]
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3	Celozrnný jačmeň	MSPD	RP – HPLC	FLR	Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)	MeOH:ACN:IPA 55:40:5	12	0,8	0,03-0,11 mg/kg	[16]
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3	5 typov rastlinných olejov	Zmydelňovanie	RP – HPLC	FLR	Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)	MeOH:ACN 81:19	11	0,8	0,3-1,8 $\mu$ g/kg	[17]
$\alpha$ -T, $\alpha$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3	Palmový olej	Riedenie	NP - HPLC	UV	Zorbax Rx-SIL (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)	n-hexan:2-propanol 99:1	10	0,8	100, 28 – 175,24 $\mu$ g/l	[18]
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3	Olej zo semien ovocia	Riedenie	RP – HPLC	FLR	Luna PFP (150 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m) +Phenomenex (4 x 3 mm)	MeOH:H <sub>2</sub> O 93:7	13	1	nedostupný	[14]

Vysvetlivky: T = tokoferol, T3 = tokotrienol, FLR = fluorescenčná detekcia, HPLC = vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, RP = reverzné fázy, NP = normálne fázy, PFP = pentafluorofenyl, LLE = extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, LLM = mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny, LOD = limit detekcie, MSPD = disperzia matrice na tuhej fáze MeOH = metanol, H<sub>2</sub>O = voda, MTBE = metyl-terc-butyléter ACN = acetonitril, IPA = isopropylalkohol, UV = ultrafialový (detektor), PDA = detektor s diódovým poľom, BEH = hybridný sorbent, HRMS = hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením, VIS = viditeľné spektrum,  $\beta$ -CD =  $\beta$ -cyklodextrin, 2-HP- $\beta$ -CD = 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin

Tabuľka 2: Publikované metódy analýzy T a T3

Analyt	Biologická vzorka	Extrakčná metóda	Separáčna metóda	Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Čas (min)	Prietok (ml/min)	LOD	Zdroj
Retinyl-palmitát, retinyl-acetát, $\alpha$ -T, $\alpha$ -T-acetát	dojčenská výživa, výživa dospelých	Hydrolyza papaínom a extrakcia na izooktán	NP - HPLC	FLR	Zorbax NH (150 x 4,6 mm, 2,5 $\mu$ m)	n-hexan (A); n-hexane:MTBE 75:25 +3 ml MeOH (B)	20	1,5	0,023-0,1 $\mu$ g/ml pre $\alpha$ -T, $\alpha$ -T-actetát	[19]
retinol, retinyl palmitat, 25-OH-vitamin D, $\alpha$ , $\gamma$ -tokoferol, lutein, zeaxanthin, $\alpha$ , $\beta$ -karoten, $\alpha$ , $\beta$ -kryptoxanthin, lycopene	sérum	nedostupná	RP - UHPLC	UV-VIS	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 $\mu$ m)	ACN:MeOH 95:5 až 50:50 gradientová elúcia	4,5	0,5	<0,1 a <5 $\mu$ mol/l pre retinol a $\alpha$ -T	[20]
$\alpha$ -T, $\gamma$ -T, retinol	ľudská plazma	Riedenie	RP - UHPLC	PDA, FLR	Acquity BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 $\mu$ m)	MeOH:ACN 80:20 až 10:90 gradientová elúcia	4,3	0,2 až 0,4	0,02 – 0,1 $\mu$ g/ml	[21]
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3	Plazma, pečeň	Zmydelňovanie, riedenie	RP – HPLC	FLR	Phenomenex Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 $\mu$ m)	MeOH:H <sub>2</sub> O 85:15	15	0,8	27-156 pg/ml	[3]

Tabuľka 3: Publikované metódy analýzy T a T3

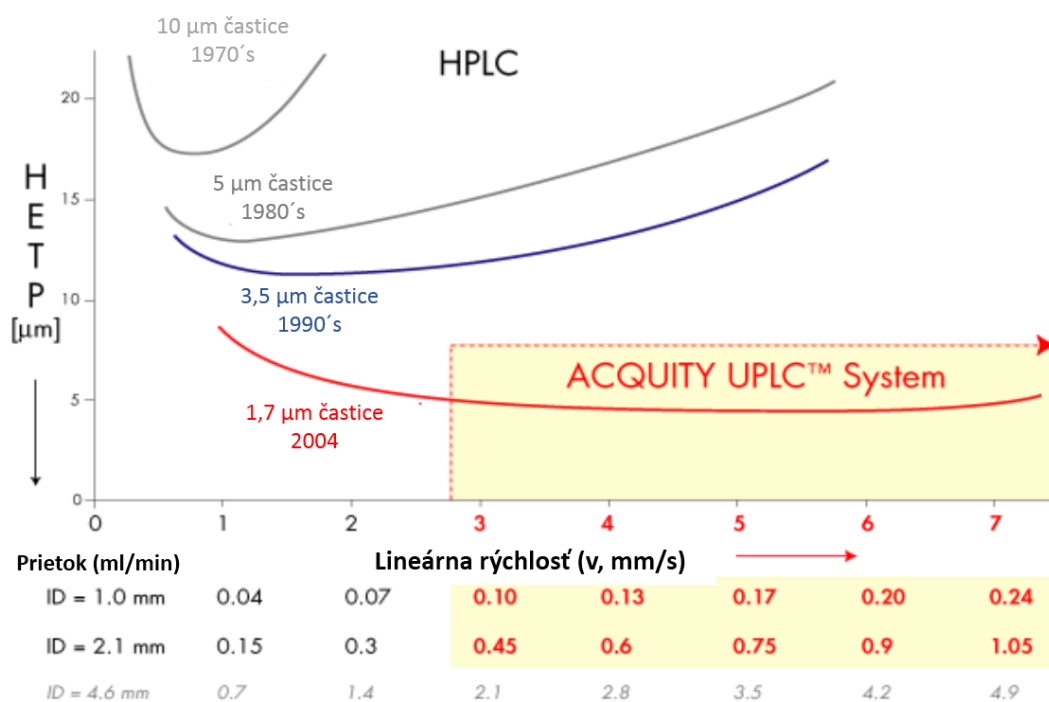
Analyt	Biologická vzorka	Extrakčná metóda	Separáčna metóda	Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Čas (min)	Prietok (ml/min)	LOD	Zdroj
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3	lipidové emulzie (sójový, olivový, rybí olej, MK)	LLE	NP – HPLC	FLR, PDA	silikagél Pinnacle DB (100 x 2,1 mm, 1,9 $\mu$ m)	n-hexan:1,4-dioxan 98:2	nedostupný	0,3	<0,1 $\mu$ g/ml	[7]
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -T3, $\gamma$ -oryzanoly, $\beta$ -karotén,	ryža	Riedenie	RP - UHPLC- HRMS	HRMS	Poroshell 120 PFP (150 x 3,0 mm, 2,7 $\mu$ m)	0,1%roztok HCOOH a MeOH obsah. 0,1% roztok HCOOH	13	nedostupný	0,2-1,8 $\mu$ g/l	[22]
$\alpha$ -T v komplexoch s $\beta$ -CD a 2-HP- $\beta$ -CD	-	Riedenie	RP – HPLC	UV	LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m)	100% MeOH	12	1,3	0,15-0,375 $\mu$ g/ml	[23]
Lipofilné vitamíny (vit. A, D, K, E)	Tobolky a detské kvapky	Riedenie	RP – HPLC	PDA	Ascentis Express F5 (100 x 4,6 mm, 2,7 $\mu$ m)	ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O 10:80:10	4	1,8	<3 $\mu$ g/ml	[24]
Lipofilné vitamíny (vit. A, D, K, E)	Tobolky a detské kvapky	Riedenie	RP – HPLC	PDA	Chromolith Performance RP-18 (100 x 3 mm)	ACN:MeOH 35:65	5	1,5	<3 $\mu$ g/ml	[24]
Lipofilné vitamíny (vit. A, D, K, E)	Tobolky a detské kvapky	Riedenie	RP – HPLC	PDA	Chromolith HighResolution RP-18 (100 x 4,6 mm)	ACN:MeOH 25:75	4	4	<3 $\mu$ g/ml	[24]

### 3.5 Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia

#### 3.5.1 Systém ultra-vysokoučinné chromatografie a jeho výhody

Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia – separačná metóda označovaná ako zmodernizovaná, zdokonalená a hlavne účinnejšia oproti klasickej HPLC. Často je používaná vo farmaceutickej oblasti, napr.: v procese vývoja liečiv, analýze a kontrole liečiv, pri sledovaní farmakokinetiky a metabolizmu liečiv. Týmto typom chromatografie je možné získať analýzu komplexných vzoriek vo vysokom rozlíšení za kratší čas [25, 26]. Medzi jej hlavné prednosti patrí najmä omnoho rýchlejšia separácia s vyšším rozlíšením vďaka časticiam menším ako 2  $\mu\text{m}$ . Zmenšením veľkosti častíc sa separácia stáva účinnejšou (je zabezpečené vyššie rozlíšenie a hodnoty H, HETP sú nižšie), lineárna prietoková rýchlosť mobilnej fázy je vyššia, rýchlosť analýzy je vyššia a tlak na kolóne stúpa. Tým pádom dĺžka kolóny môže byť menšia [24, 27, 28, 29, 30].

Na obr. 4 sú znázornené jednotlivé van Deemterové krivky odpovedajúce daným veľkostiam častíc sorbentov. Minimá kriviek predstavujú vyššiu separačnú účinnosť kolóny, kedy sú hodnoty veličiny výškového ekvivalentu teoretickej priehradky najnižšie. Pri veľkosti častíc 1,7  $\mu\text{m}$  má minimum krivky pomerne široký rozsah. To je využívané pri práci s prietokom, kde je možné pracovať v širšom rozsahu jeho hodnôt bez toho, aby bola negatívne ovplyvnená účinnosť [28, 29, 31, 32].



obr. 4: van Deemterové krivky pri rôznych veľkostiach častíc sorbentu. Prevzatý zo zdroja [33]

Pozn.: Aquity UPLC™ System je značka prístroja firmy Waters. [28]

Veličina výškový ekvivalent teoretickej priehradky H, HETP vyjadruje dĺžku kolóny L pripadajúcej na jednu teoretickú priehradku (viď Rovnica 2). Pričom iná bezrozmerná veličina – počet teoretických priehradok N – je používaná k vyjadreniu účinnosti kolóny (viď Rovnica 3) [29].

Rovnica 2: Výpočet výškového ekvivalentu teoretickej priehradky (H) [29].

$$H = \frac{L}{N}$$

Rovnica 3: Výpočet veličiny počet teoretických priehradok kolóny (N);

$t_{R,i}$  = retenčný čas,  $w_b$  = šírka píku pri základnej línii [29].

$$N = 16 \left( \frac{t_{R,i}}{w_b} \right)^2$$

V dôsledku toho je separácia účinnejšia pri vyšších lineárnych prietokových rýchlostiach a prebieha pri vysokých tlakoch (až 130 MPa, 15 000 psi). Napriek tomu sa optimálna veľkosť častíc pohybuje zväčša 1,6 – 1,9 μm, lebo každým ďalším zmenšením veľkosti dochádza k zvyšovaniu spätného tlaku, ale účinnosť sa už významne nezvyšuje. Nižšie uvedená rovnica (viď Rovnica 4) vyjadruje túto skutočnosť: spätný tlak je priamo úmerný

dĺžke kolóny  $L$ , avšak nepriamo úmerný veľkosti sorbentu  $d_p$ , a zároveň vnútornému priemeru kolóny  $d_c$  [28, 29, 30, 33].

Rovnica 4: Výpočet spätného tlaku v kolóne UHPLC;  $F_m$  = objemový prietok,  $\eta$  = dynamická viskozita MF [30].

$$\Delta p = 4000 \frac{F_m \eta L}{\pi d_c^2 d_p^2}$$

Ďalšími, ale nie menej významnými vlastnosťami UHPLC sú napr.: zníženie medze detekcie a tým aj zvýšenie citlivosti techniky. Pomocou tohto typu chromatografie je možné získať viac kvalitatívnych údajov z analýzy a navyše náklady na analýzu sú nižšie vďaka menšej spotrebe rozpúšťadiel a menšieho objemu vzoriek vďaka nižším prietokovým rýchlostiam a rýchlejšej analýze [27, 25].

### 3.5.2 Inštrumentácia UHPLC

Za posledných pár rokov došlo v oblasti farmaceutickej analýzy k pokrokom. S príchodom UHPLC systému na trh (od r. 2004) bol stále väčší záujem o tento typ chromatografie vďaka jeho výhodám. Avšak, UHPLC vyžaduje podmienky pre inštrumentáciu [28].

