

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

Katedra analytickej chémie

**Vplyv metódy prípravy vzorky na výskyt matricových efektov  
pri UHPSFC-MS analýze vitamínu E**

(DIPLOMOVÁ PRÁCA)

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

Vedúci katedry: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2018

Lucia Vasilisková

## **ABSTRAKT**

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

**Katedra Analytickej chémie**

**Kandidát:** Lucia Vasilisková

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

**Názov diplomovej práce:** Vplyv metódy prípravy vzorky na výskyt matricových efektov pri UHPSFC-MS analýze vitamínu E

Cieľom práce bola optimalizácia chromatografickej metódy na stanovenie 8 rôznych derivátov vitamínu E, ktorá by poskytovala lepšie výsledky analýzy ako dve už existujúce metódy; vysoko rýchlostná (HS) a vysoko rozlišovacia (HR). Testované boli nové stacionárne fázy (SF) Torus (dietylamin, 1-aminoantracén, 2-pikolyamin a diol), za podmienok: CO<sub>2</sub>:MeOH 98:2, prietok 2 ml/min, nástrek 2 µl, teplota kolony 40°C, tlak 12,9 MPa, prídavná kvapalina 0,1% NH<sub>4</sub>OH v metanole. Na 2-PIC kolone boli skúšané modifikátory mobilnej fázy (etanol, isopropanol a zmes acetonitrilu s metanolom v pomere 1:1). Porovnával sa aj vplyv aditív k mobilnej fáze (0,1% NH<sub>4</sub>OH, 10mM mravenčan amónny, 10mM octan amónny a 2% H<sub>2</sub>O). V ďalšej časti práce bola optimalizovaná metóda na úpravu vzorky s cieľom zníženia alebo eliminácie matricových efektov (ME). Testovaná bola metóda riedenia pomocou rozpúšťadiel – H<sub>2</sub>O, 50% acetonitril (ACN) a 75% ACN. Najvhodnejším rozpúšťadlom boli vzorky moču 10, 20, 50 a 100 násobne nariedené a následne analyzované za HS a HR podmienok na stanovenie ME. Druhým spôsobom úpravy vzorky bola extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE). Skúšané boli rozpúšťadla hexan, heptan a dichlormetan v rôznych pomeroch, ktoré boli použité pre extrakciu moču obsahujúcim štandardy vitamínu E o koncentrácií 0,5 µg/ml v pomere 1:1 a 2:1. Na pripravených vzorkách bol skúšaný vplyv dĺžky trepania (5, 10 a 20 minút). Po úprave boli vzorky analyzované za HS podmienok, kde sa pozoroval vplyv matricových efektov na odozvu detektora.

**Kľúčové slová:** vitamín E; tokoferoly; tokotrienoly; SFC; vývoj metódy; optimalizácia; riedenie; LLE; matricové efekty

## **ABSTRACT**

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

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Lucia Vasilisková

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

**Title of Diploma Thesis:** Influence of sample preparation method on occurrence of matrix effects in UHPSFC-MS analysis of vitamin E

The goal of this thesis was to optimize the chromatographic method for the determination of 8 different isomers of vitamin E that would provide better analysis results than two existing methods; high speed (HS) and high resolution (HR). New Torus stationary phases (SP) were tested (diethylamine, 1-aminoanthracene, 2-picolylamine and diol under conditions: CO<sub>2</sub>:MeOH 98:2, flow rate 2 ml/min, injection volume 2 µl, column temperature 40°C, BPR 12.9 MPa, make-up solvent 0.1% NH<sub>4</sub>OH in MeOH. The modifiers (ethanol, isopropanol and a 1:1 mixture of acetonitrile/methanol) were tested on the 2-PIC column. The effect of additives in the mobile phase was also compared (0.1% NH<sub>4</sub>OH, 10mM ammonium formate, 10mM ammonium acetate and 2% H<sub>2</sub>O). The next part of the thesis describes the development of the sample preparation method to reduce or eliminate the matrix effects. Dilution method was tested using solvents - H<sub>2</sub>O, 50% acetonitrile (ACN) and 75% ACN. Urine samples were 10, 20, 50 and 100 times diluted by the most suitable solvent and subsequently analyzed under HS and HR conditions. The second sample preparation method was liquid liquid extraction, where hexane, heptane and dichloromethane were tested in different proportions which were used for extraction of urine containing 0.5 µg/ml vitamin E standards in ratio 1:1 or 2:1. The influence of extraction time (5, 10 and 20 minutes) was tested. After sample preparation samples were analyzed under HS conditions and matrix effects were investigated.

**Key words:** vitamin E; tocopherols; tocotrienols; SFC; method development; optimization; dilution; LLE; matrix effects

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne odcitované. Práca nebola použitá k získaniu iného, alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 15.5.2018

---

Lucia Vasilisková

PodĎakovanie:

Ďakujem doc. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za odborné vedenie diplomovej práce, za všetok venovaný čas a informácie, ktoré mi poskytla a Mgr. Kateřine Plachkej za jej ochotu a pomoc pri spracovaní tejto práce. Taktiež ďakujem pracovníkom Katedry analytickej chémie za pomoc a ochotu pri spracovaní diplomovej práce.