- Mimokolónové príspevky majú vplyv na rozmývanie elučnej zóny, dopad na tvar pík a tým znižujú účinnosť separácie. Ich negatívny vplyv je možné znížiť vhodným výberom spojovacích kapilár u nástrekového zariadenia, kolóny a detektoru. Kratšie kapiláry s menším vnútorným priemerom majú sklon k menším mimokolónovým príspevkom [28, 34].
- Stacionárna fáza s malým priemerom častíc [34].
- Frekvencia získavania dát až do 80 Hz [28].
- Intervaly dávkovacích cyklov a presné dávkovanie napriek malým objemom. Doba nástreku môže byť veľmi vplyvajúca hlavne u veľmi krátkych analýz (<1 min). Čas nástreku sa pohybuje okolo 30 s – 1 min. Potrebným skrátením doby nástreku na menej ako 15 s by zasa mohla byť ohrozená opakovateľnosť. Jav nazývajúci sa prekrývajúci sa nástrek (overlapped injection) znamená, že počas doby vykonávania nástreku, ktorého objem ešte nie je odobraný, prebieha predchádzajúca separácia. Čas nástreku sa tak optimalizoval na 15 – 20 s [34, 28].

- Dávkovací systém vplýva na separáciu prostredníctvom mimokolónových príspevkov. Ich najväčšie riziko hrozí pri použití kapilárnych, krátkych kolón a mikrokolón. Dnes sú hojne využívané automatické dávkovače (autosamplery). Sú spojené so zásobníkom, v ktorom sú umiestnené vialky a z nich sú odoberané objemy ihlou injekčnej striekačky ďalej určené k analýze [28].

Prvým typom dávkovania je nepohyblivá ihla injekčnej striekačky a pohybujúci sa zásobník kruhovo alebo osovo. Druhý spôsob dávkovania je opačný. Zásobník je nepohyblivý a pohyblivou časťou je ihla injekčnej striekačky. V treťom type dávkovania sú oba komponenty nepohyblivé. Vialka obsahujúca vzorku je prinesená pod ihlu injekčnej striekačky [28].

Automatický dávkovač firmy Waters má výhody oproti iným výrobcom výhodu v neprerušenom toku mobilnej fázy kolónou. Ihla injekčnej striekačky je oplachovaná zvnútra aj zvonka počas analýzy. Takisto pri odoberaní objemu vzorky z vialky nenastávajú výrazné tlakové zmeny [28].

- Gradientová elúcia mobilnej fázy sa dnes často využíva v analýzach komplexných látok. Pomeru zloženia mobilnej fázy sa behom analýzy mení v prospech zložky, ktorá má vyššiu elučnú silu. Dôležitými faktormi sú napr.: retenčné časy, šírka pík, selektivita a rozlíšenie, prietok mobilnej fázy. Oneskorenie gradientu by malo byť v analýze čo najmenšie. Jedná sa o oneskorenie, pokiaľ sa daný pomer mobilnej fázy dostane do kolóny. Zatiaľ tak dochádza k nežiadúcej izokratickej elúcii v počiatočnej zložke mobilnej fázy [28, 34].

### 3.5.3 Stacionárna fáza

Stacionárna fáza je jednou z najdôležitejších komponentov chromatografických systémov. Je nepohyblivou časťou a zároveň náplňou kolóny alebo sorbentom, na ktorej prebieha daná separácia. Je potrebné dodržať chemickú a tepelnú stabilitu materiálu a náplne, z ktorej je stacionárna fáza vyrobená. Obal sorbentu je väčšinou zložený z inertných materiálov ako je nerezová oceľ alebo sklo [28, 35].

Stacionárne fázy majú rôzne členenie z rôznych hľadísk. Jedným z najdôležitejších rozdelení býva podľa chromatografického módu a to na: normálny, reverzný mód, ionexy, hydrofilná interakčná chromatografia (HILIC) a iné. V oblasti UHPLC sa využívajú takisto rôzne separačné módy ako napr.: separácia na normálnych alebo reverzných

fázach, chirálna separácia, molekulová vylučovacia chromatografia (SEC), iónovo-výmenná chromatografia (IEX), hydrofilná interakčná chromatografia (HILIC) a superkritická fluidná chromatografia (SFC) [28, 35, 26].

Ďalším delením stacionárnych fáz je rozdelenie podľa chemického zloženia. Dôležitou podskupinou tohto rozdelenia sú stacionárne fázy zložené z anorganických oxidov. Jedným z najviac využívaných anorganických oxidov je silikagél. Samostatne sa tento nosič využíva pri separácii na normálnych fázach a móde HILIC. Tento nosič je zložený zo silanolových skupín Si-OH, ktoré zároveň predstavujú aktívne centrá stacionárnej fázy. Podľa typu prípravy sa silikagél delí na 3 druhy [28].

Po substitúcii vhodných ligandov na silanolové skupiny vo forme alkylov (najčastejšie C18, C8), fenylov či alkylfenylov sa tento sorbent používa pri separácii na reverzných fázach [28].

Stacionárne fázy so základom ďalších anorganických oxidov kovov boli používané pre svoju najväčšiu výhodu - vyššia chemická stabilita. Medzi oxidy kovov patrí oxid hlinitý, oxid zirkoničitý a oxid titaničitý, ktoré sú používané ako polárne sorbenty. Môžu byť využívané v rôznych separačných módoch [28].

Stacionárne fázy zložené z polymérov sú najviac používané pri analýze proteínov a peptidov. Využívané sú najmä kopolymér polystyrendivinybenzen, polyvinylalkohol a metakryláty pri seprácii na reverzných fázach alebo anorganické nosiče s povrchovou vrstvou polyméru (polysiloxany, polyétery) [28].

Dôležitým typom stacionárnych fáz sú ďalej popísané hybridné stacionárne fázy.

V začiatkoch vzniku UHPLC metódy sa vyskytovali na trhu väčšinou stacionáre fázy v reverznom móde, napr.: C8, C18 a fenylová. Až neskôr sa táto škála fáz rozšírila aj na normálny mód a HILIC [36].

UHPLC je kompatibilná s kolónami, ktoré sú naplnené povrchovo poréznymi materiálmi, s vysokoteplotnými LC a dvojrozmernými LC [25].

### **3.5.1.1 Hybridné stacionárne fázy**

Pojem hybridná stacionárna fáza znamená spojenie anorganického silikagélu s polymérom organického siloxanu. Tetraetoxysilan reaguje s metyltriethoxysilanom v pomere 2:1. Sorbent vzniknutý týmto spôsobom nesie so sebou spojenie výhodných vlastností silikagélu a zároveň výhody polyméru, čoho je dôsledkom veľmi dobrá



mechanická, tepelná a chemická stabilita vrátane širokého pH rozmedzia. Špecifickou charakteristikou tohto typu fázy je množstvo substituovaných silanolových skupín väčšinou metylovými skupinami, čo pozitívne ovplyvňuje symetriu pík [28, 37].

Hybridná stacionárna fáza BEH je v porovnaní s jej predchodcom hybridného sorbentu X-Terra od firmy Waters viac chemicky a mechanicky odolná. Tento typ vzniká reakciou tetraetoxysilanu s bis(trietoxysilyl)etanom [28].

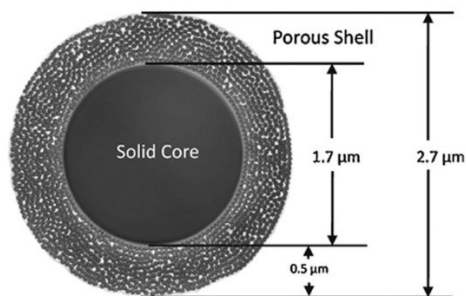
Technológia Hybridná stacionárna fáza s nabitým povrchom (CSH), ktorá bola predstavená v r. 2010, obsahuje častice s povrchovým nábojom. Výhodou tejto metódy úpravy častíc je zlepšenie tvaru pík v mobilných fázach s nízkou iónovou silou alebo v kyslých mobilných fázach. Chemická a mechanická stabilita ostáva nezmenená [32, 36, 38].

Hybridné stacionárne fázy môžu mať naviazané ligandy, ktorých charakter určuje reverzný alebo normálny separačný mód. Najčastejšie sa jedná o ligandy typu alkylov (C18, C8), fenyl-hexyl ligandy, alkylamidové alebo pentafluorofenylové (PFP) ligandy [28].

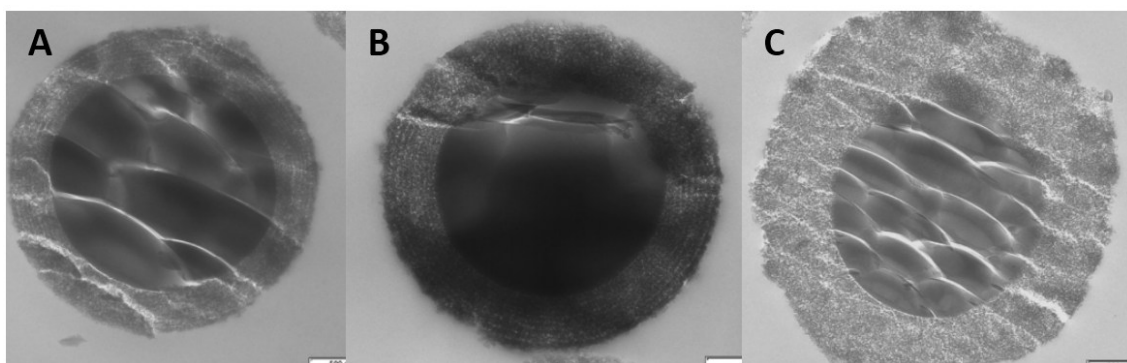
Jedným z typov CSH kolón je aj pentafluorophenyl-propylová (PFP). Má hneď niekoľko vylepšených vlastností ako napr.: polárne-nepolárne interakcie vrátane vodíkových mostíkov, ďalej hydrofóbného, elektrostatického, aromatického a v neposlednom rade aj stérisko - planárneho mechanizmu. Oproti kolónam C8 alebo C18 sa táto fluorovaná kolóna líši aj ďalšou výhodou. Separácia izomérnych látok je účinnejšia v porovnaní s vyššie uvedenými kolónami [39].

#### **3.5.4 Povrchovo porézne častice**

Pred časom bola predstavená nová technológia, kde sú neporézne pevné jadrá častíc sorbentu zaobalené do porézneho puzdra silikagélu. J. J. Kirkland ako prvý začal výrobu komerčne dostupných sorbentov s HALO časticami (viď obr. 5). Neskôr sa na trhu objavili aj kolóny s povrchovo poréznymi časticami ako medzi prvými Kinetex (Phenomenex), Ascentis Express (Sigma-Aldrich), Poroshell (Agilent) (viď obr. 6) atď [28, 40].



obr. 5: Povrchovo porézna častica Halo Peptide ES-C18 [41].



obr. 6: Povrchovo porézne častice; A) 2,6 μm Kinetex, B) 1,7 μm Kinetex, C) 2,7 μm Halo [42].

Technológia povrchovo poréznych častíc preukazuje vyššiu separačnú účinnosť vďaka svojej stavbe častíc s relatívne malým priemerom a poréznym tenkým plášťom, ktorým je zabezpečený dostatočne pravidelné usporiadanie častíc sorbentu. Dôsledkom toho je urýchlený a lepší transport hmoty a kratší čas analýzy [28, 43, 44].

Sorbenty s povrchovo poréznymi časticami sú používané v HPLC vďaka nízkemu spätnému tlaku do 25 MPa s prietokovou rýchlosťou 0,6 ml/min. V UHPLC metódach sa používajú plne porézne častice s priemerom do 2 μm [28].

### 3.6 Validácia metódy

Pri vývoji každej analytickej metódy je súčasťou kontroly kvality validácia metódy. Validácia metódy je nutná pred jej zavedením na všeobecné používanie, a zároveň je dôkazom, že metóda je vhodná na daný účel. Validácia sa stanovuje podľa validačných parametrov na základe ustanovení regulačných autorít. Validáčne parametre sa riadia podľa doporučení harmonizovaných predpisov (ICH) vo farmaceutickej analýze.

Validačné parametre podľa ICH zahrňujú: správnosť, presnosť, špecifitu, detekčný limit, kvantitatívny limit, rozsah, linearitu, robustnosť [45, 46].

- Správnosť

Správnosť metódy predstavuje rozdiel medzi nameranými hodnotami a prijatou referenčnou hodnotou. Tento rozdiel sa tiež označuje ako chyba výsledku [45].

- Presnosť

Presnosť udáva mieru tesnosti zhody medzi získanými výsledkami zo série meraní. Tiež býva vyjadrená aj ako rozptyl nameraných hodnôt a je vyjadrovaná ako relatívna smerodajná odchýlka (RSD v %). Tento validačný parameter je ďalej rozdelený na opakovateľnosť metódy a reprodukovateľnosť metódy [45, 46].

- Linearita

Validačný parameter linearita znamená, že metóda poskytuje výsledky priamo úmerné koncentrácii analytu vo vzorke. V prípade UHPLC analytickej metódy ide o priamu závislosť signálu na koncentrácii. V praxi sa používa matematická rovnica  $y = ax + b$ , u ktorej  $a$  predstavuje posun na osi  $y$  a  $b$  je označenie pre smernicu kalibračnej priamky [45, 46].

- Limit detekcie (LOD)

Limit detekcie (detekčný limit) je hodnota koncentrácie analytu vo vzorke, ktorá je ešte detekovateľná. Jedná sa o pomer signálu k šumu, ktorého hodnoty musí byť  $\geq 3$  [45, 46].

- Limit kvantifikácie (LOQ)

Parameter Limit kvantifikácie predstavuje koncentráciu analytu vo vzorke, ktorá je určená s prijateľnou presnosťou a správnosťou. Hodnota LOQ je súčasťou lineárneho rozsahu a jeho hodnoty sú určované ako pomer signálu k šumu. V praxi sa často využíva dolný limit kvantifikácie (LLOQ), čo predstavuje najnižšiu koncentráciu analytu vo vzorke, ktorú je ešte možné určiť s prijateľnou správnosťou a presnosťou [45, 46].

## 4 Experimetálna časť

### 4.1 Použité prístroje a chemikálie

#### 4.1.1 Štandardné látky

- Tokoferoly ( $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol,  $\delta$ -tokoferol), Tocopherols 25mg/ml v hexane  $\geq 98\%$  (Sigma – Aldrich, Nemecko)
- Tokotrienoly ( $\alpha$ -tokotrienol,  $\beta$ -tokotrienol,  $\gamma$ -tokotrienol,  $\delta$ -tokotrienol) Tokotrienols 5mg/ml v etanole  $\geq 98\%$  (Larodan, Švédsko)

#### 4.1.2 Pomôcky a prístrojové vybavenie

- analytické kolóny:
  - Acquity UPLC CSH C18 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, USA)
  - Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, USA)
  - Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , (Waters, Milford, USA)
  - Ascentis Express Cyano 100 x 2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
  - Ascentis Express F5 100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
  - Kinetex PFP 100 x 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA)
- automatické mikropipety a špičky, Eppendorf Reference2, Hamburg, Nemecko
- trepačka, IRA-Labdancer
- UHPLC systém Acquity™ Ultra Performance LC, Waters, Milford, USA
- vialky s uzávermi, Vitrum, ČR

#### 4.1.3 Chemikálie

- acetonitril, Acetonitrile LC-MS Chromasolv®  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2-propanol LC-MS Chromasolv®  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- metanol, Methanol LC-MS Chromasolv®  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- ultračistá voda (destilácia prebieha na Katedre analytickej chémie pomocou prístroja Milli-Q RG, Merck)

#### **4.1.4 Výživový doplnok**

- Vitamina E liquida (koloidný vitamín E), 30 ml; D- $\alpha$ -tokoferol 2400 mg/100 ml; (Martinez Nieto, MARNYS<sup>®</sup>, Španielsko)

### **4.2 Príprava roztokov**

#### **4.2.1 Príprava zásobných roztokov štandardných látok**

Pre vývoj tejto metódy boli použité ako zásobné roztoky štandardných látok vitamínu E roztoky tokoferolov ( $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T) a tokotrienolov ( $\alpha$ -T3,  $\beta$ -T3,  $\gamma$ -T3,  $\delta$ -T3).

Každý derivát vitamínu E bol pripravovaný samostatne spôsobom: objem 40  $\mu$ l odobraný zo štandardného roztoku daného izoméru T (25 mg/ml) bol doplnený hexanom 960  $\mu$ l, aby výsledná koncentrácia takto pripraveného zásobného roztoku T bola presne 1 mg/ml.

Príprava zásobných roztokov tokotrienolov prebehla obdobne. 200  $\mu$ l štandardného roztoku konkrétneho izoméru T3 (5 mg/ml) bol doplnený 800  $\mu$ l etanolu, aby výsledný zásobný roztok izoméru T3 odpovedal koncentrácii 1 mg/ml.

Takto pripravené zásobné roztoky boli uchovávané v chladničke pri teplote 4 °C.

#### **4.2.2 Príprava pracovných roztokov štandardných látok**

Z východiskovej koncentrácie 1 mg/ml zásobného štandardného roztoku každého derivátu bolo odobraných 10  $\mu$ l zo zásobného roztoku štandardných látok a tento objem bol doplnený 990  $\mu$ l metanolu. Výsledná koncentrácia takto pripravených pracovných roztokov bola 10  $\mu$ g/ml. Riedenie prebiehalo do 8 rôznych vialiek. Každá vialka bola označená príslušným typom tokoferolu, resp. tokotrienolu.

Zmes T a T3 bola pripravená do samostatnej vialky, v ktorej sa nachádzalo 8-krát po 10  $\mu$ l z každého izoméru odobraných zo zásobného roztoku štandardných látok a doplnených 920  $\mu$ l metanolu.

Voda sa pri úprave koncentrácií nepoužívala, pretože vitamínu E je vo vode prakticky nerozpustný a tiež z dôvodu nižšej odozvy detektoru pri meraniach.

#### **4.2.3 Príprava roztokov pre UHPLC analýzu**

Pri samotnej UHPLC analýze sa používalo niekoľko roztokov. Ako slabá oplachová kvapalina bol použitý 30% roztok acetonitrilu. Oplachovou kvapalinou piestov bol 10% roztok metanolu vo vode. Silnou oplachovou kvapalinou bol použitý 100% roztok metanolu vo vode.

Mobilná fáza pri každom meraní bola zložená z organického modifikátoru a vodnej zložky v rôznych pomeroch s odlišným zložením vzhľadom k danému meraniu. V niektorých meraniach bol k vodnej zložke pridaný isopropanol v pomere 1:1. Metanol buď samostatne, alebo v pomere 1:1 s acetonitrilom zastupovali druhú zložku mobilnej fázy.

#### **4.3 Podmienky UHPLC metódy**

Podmienky optimálnej separácie pomocou UHPLC separačnej metódy boli nasledovné. Kolóna Ascentis Express F5 (100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m), Sigma-Aldrich, na ktorej prebiehala separácia, bola zahrievaná na teplotu 40 °C a teplota automatického dávkovača bola 4 °C. Nástrek vzorky na kolónu bol 5  $\mu$ l. Mobilná fáza bola zložená z metanolu s acetonitrilom (1:1) a vody v pomere 75:25, s prietokovou rýchlosťou 1 ml/min a izokratickou elúciou. Za týchto podmienok bola využitá PDA detekcia aj FLR detekcia. Vlnová dĺžka PDA detekcie bola nastavená na 290 nm. FLR excitačná vlnová dĺžka bola nastavená na 280 nm a emisná vlnová dĺžka bola 325 nm. Celá separácia trvala menej než 8 min. Pre meranie a vyhodnotenie bol použitý software Empower<sup>TM</sup>3.

#### **4.4 Validácia metódy**

##### **4.4.1 Kalibračná závislosť**

Lineárna závislosť bola preukázaná pomocou závislosti plochy píku na koncentrácii a následne zostrojenia kalibračnej krivky, ku ktorej zostrojeniu bola pripravená kalibračná rada.

Z roztoku s koncentráciou 100 µg/ml boli ďalej pripravované vzorky v následných koncentráciách (Tabuľka 4).

Tabuľka 4: Príprava roztokov kalibračnej závislosti

koncentrácia	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	70 µg/ml
<b>STD (100 µg/ml)</b>	100 µl	200 µl	500 µl	700 µl
<b>MeOH</b>	900 µl	800 µl	500 µl	300 µl

STD = štandardný roztok; MeOH = metanol

Z týchto koncentrácií boli pripravené ďalšie vzorky stále 10-násobným zriedením s koncentraciami: 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml a takým istým spôsobom riedenia aj u 20 µg/ml, 50 µg/ml a 70 µg/ml. Všetky štandardné roztoky boli riedené metanolom.

#### 4.4.2 Stanovenie presnosti a správnosti

Pri overení presnosti a správnosti metódy boli pripravené tri rôzne koncentračné hladiny s obsahom liečiva  $\alpha$ -T vo výživovom doplnku (kvapky) (viď Tabuľka 5). V prípade štandardných roztokov 3 koncentrácií (80%, 100% a 120% STD) boli pridané jednotlivé izoméry T a T3 zo zásobných štandardných roztokov T a T3. Zásobný roztok T bol zložený zo 4 derivátov T po 480 µl (dokopy 1920 µl) a riedený metanolom (80 µl), aby výsledná koncentrácia bola rovná 240 µg/ml s výsledným objemom 2 ml. Rovnakým spôsobom bol pripravený aj zásobný roztok T3 s objemom 2 ml.

Kvapky s obsahom  $\alpha$ -T 2400 mg/100 ml bolo potrebné zriediť do koncentračného rozmedzia kalibračnej krivky (0,7 – 70 µg/ml). Zásobný roztok kvapiek bol zriedený 10-násobne metanolom (100 µl kvapky + 900 µl metanol). Boli pripravené vialky vzoriek troch rôznych koncentrácií (80%, 100% a 120%), v ktorých boli obsiahnuté zmesi T a T3 derivátov odobraných z ich zásobných štandardných roztokov. Ich jednotlivé objemy viď Tabuľka 5. Následne do každej pripravenej vialky so vzorkami rôznych koncentrácií (80%, 100%, 120% vzorka) bolo k zmesi štandardných roztokov T a T3 pridaných 10 µl zásobného roztoku kvapiek a tak výsledné riedenie metanolom bolo 1000-násobné a koncentrácia v analytoch dosahovala 24 µg/ml.

Tabuľka 5: Príprava roztokov 3 rôznych koncentračných hladín výživového doplnku pri overení presnosti a správnosti.

	80% STD	80% vzorka	100% STD	100% vzorka	120% STD	120% vzorka
<b>T</b> 240 µg/ml	80 µl	80 µl	100 µl	100 µl	120 µl	120 µl
<b>T3</b> 240 µg/ml	80 µl	80 µl	100 µl	100 µl	120 µl	120 µl
<b>MeOH</b>	840 µl	830 µl	800 µl	790 µl	760 µl	750 µl
<b>kvapky</b> 2400 µg/ml	-	10 µl	-	10 µl	-	10 µl

T = tokoferoly; T3 = tokotrienoly; MeOH = metanol; STD = štandardný roztok tvorený zmesou T, T3 a MeOH v danej koncentrácii

V prípade 80%, 100% a 120% roztokov vzoriek boli pripravené 3 vzorky (vialky).



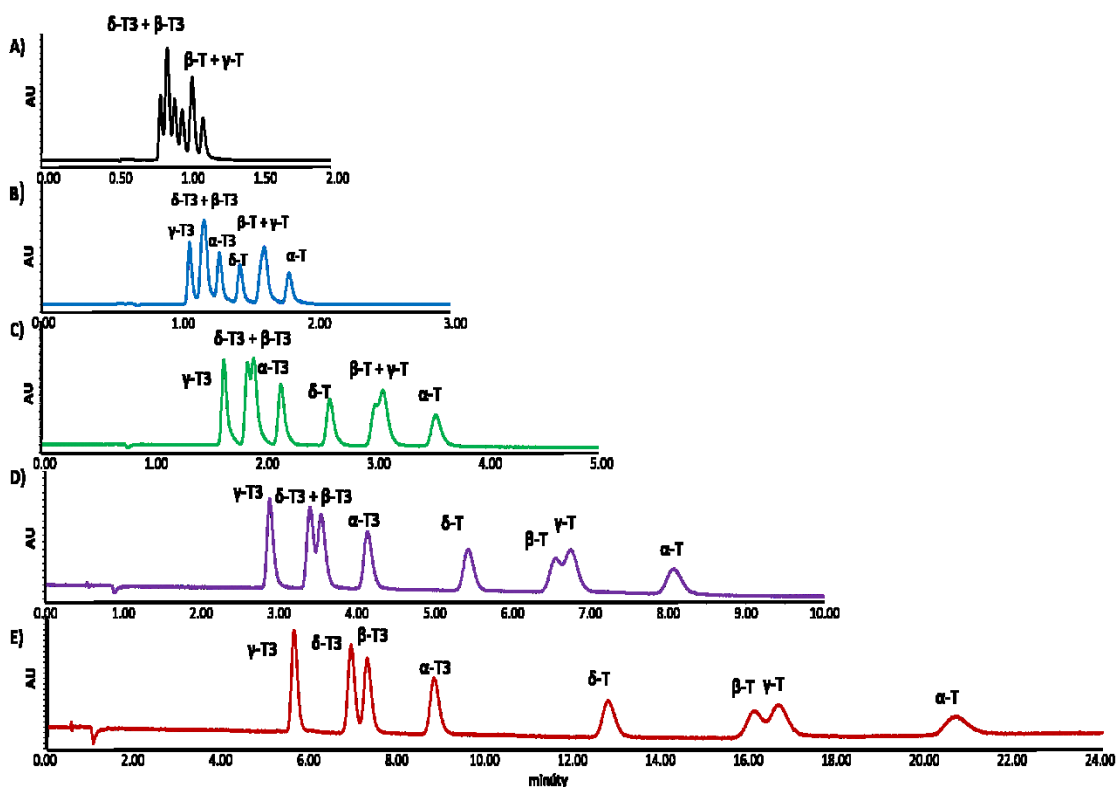
## 5 Výsledky a diskusia

V priebehu optimalizácie metódy bol testovaný vplyv stacionárnej fázy, mobilnej fázy s jej zložením, jej prietoková rýchlosť, teplota kolóny, čas separácie, separačná spolu s rozlíšením.

### 5.1 Výsledky získané na kolóne CSH PFP

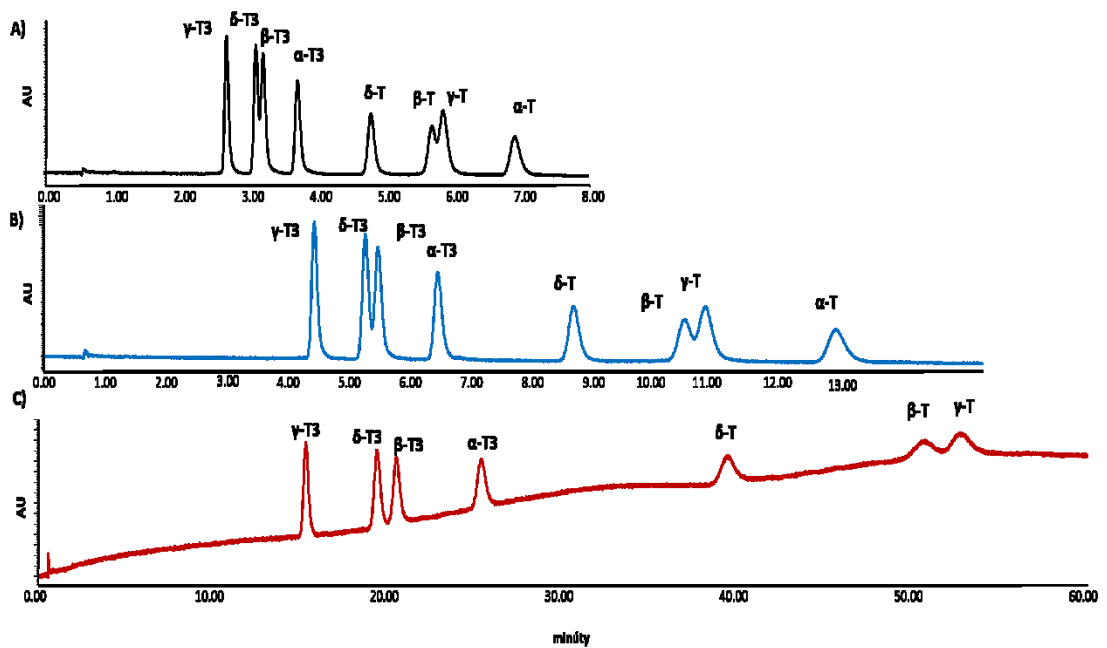
Táto CSH PFP kolóna bola skúšaná s rôznymi typmi a pomermi mobilnej fázy.

V jednom z prvých meraní bola mobilná fáza tvorená metanolom a vodou. Za najkomplikovanejší proces bola považovaná separácia problematických párov izomérov  $\delta$ -T3 s  $\beta$ -T3 a páru  $\beta$ -T s  $\gamma$ -T. Tieto dva páry izomérov spôsobovali rovnaké komplikácie aj pri niektorých ďalších meraniach vďaka ich rovnakému počtu metylových skupín (ale v rôznych polohách) a teda rovnakej molekulovej hmotnosti. Pri tejto mobilnej fáze sa rozlíšenie separácie zlepšilo postupným percentuálnym zvyšovaním podielu vody v mobilnej fáze (viď obr. 7). Avšak podľa chromatogramu separácia kritických párov izomérov vitamínu E nebola stále dostačujúca. Zvýšením podielu vody sa čas separácie zvýšil až na viac ako 20 min a tak metóda na tejto kolóne s mobilnou fázou metanol a voda nebola vyhovujúca. Vo všetkých meraniach bola využitá izokratická elúcia, pri ktorej dochádza k rozširovaniu šírky pík vplyvom difúzie. Predĺženie analýzy negatívne vplýva na tvar pík a citlivosť analýzy.



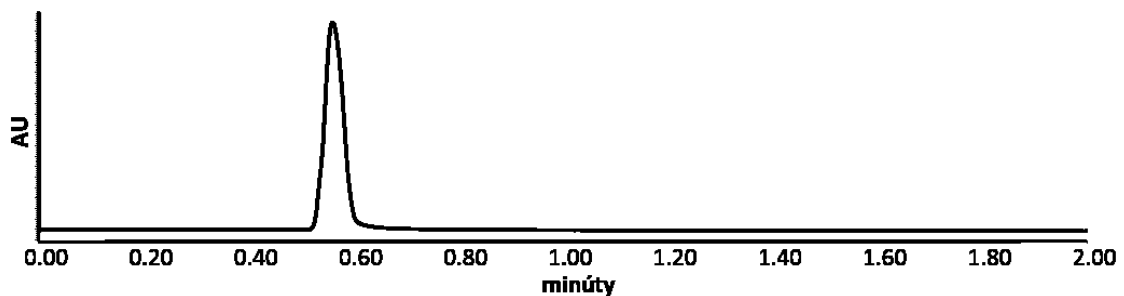
obr. 7: Chromatogramy separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PFP, MF = MeOH:voda;  
 A) 85:15; B) 80:20; C) 75:25; D) 70:30; E) 65:35

Ďalší experiment bol uskutočnený s mobilnou fázou metanol, acetonitril a voda (vid' obr. 8), kde organická zložka bola tvorená metanolom a acetonitrilom v pomere 1:1 a druhou zložkou bola samotná voda. V prvom vyskúšanom pomere MeOH a ACN k vode 63:37 (A) je vidieť na chromatograme separáciu všetkých ôsmich derivátov, ale kvôli nedostatočnej separácii sa podiel organickej zložky k vode znížil postupne na 60:40 (B) a 50:50 (C). Všeobecne pri znížení organického podielu mobilnej fázy sa čas separácie predĺži a v tomto prípade je to výrazné hlavne u pomere 50:50. Pri tomto pomere mobilnej fázy sa ani do 60. min nepodarilo separáciu úplne dokončiť. V prípade C) nastal drift (posun) základnej línie.



obr. 8: Chromatogramy separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PFP; MF = ACN/MeOH:voda;  
A) 63:37; B) 60:40; C) 50:50

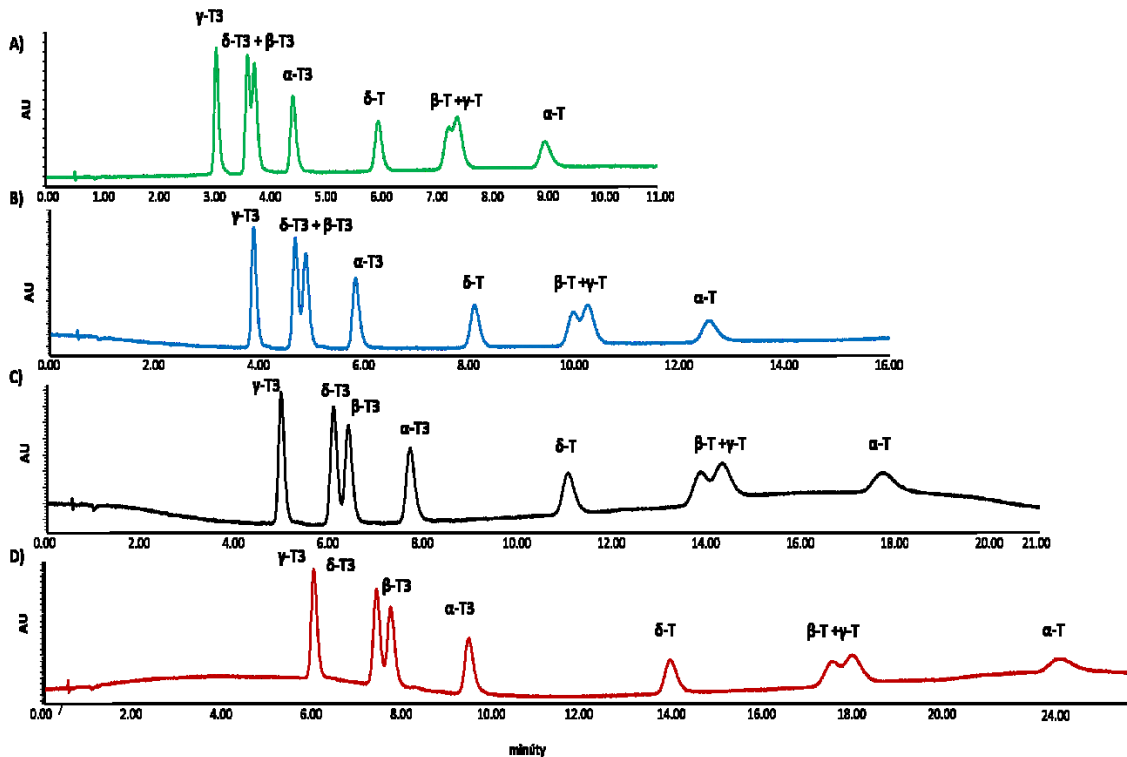
Pri pridaní isopropanolu k vodnej zložke (viď obr. 9) je možné vidieť jeden pík a o separácii jednotlivých izomérov sa nedá hovoriť. Ani pri zvýšení podielu vodnej fázy sa výsledky nezlepšili a teda tento typ mobilnej fázy bol pre túto kolónu nevyhovujúci.



obr. 9: Chromatogram separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PFP MF = ACN/MeOH:IPA 65:35

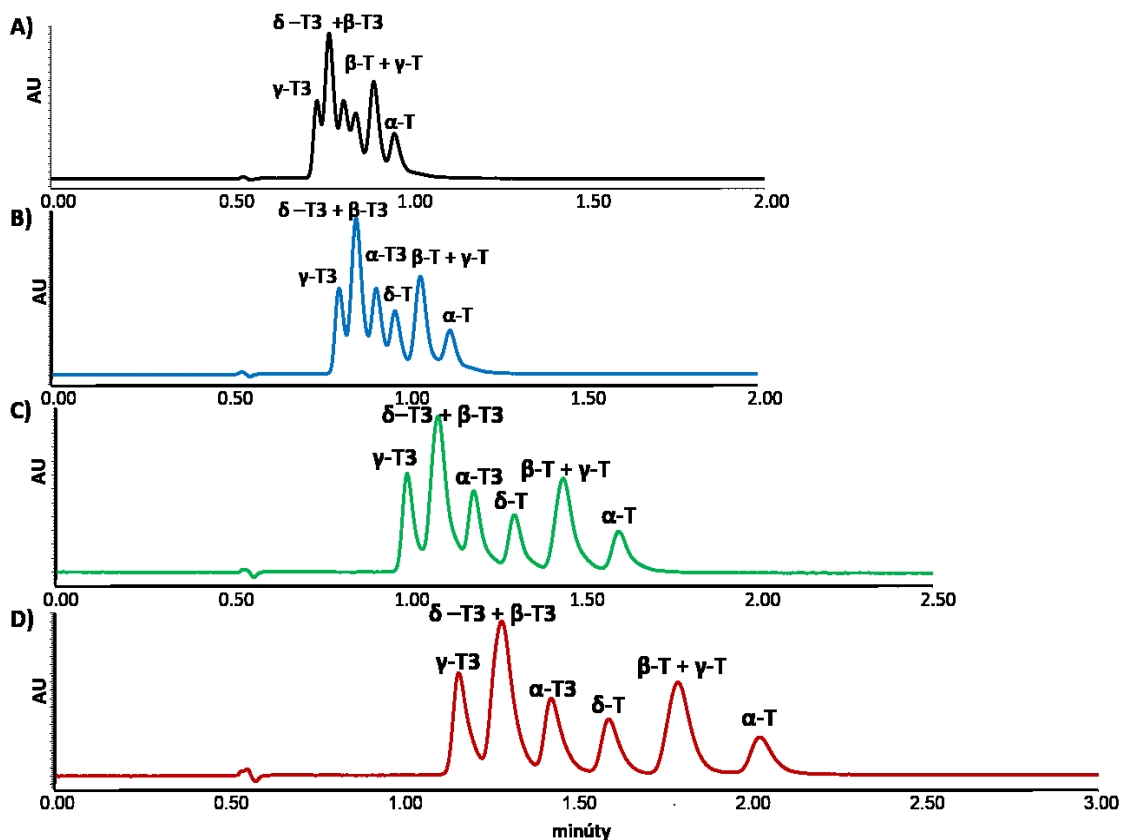
Pri zmene teploty kolóny na 50 a 60 °C a mobilnej fáze metanol a voda 65:35 vzhľadom na výsledky, zmena teploty kolóny mala na selektivitu separácie zanedbateľný vplyv (viď obr. 10 A, B). Separácia kritických párov izomérov nebola úplná. Zmeny teplôt boli porovnané s pôvodnou teplotou kolóny 40 °C (C). Zvýšená teplota kolóny mala vplyv na čas analýzy, ktorý bol skrátený. Navyše bol vyskúšaný iný pomer metanolu a vody a to 60:40 pri teplote 60 °C (D). V tomto prípade nedošlo k výraznému zlepšeniu separačnej

selektivity, a zároveň sa čas analýzy predlžil. V chromatogramoch A) a D) dochádza k cyklickému vlneniu základnej línie.



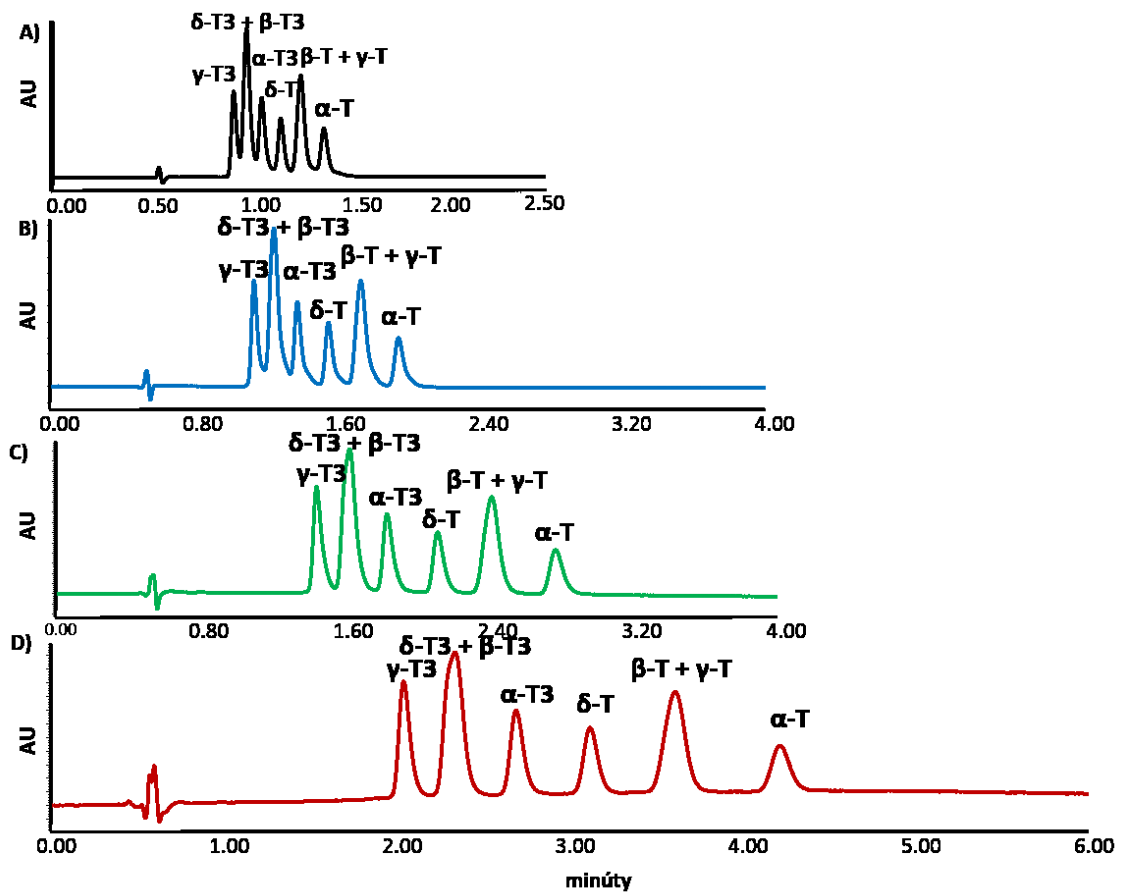
obr. 10: Chromatogramy separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PFP; MF = MeOH:voda;  
 A) 65:35, t = 60°C; B) 65:35, t = 50°C; C) 65:35, t = 40°C; D) 60:40, t = 60°C

V ďalšom meraní nastala zmena vo vodnej zložke. K samotnej vode bol pridaný isopropanol (1:1). Organická zložka bola zastúpená metanolom. Boli nastavené tieto pomery mobilnej fázy - metanol a voda spolu s isopropanolom: 70:30 (A); 65:35 (B); 60:40 (C); 50:50 (D); 40:60 (E). Aj v prípade takto rôzne nastavených pomerov mobilnej fázy, a zároveň pri postupnom zvyšovaní vodnej zložky, nedošlo k dostatočnej separácii ôsmich derivátov (viď obr. 11).



obr. 11: Chromatogramy separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PFP; MF = MeOH:IPA/voda;  
A) 70:30; B) 65:35; C) 60:40; D) 50:50

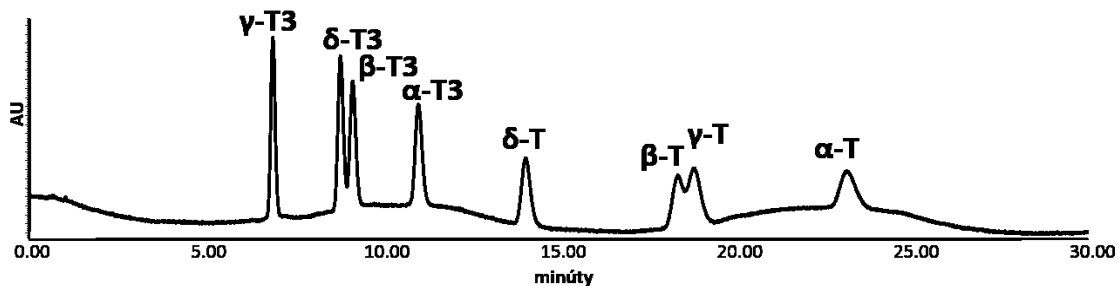
Pri kombinácii mobilnej fázy, kde organická zložka bola zastúpená acetonitrilom a metanolom (1:1) a vodná zložka bola tvorená vodou spolu s isopropanolom (1:1), došlo opäť iba k neúplnej separácii. Problematické páry izomérov ostali znova nerozdelené. Na obr. 12 je vidieť zmeny pomerov mobilnej fázy, ktorých bolo cieľom dosiahnuť úplnú separáciu najmä dvoch párov izomérov ( $\delta$ -T3 s  $\beta$ -T3 a pár  $\beta$ -T s  $\gamma$ -T). Napriek týmto zmenám neboli dosiahnuté očakávané výsledky.



obr. 12: Chromatogramy separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PFP; MF = ACN/MeOH:IPA/voda; A) 50:50; B) 40:60; C) 30:70; D) 20:80

## 5.2 Výsledky získané na kolóne CSH Phenyl-Hexyl

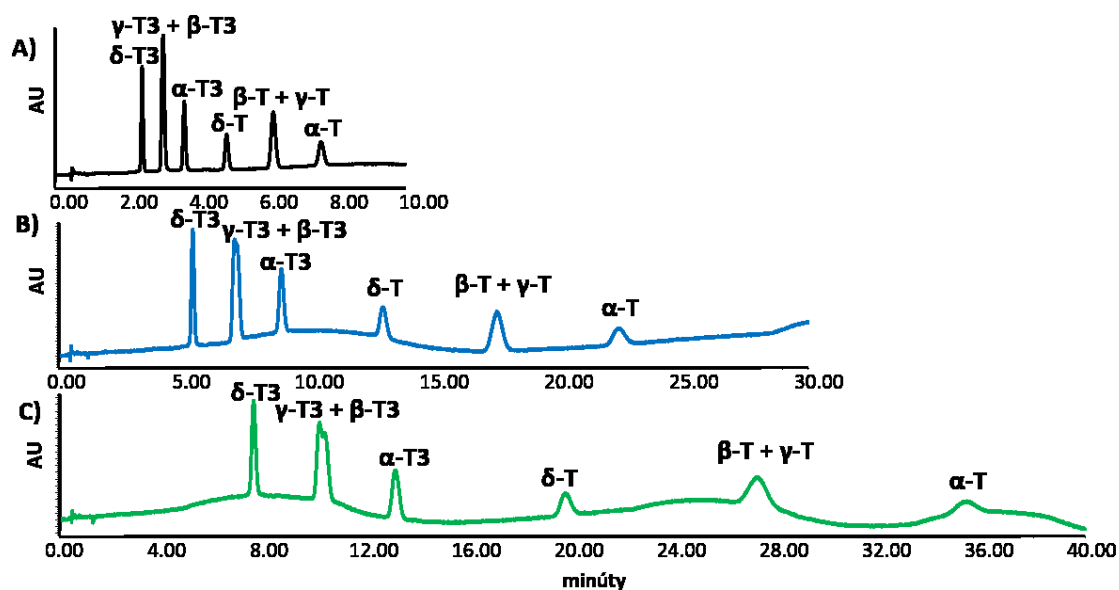
Táto CSH phenyl-hexyl (CSH PHE) kolóna bola vyskúšaná pri pomere mobilnej fázy metanol a voda (77:23) a jej prietokovej rýchlosti 0,5 ml/min. Napriek tomu, separácia kritických párov izomérov ( $\delta\text{-T3}$  s  $\beta\text{-T3}$  a  $\beta\text{-T}$  s  $\gamma\text{-T}$ ) bola viditeľná, avšak separačná selektivita nebola dostatočne účinná (viď obr. 13). Ďalšie pomery a typy mobilnej fázy neboli skúšané na danej kolóne, kvôli dlhej dobe analýzy. Snahou zvýšiť účinnosť separácie zväčšením podielu vodnej zložky, čas analýzy by sa ďalej zvyšoval.



obr. 13: Chromatogram separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH PHE; MF = MeOH:voda 77:23

### 5.3 Výsledky získané na kolóne CSH C18

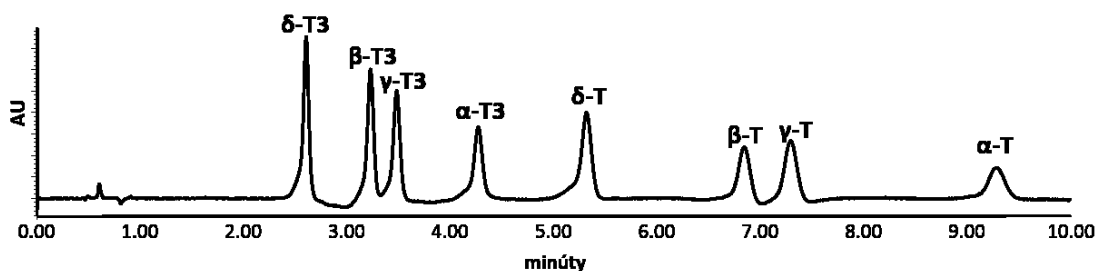
V ďalších meraniach bola použitá kolóna C18. Na obr. 14 (A) bola vyskúšaná mobilná fáza metanol a voda 90:10. V ďalších dvoch meraniach (B a C) sa podiel organickej časti znižoval za predpokladu vyššej separačnej selektivity a teda, že dôjde k úplnej separácii všetkých derivátov. Tento predpoklad sa nepodarilo naplniť. Prekážkou bol jav koelúcie problematických párov izomérov ( $\gamma$ -T3 s  $\beta$ -T3 a páru  $\beta$ -T s  $\gamma$ -T) a tak sa možnosť danej kolóny ako vhodnej vylúčila.



obr. 14: Chromatogramy separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny CSH C18; MF = MeOH:voda; A) 90:10; B) 85:15; C) 83:17

## 5.4 Výsledky získané na kolóne Kinetex PFP

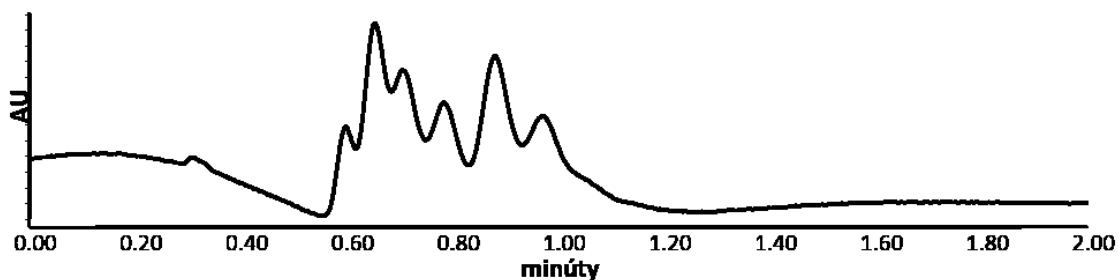
Na obr. 15 sa nachádza separácia na kolóne Kinetex PFP so zložením mobilnej fázy metanol a voda (80:20). Hoci selektivita a čas separácie boli vyhovujúce, metóda nebola označená za optimálnu kvôli frontujúcim píkom. Príčinou tohto javu je pravdepodobne nekompatibilita šraubovania kolóny, ktorá pochádza od iného výrobcu ako je výrobca inštrumentácie.



obr. 15: Chromatogram separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny Kinetex PFP; MF = MeOH:voda 80:20

## 5.5 Výsledky získané na kolóne Ascentis Express Cyano

Pomocou tejto kolóny bola získaná separácia znázornená na obr. 16. Čas separácie je krátky, ale samotná separácia izomérov nie je ani zďaleka dostatočná.

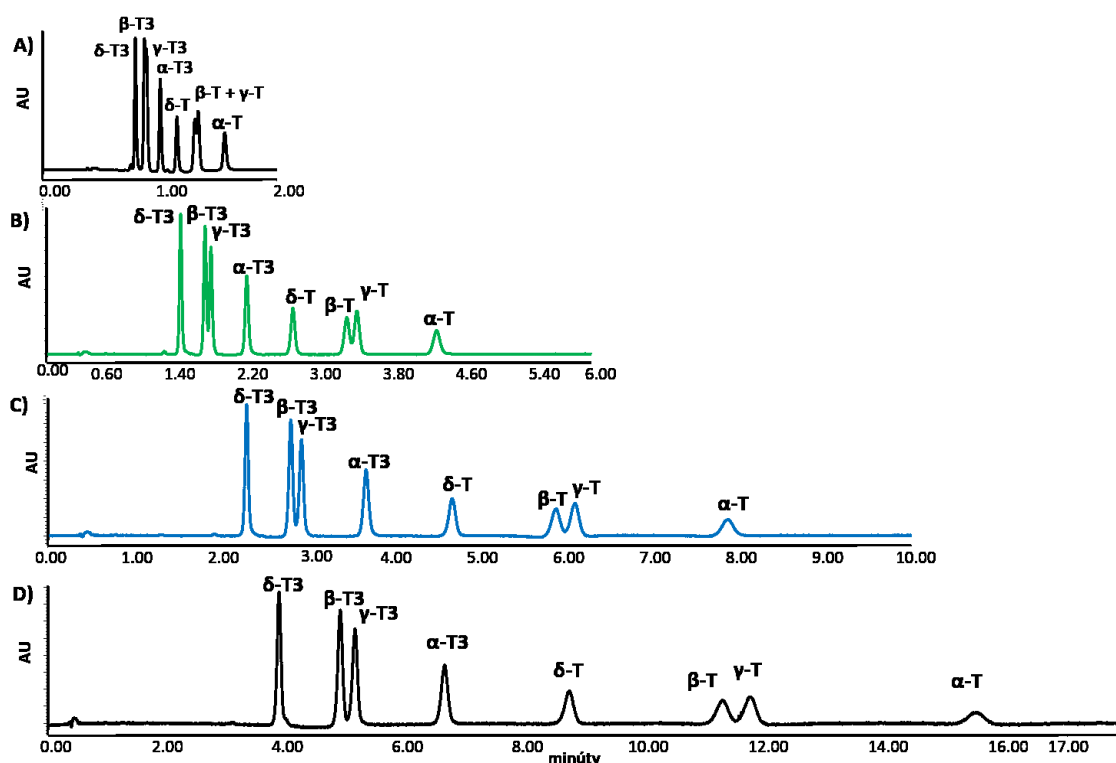


obr. 16: Chromatogram separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny Ascentis Express cyano;  
MF = MeOH:voda 80:20



## 5.6 Výsledky získané na kolóne Ascentis Express F5

Kolóna Ascentis Express F5 poskytla najlepšie výsledky pri použití niekoľkých mobilných fáz. Jedna z prvých vyskúšaných mobilných fáz na tejto kolóne bola zložená z acetonitrilu a vody. Na nižšie uvedenom obr. 17 sa nachádzajú chromatogramy pri podiele acetonitrilu 80%(A), 70%(B), 65%(C) a 60%(D). Druhá zložka bola tvorená vodou. Prietok mobilnej fázy bol 1 ml/min. Napriek vhodnej separačnej účinnosti v prípade D) bola hľadaná iná možnosť mobilnej fázy, ktorej čas separácie by bol kratší a rozlíšenia párov izomérov  $\beta$ -T3 s  $\gamma$ -T3 a páru  $\beta$ -T s  $\gamma$ -T by bolo vyššie.

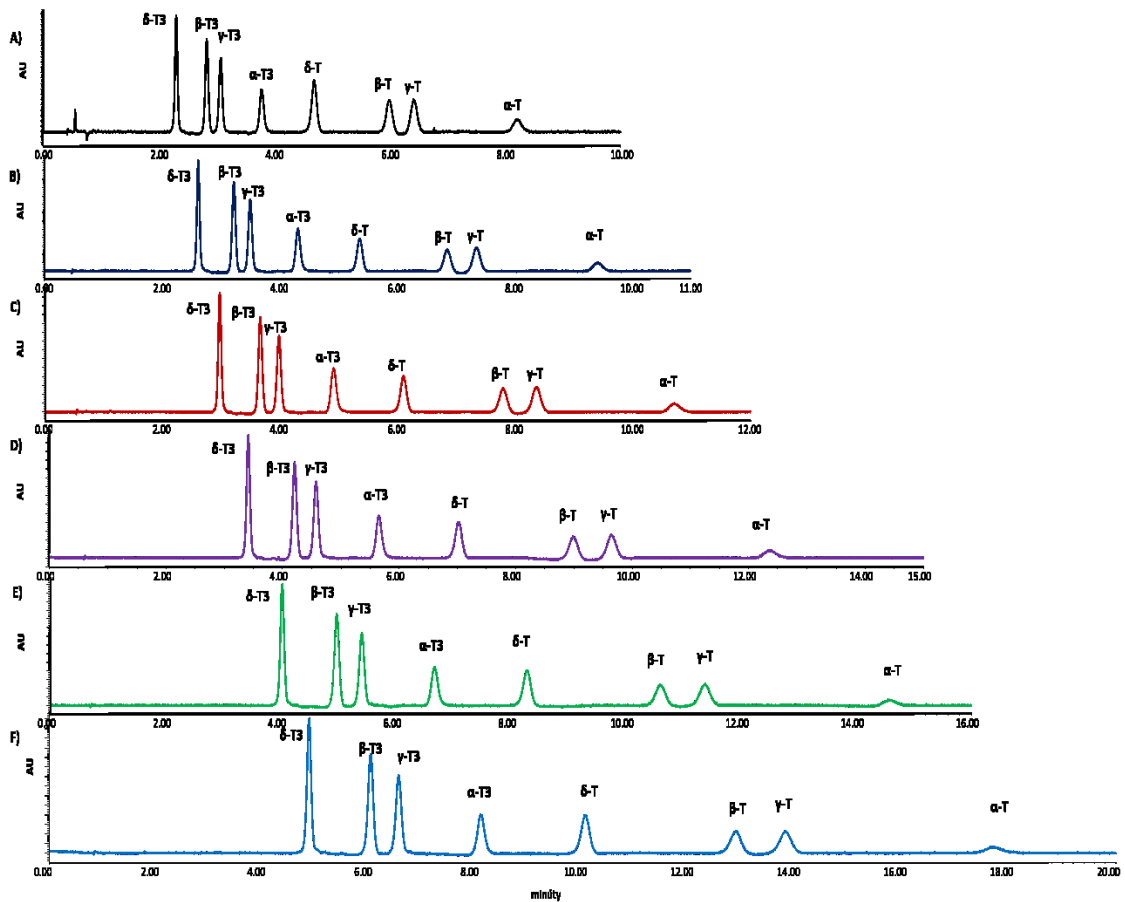


obr. 17: Chromatogram separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny Ascentis Express F5; MF = ACN:voda;

A) 80:20; B) 70:30; C) 65:35; D) 60:40

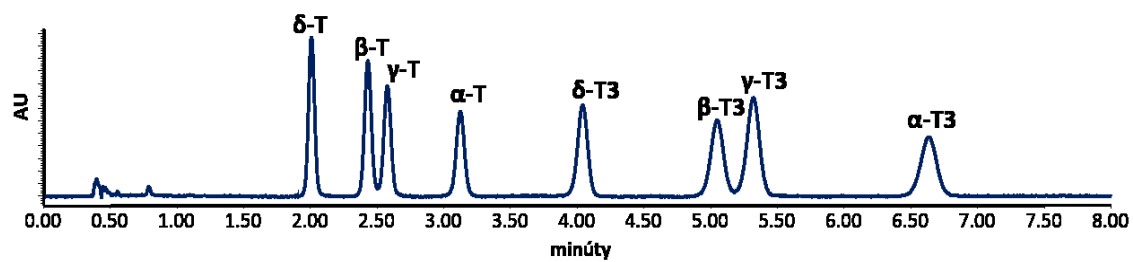
Pri ďalšej kombinácii mobilnej fázy bola využitá aj zmena rýchlosti jej prietoku. Mobilná fáza tvorená metanolom a vodou v pomere 80:20 bola otestovaná pri prietokových rýchlostiach 0,5 – 1,0 ml/min (viď obr. 18). Je možné vidieť súvis medzi zvyšujúcou sa prietokovou rýchlosťou a zvyšovaním separačnej selektivity a vyšším rozlíšením. Zároveň je potrebné dodať, že prietoková rýchlosť nie je jediným faktorom vplyvajúcim na separáciu, jej účinnosť a selektivitu. V uvedených chromatogramoch A) – F) je vidieť postupné predĺženie doby separácie vzhľadom na znižovanie prietokovej rýchlosti

mobilnej fázy. Pri prietoku 1 ml/min (A) sa čas separácie znížil na polovicu oproti 0,5 ml/min (F).



obr. 18: Chromatogram separácie 8 derivátov vitamínu E s využitím kolóny Ascentis Express F5; MF = MeOH:voda 80:20; A) 1 ml/min; B) 0,9 ml/min; C) 0,8 ml/min; D) 0,7 ml/min; E) 0,6 ml/min; F) 0,5 ml/min

Pri použití mobilnej fázy, ktorá bola zložená z metanolu spolu s acetonitrilom (1:1) a z vody v pomere zložiek 75:25 a pri prietokovej rýchlosti 1 ml/min, bola dosiahnutá vysoká separačná selektivita kolónou Ascentis Express F5. Čas separácie bol menej ako 8 min. Spojením týchto parametrov došlo k nájdeniu optimálnej metódy k separácii všetkých ôsmich derivátov vitamínu E až k základnej línii.



obr. 19: Chromatogram separácie 8 derivátov s využitím kolóny Ascentis Express F5; MF = MeOH/ACN:voda 75:25

## 5.7 Validácia metódy

### 5.7.1 Kalibračná závislosť

Linearita ako jeden zo skúmaných parametrov pri validácii metódy bola overená formou kalibračných kriviek. Kalibračná závislosť bola porovnaná u PDA a FLR detekcie. Z toho vyplývajú dve kalibračné krivky pre každý izomér (vid' obr. 20 - obr. 23). Porovnaním citlivosti dvoch typov detekcie z meraní vyplynulo, že FLR detekcia bola citlivejšia u niektorých derivátov až trikrát.

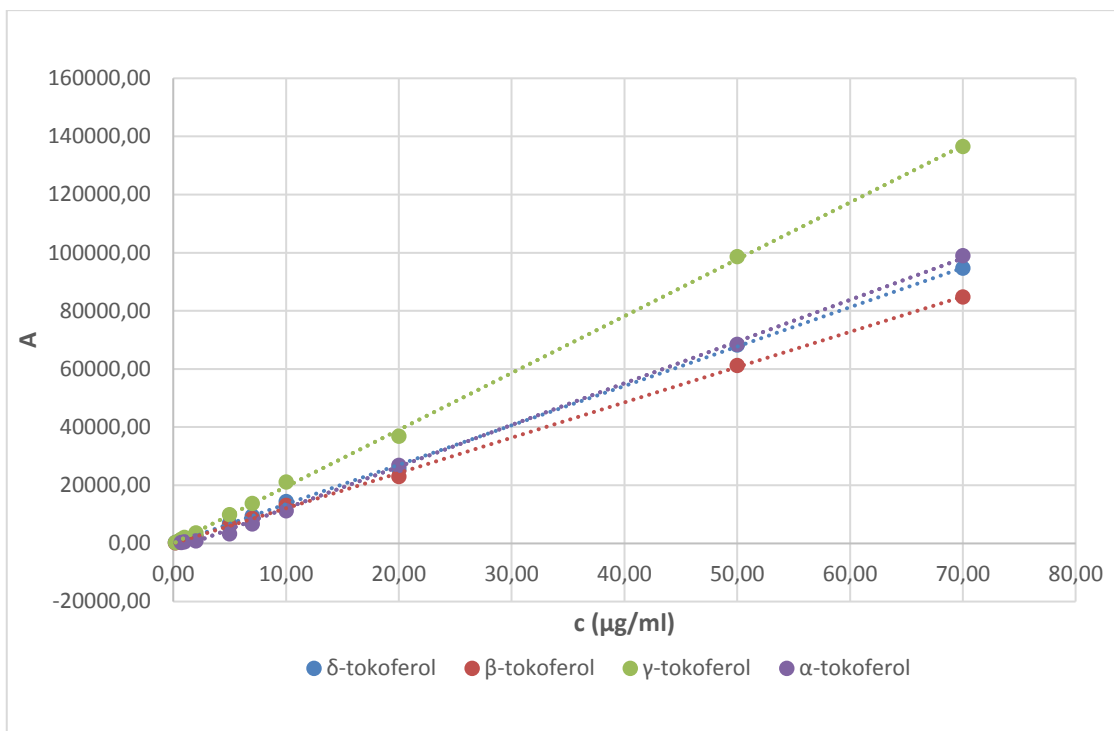
Dôležitým prvkom pri určovaní linearity je koeficient determinácie  $R^2$ , ktorý dosahoval hodnoty min 0,9990 u oboch kalibračných kriviek a tieto hodnoty boli pre nás hlavným ukazovateľom. Takisto bol stanovený dolný limit kvantifikácie (LLOQ). Výsledky sú zhrnuté v tabuľkách (Tabuľka 6 a Tabuľka 7).

Tabuľka 6: Rovnice a koeficient determinácie jednotlivých kalibračných priamok, kalibračné rozmedzie a LLOQ pri PDA detekcii

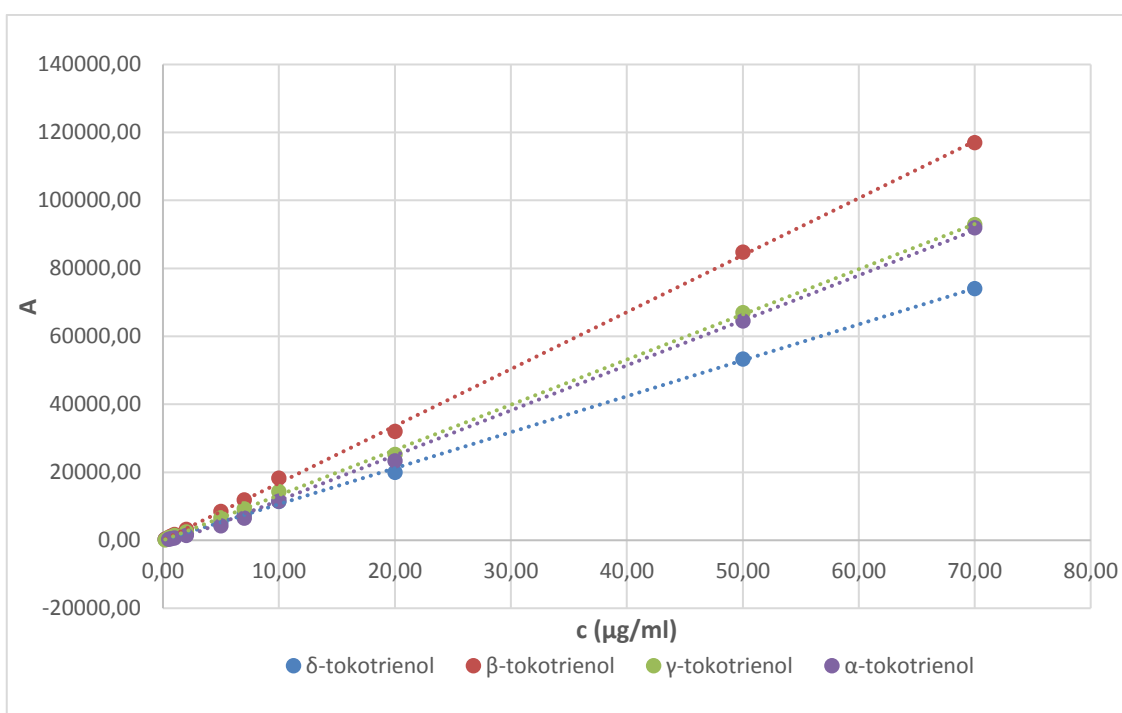
PDA				
derivát	$R^2$	rovnica závislosti	LLOQ	kalibračné rozmedzie
$\alpha$ -T	0,9990	$y=1433,8x-2266,7$	0,7 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\beta$ -T	0,9996	$y=1213,7x-43,344$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\gamma$ -T	0,9996	$y=1955,3x-43,799$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\delta$ -T	0,9997	$y=1354,8x-34,816$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha$ -T3	0,9991	$y=1324,4x-1524,9$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\beta$ -T3	0,9996	$y=1676,3x+68,957$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\gamma$ -T3	0,9997	$y=1329,6x-29,678$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$
$\delta$ -T3	0,9996	$y=1058,1x+44,317$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$

**Tabuľka 7: Rovnice a koeficient determinácie jednotlivých kalibračných priamok, kalibračné rozmedzie a LLOQ pri FLR detekcii**

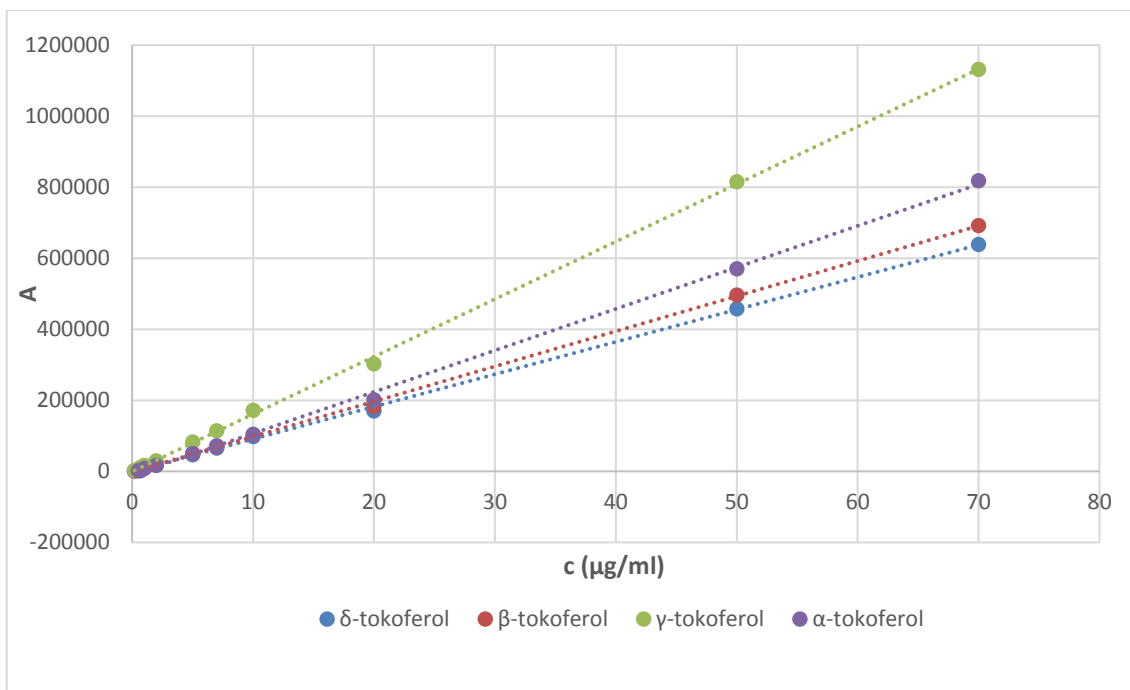
<b>FLR</b>				
<b>derivát</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>rovnica závislosti</b>	<b>LLOQ</b>	<b>kalibračné rozmedzie</b>
<b>α-T</b>	0,9990	y=11691x-10255	0,5 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>β-T</b>	0,9995	y=9890,5x-1244	0,2 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>γ-T</b>	0,9996	y=16194x-1060,6	0,2 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>δ-T</b>	0,9996	y=9114,5x-223,16	0,2 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>α-T3</b>	0,9991	y=15794x-4245,9	0,1 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>β-T3</b>	0,9996	y=18614x+1816,1	0,07 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>γ-T3</b>	0,9996	y=15177x+1034,9	0,07 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml
<b>δ-T3</b>	0,9996	y=11379x+883,01	0,07 µg/ml	0,01 – 100 µg/ml



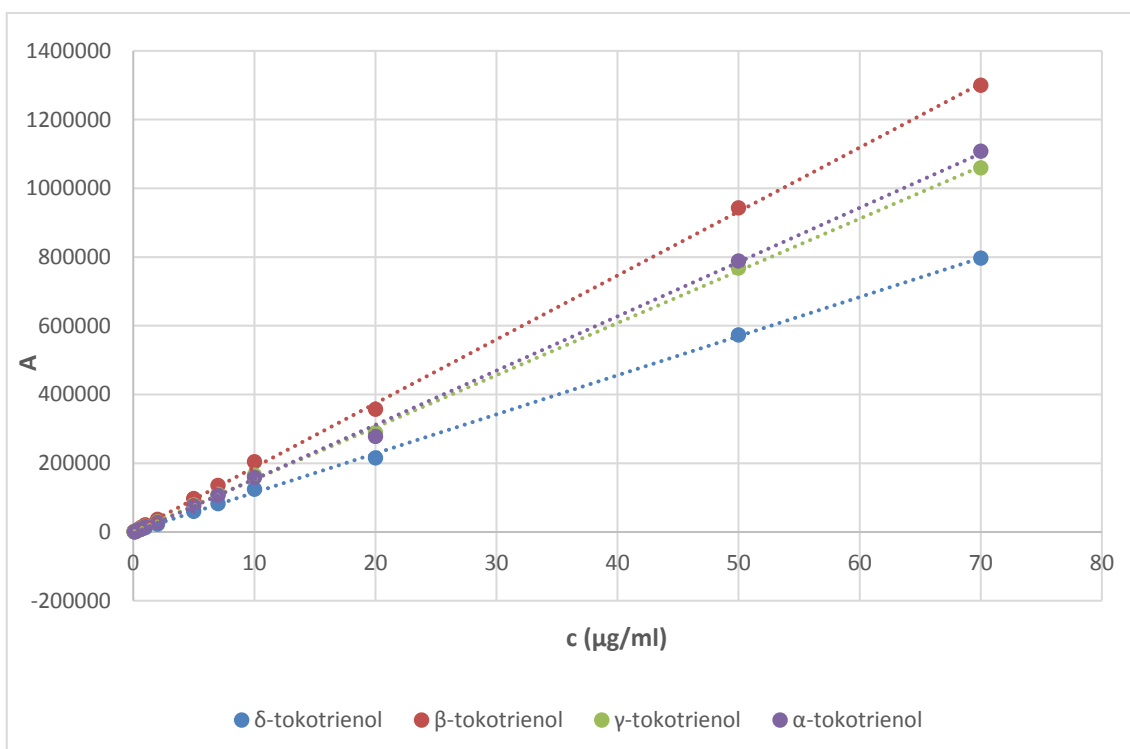
obr. 20: Kalibračné krivky tokoferolov s využitím PDA detekcie



obr. 21: Kalibračné krivky tokotrienolov s využitím PDA detekcie



obr. 22: Kalibračné krivky tokoferolov s využitím FLR detekcie



obr. 23: Kalibračné krivky tokotrienolov s využitím FLR detekcie

## 5.7.2 Presnosť a správnosť metódy

V nasledujúcich tabuľkách (Tabuľka 8, Tabuľka 9, Tabuľka 10) sa nachádza prehľad výsledkov koncentrácií jednotlivých derivátov oproti pripraveným štandardným roztokom v daných koncentračných hladinách (viď kap 4.4.2), čím je overená správnosť vyvinutej metódy. Porovnávanými hodnotami boli priemerné plochy pík, z ktorých bola následne vyrátaná percentuálna koncentrácia. Stanovená relatívna smerodajná odchýlka (RSD) predstavuje validačný parameter presnosť. Ako je možné vidieť v tabuľkách, najvyššie RSD dosahuje  $\alpha$ -T. Hodnoty tohto derivátu pochádzajú zo skúmaného výživového doplnku (kvapiek). Kvapky boli obohatené o štandardné roztoky derivátov T a T3. Ide o metódu prídavku vonkajšieho štandardu.

Ostatné deriváty sa v kvapkách nenachádzali a ich plochy pík pochádzajú z pripravených štandardných roztokov. Dolný limit kvantifikácie (LLOQ) bol stanovený z kalibračnej krivky.

Tabuľka 8: Správnosť a presnosť (RSD) jednotlivých derivátov pri koncentrácii 80% s prídavkom výživového doplnku (kvapky)

		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3
80%	správnosť (%)	125,2	104,7	103,1	105,3	102,9	100,2	99,4	129,3
	presnosť (RSD %)	9,2	3,4	3,4	3,4	1,0	1,3	0,8	14,8

Tabuľka 9: Správnosť a presnosť (RSD) jednotlivých derivátov pri koncentrácii 100% s prídavkom výživového doplnku (kvapky)

		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3
100%	správnosť (%)	112,6	113,3	113,3	114,5	95,8	99,1	99,6	99,1
	presnosť (RSD %)	7,7	2,4	2,4	1,7	8,9	5,1	3,0	7,8



Tabuľka 10: Správnosť a presnosť (RSD) jednotlivých derivátov pri koncentrácii 120% s prídavkom výživového doplnku (kvapky)

	<u><math>\alpha</math>-T</u>	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	
<b>120%</b>	<b>správnosť (%)</b>	<b>134,9</b>	119,8	119,5	120,2	97,2	97,5	96,4	100,5
	<b>presnosť (RSD %)</b>	<b>10,9</b>	1,6	1,5	1,6	1,4	2,1	1,4	3,7

## 6 Záver

Pri vývoji metódy pre separáciu a detekciu derivátov vitamínu E sa podarilo dospieť k nastaveniu a kombinácii vhodných parametrov UHPLC. Bola zohľadnená a vybraná vhodná kolóna Ascentis Express F5 (100 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), pomer a zloženie mobilnej fázy metanol s acetonitrilom (1:1) v pomere s vodou 75:35, jej prietoková rýchlosť 1 ml/min za izokratickej elúcie, čas menej ako 8 min s ohľadom na účinnosť separácie. Metódou bola porovnaná citlivosť PDA a FLR detekcie, pričom FLR vykazovala vyššiu citlivosť vzhľadom k hodnotám LLOQ u niektorých derivátov trikrát. Za týchto podmienok vyvinutej optimálnej metódy došlo k separácii všetkých derivátov vitamínu E. Tieto podmienky boli ďalej použité k validácii metódy, ako je určenie linearitu, správnosti, presnosti.

Linearita bola preukázaná pomocou zostrojenia kalibračných priamok u T a T3 za PDA a FLR detekcie a potvrdená hodnotami koeficienta determinácie ( $R^2 \geq 0,9990$ ).

Správnosť metódy bola overená prídavkom vonkajšieho štandardu. Merané boli koncentrácie liečiva  $\alpha$ -T v kvapkách výživového doplnku. Hodnoty správnosti prekročili povolené odchýlky  $100\% \pm 5\%$  u týchto derivátov:  $\alpha$ -T,  $\delta$ -T3 pri 80% koncentračnej hladine,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -T pri 100% aj 120% koncentračnej hladine.

Presnosť metódy bola overená pomocou relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD). Pri koncentračnej hladine 80% vzorky liečiva hodnota RSD bola 9,2%. Pri 100% koncentračnej hladine liečiva vo vzorke bola RSD 7,7% a u 120% bola RSD 10,9%. Hodnoty RSD pre overenie presnosti metódy majú dosahovať hodnoty  $<5\%$ . Povolená odchýlka bola prekročená aj u derivátov:  $\delta$ -T3 pri 80% a 100% koncentračnej hladine,  $\alpha$ ,  $\beta$ -T3 pri 100% koncentračnej hladine.

Na základe výsledkov presnosti a správnosti, ktoré prekračujú povolené odchýlky, sa dá konštatovať, že pravdepodobne došlo k chybám pri príprave troch koncentrácií vzoriek s liečivom. Napriek tomu podmienky separácie umožňujú dostatočne selektívnu separáciu pre separáciu ôsmich derivátov vitamínu E s vyhovujúcim časom.

## Bibliografie

- [1] R. Brigelius-Flohé, M. G. Traber, „Vitamin E: function and metabolism,“ *The FASEB Journal*, vyd.13, pp. 1145 - 1155, 1999.
- [2] J. Pláteník, „Volné radikály, antioxidanty a stárnutí,“ *Interní medicína*, vyd.11, pp. 30 - 33, 2009.
- [3] J. Frank, N. Grebenstein, „Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver,“ *Journal of Chromatography A*, vyd.1243, pp. 39 - 46, 2012.
- [4] M. Kokindová, E. Šturdík et al., „Zdravotné aspekty hydrofilných a lipofilných vitamínov,“ *Nova Biotechnologica*, pp. 209 - 232, 2004.
- [5] J. Frajdrová, „Vitaminy a jejich funkce v organizmu,“ *Interní medicína pro praxi*, vyd.13, pp. 466 - 468, 2011.
- [6] R. García-Closas, A. Berenguer, M. J. Tormo, J. Sánchez, J. R. Quirós, C. Navarro, R. Arnaud, M. Dorronsoro, M. D. Chirlaque, A. Barricarte, E. Ardanaz, P. Amanio, C. Mertinez, A. Agudo, C. A. González, „Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain,“ *British Journal of Nutrition*, vyd.91, pp. 1005 - 1011, 2004.
- [7] Z. Xu, K. A. Harvey, T. M. Pavlina, G. P. Zaloga, R. A. Siddiqui, „Tocopherol and tocotrienol homologs in parenteral lipid emulsions,“ *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vyd.117, pp. 15 - 22, 2015.
- [8] M.-J. Lee, W. Feng, L. Yang, Y.-K. Chen, E. Chi, A. Liu, C. S. Yang, „Methods for efficient analysis of tocopherols, tocotrienols and their metabolites in animal samples with HPLC-EC,“ *Journal of Food and Drug Analysis*, vyd.1, pp. 318 - 329, 2018.
- [9] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00163>. [Cit. 2018-06-13].
- [10] Český lékopis 2017, Praha, 2017.

- [11] al., P. Zimčák et, Farmaceutická chemie, návody k praktickým cvičením, Praha, 2009, pp. 12 - 13.
- [12] J. Frank, M. Podszun, „Vitamin E-drug interactions: molecular basis and clinical relevance,“ *Nutrition Research Reviews*, vyd.2, pp. 215 - 231, 2014.
- [13] J. Hartl, K. Palát, Farmaceutická chemie I., Praha, 2011, pp.46 - 47.
- [14] P. Górnaś, A. Soliven, D. Segliņa, „Seed oils recovered from industrial fruit by-products are a rich source of tocopherols and tocotrienols: Rapid separation of  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  homologues by RP-HPLC/FLD,“ *European Journal of Lipid Science and Technology*, vyd.6, pp. 773 - 777, 2014.
- [15] B. Shammugasamy, Y. Ramakrishnan, F. Manan, K. Muhammad, „Rapid Reversed-Phase Chromatographic Method for Determination of Eight Vitamin E Isomers and  $\gamma$ -Oryzanol in Rice Bran and Rice Bran Oil,“ *Food Analytical Methods*, vyd.3, pp. 649 - 655, 2015.
- [16] E. D. Tsochatzis, R. Tzimou-Tsitouridou, „Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Whole Grain Barley Using Matrix Solid-Phase Dispersion,“ *Food Analytical Methods*, vyd.2, pp. 392 - 400, 2015.
- [17] Y. Yang, D. Lu, S. Yin, D. Yang, Y. Chen, Y. Li, Ch. Sun, „A convenient ultrasound-assisted saponification for the simultaneous determination of vitamin E isomers in vegetable oil by HPLC with fluorescence detection,“ *Journal of Separation Science*, vyd.8, pp. 1829 - 1838, 2018.
- [18] Y. L. Kua, S. Gan, A. Morris, H. Kiat Ng, „A validated, rapid, simple and economical high-performance liquid-chromatography method to quantify palm tocopherol and tocotrienols,“ *Journal of Food Composition and Analysis*, vyd.53, pp. 22 - 29, 2016.
- [19] A. McMahon, S. Christiansen, L. Shine, C. Loi, D. Dowell, „Simultaneous determination of 13-cis and all-trans vitamin A palmitate (retinyl palmitate), vitamin A acetate (retinyl acetate), and total vitamin E (alpha-tocopherol and DL-alpha-tocopherol acetate) in infant formula and adult nutritional supplements by normal phase HPLC,“ *Journal of AOAC International*, vyd.5, pp. 1073 - 1081, 2011.

- [20] F. Granado-Lorencio, C. Herrero-Barbudo, I. Blanco-Navarro, B. Pérez-Sacristán, „Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D, and individual carotenoids),“ *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vyd.3, pp. 1389 - 1393, 2010.
- [21] E. C. Bell, M. John, R. J. Hughes, T. Pham, „Ultra-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Retinol in Human Plasma,“ *Journal of Chromatographic Science*, vyd.9, pp. 1065 - 1070, 2013.
- [22] L. Zhu, W. Tan, Z. Peng, M. Deng, X. Zhang, G. Yang, „Rapid determination of 15 nutrients in rice by ultra high performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry,“ *Chinese Journal of Chromatography*, vyd.9, pp. 949 - 956, 2017.
- [23] T. Gierlach-Hladon, K. Lange, „High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in inclusion complexes with cyclodextrins,“ *Acta Polonae Pharmaceutica*, vyd.4, pp. 591 - 595, 2012.
- [24] S. el Kurdi, D. A. Muaileq, H. A. Alhazmi, M. al Bratty, S. el Deeb, „Comparing monolithic and fused core HPLC columns for fast chromatographic analysis of fat-soluble vitamins,“ *Acta Pharm.*, vyd.67, pp. 203 - 213, 2017.
- [25] M. W. Dong, K. Zhang, „Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development,“ *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vyd.63, pp. 21 - 30, 2014.
- [26] S. Fekete, J. Schappler, J. V. D. Guillarme, „Current and future trends in UHPLC,“ *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vyd.63, pp. 2 - 13, 2014.
- [27] <http://www.hplc.cz/uplc/index.htm>. [Cit. 2018-08-08].
- [28] L. Nováková, M. Douša et al., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, 2013, pp. 49 - 243.
- [29] <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>. [Cit. 2018-08-09].
- [30] Available: [http://www.hplc.cz/uplc/teorie\\_uplc.html](http://www.hplc.cz/uplc/teorie_uplc.html). [Cit. 2018-08-08].

- [31] <https://www.chromservis.eu/g/uhplc>. [Cit. 2018-08-08].
- [32] [http://www.waters.com/waters/en\\_SK/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=en\\_SK&cid=513206](http://www.waters.com/waters/en_SK/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=en_SK&cid=513206). [Cit. 2018-08-15].
- [33] [http://www.hplc.cz/uplc/sorbent\\_uplc.html](http://www.hplc.cz/uplc/sorbent_uplc.html). [Cit. 2018-08-08].
- [34] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, „Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vyd.87, pp. 105 - 119 , 2014.
- [35] J. Klimeš et al., *Kontrola léčiv I.*, Praha, 2006., pp.
- [36] L. Nováková, H. Vlčková, P. Solich, „Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phase choice when using low ionic-strength mobile phase additives,” *Talanta*, vyd.93, pp. 99 - 105, 2012.
- [37] Y. Liu, N. Grinberg, K.C. Thompson, R.M. Wenslowa, U.D. Neue, „Evaluation of a C18 hybrid stationary phase using,” *Analytica Chimica Acta*, vyd.554, pp. 141 - 151, 2005.
- [38] [http://imchem.fr/assets/files/Waters/XSelect\\_720004178en.pdf](http://imchem.fr/assets/files/Waters/XSelect_720004178en.pdf). [Cit. 2018-08-20].
- [39] D. Šatinský, J. Fibigr, P. Solich, „A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a Silybum marianum extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vyd.134, pp. 203 - 213, 2017.
- [40] F. Gritti, I. Leonardis, D. Shock, P. Stevenson, A. Shalliker, G. Guiochona, „Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18,” *Journal of Chromatography A*, vyd.1217, p. 1589 – 1603, 2010.
- [41] S. A. Schuster, B. E. Boyes, B. M. Wagner, J. J. Kirkland, „Fast High Performance Liquid Chromatography Separations for Proteomic Applications Using Fused-Core® Silica Particles,” *Journal of Chromatography A*, vyd.1228, pp. 232 - 241, 2012.
- [42] F. Gritti, I. Leonardis, J. Abiaa, G. Guiochona, „Physical properties and structure of fine core–shell particles used as packing materials for chromatography

- Relationships between particle characteristics and column performance," *Journal of Chromatography A*, vyd.1217, p. 3819 – 3843, 2010.
- [43] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, „Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vyd.1357, pp. 36 - 52, 2014.
- [44] J.J. DeStefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, „Characteristics of Superficially-Porous Silica Particles for Fast HPLC: Some Performance Comparisons with Sub-2- $\mu\text{m}$  Particles," *Journal of Chromatographic Science*, vyd.46, pp. 254 - 260, 2008.
- [45] L. Nováková, M. Douša et. al, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, Praha, 2013, pp.141 - 155.
- [46] H Rosing, W. Y. Man, E. Doyle, A. Bult, J. H. Beijnen, „Bioanalytical Liquid Chromatographic Method Validation. A Review of Current Practices and Procedures," *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vyd.3, pp. 329 - 354, 2007.