# Obsah

Zoznam skratiek.....	8
1 Úvod.....	11
2 Cieľ práce .....	12
3 Teoretická časť.....	13
3.1 Vitamín E .....	13
3.1.1 Zdroj vitamínu E.....	14
3.1.2 Vitamín E ako antioxidant.....	14
3.1.3 Rozdiely medzi derivátmi.....	14
3.1.4 Transport vitamínu E.....	15
3.1.5 Analýza vitamínu E.....	16
3.2 Príprava vzorky pre analýzu .....	20
3.2.1 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE) .....	20
3.2.2 Extrakcia na tuhú fázu (SPE) .....	20
3.2.3 Deproteinizácia (PP).....	21
3.2.4 Nariedenie vzorky (DS) .....	21
3.3 Superkritická fluidná chromatografia (SFC) .....	22
3.3.1 Vývoj SFC.....	22
3.3.2 Superkritická tekutina.....	24
3.3.3 Mobilné fázy pri SFC .....	25
3.3.4 Stacionárne fázy (SF).....	26
3.3.5 Inštrumentácia SFC .....	28
3.3.5.1 Binárne čerpadlo .....	28
3.3.5.2 Automatický dávkovač .....	29
3.3.5.3 Regulátor spätného tlaku (BPR) .....	29
3.3.5.4 SFC detektory.....	30
3.3.6 Vplyv nástrekového rozpúšťadla na tvar píku v SFC.....	33
3.4 Matricové efekty (ME) .....	34
3.4.1 Hodnotenie matricových efektov .....	35
3.4.1.1 Metóda postextrakčného prídavku .....	35
3.4.1.2 Metóda postkolonovej infúzie.....	36
3.4.1.3 Metóda porovnania smerníc kalibračných kriviek .....	36

3.4.2	Odstránenie matricových efektov .....	37
4	Experimentálna časť .....	39
4.1	Použité chemikálie a prístroje .....	39
4.1.1	Štandardné látky .....	39
4.1.2	Prístrojové vybavenie .....	39
4.1.3	Podmienky UHPSFC separácie .....	40
4.2	Pracovný postup.....	40
4.2.1	Príprava štandardu .....	40
4.2.2	Príprava prídavných kvapalín.....	41
4.2.3	Príprava MF a aditív .....	41
4.2.4	Riedenie moču .....	41
4.2.5	Príprava vzoriek pre LLE.....	42
5	Výsledky a diskusia.....	44
5.1	Vývoj chromatografickej metódy .....	44
5.2	Úprava vzorky pomocou riedenia .....	52
5.2.1	Optimalizácia metódy .....	52
5.2.2	Vplyv riedenia na ME .....	53
5.3	Úprava vzorky pomocou extrakcie z kvapaliny do kvapaliny.....	60
5.3.1	Optimalizácia metódy .....	60
5.3.2	Vplyv LLE na ME .....	64
6	Záver .....	66
7	Použitá literatúra .....	67

## Zoznam skratiek

1-AA	1-aminoantracénová kolona
2-PIC	2-pikolyaminová kolona
ACN	Acetonitril
AmAc	Octan amónny
AmF	Mravenčan amónny
APCI	Chemická ionizácia za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizácia za atmosférického tlaku
BEH 2-EP	Hybridná stacionárna fáza s ethylenovými mostíkmi modifikovaná 2-ethylpyridinom
BPR	Regulátor spätného tlaku
CAD	Detektor nabitého aerosólu
C <sub>p</sub>	Kritický bod
cSFC	Kapilárna superkritická fluidná chromatografia
DCM	Dichlormetan
DEA	Dietylaminová kolona
DIOL	Diolová kolona
DS	Riedenie
ECD	Detektor elektrónového záchytu
ELSD	Odparovací detektor rozptylu svetla
EMA	Európska lieková agentúra
ESI	Ionizácia elektrosprejom
EtOH	Etanol
FID	Plameňo-ionizačný detektor
GC	Plynová chromatografia
HDL	Lipoproteíny s vysokou hustotou
HILIC	Hydrofilná interakčná chromatografia
HP	Heptan
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HR	Vysoko rozlišovacia metóda



HS	Vysoko rýchlostná metóda
HX	Hexan
IPA	Izopropanol
LC	Kvapalinová chromatografia
LDL	Lipoproteíny s nízkou hustotou
LLE	Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny
LLOQ	Hodnota dolnej medze stanoviteľnosti
<i>m/z</i>	Hmotnosť/náboj
ME	Matricový efekt
MeOH	Metanol
MF	Mobilná fáza
MS	Hmotnostná spektrometria
MTBE	Metyl terc-butyleter
NARP	Chromatografia s nevodnou reverznou fázou
NP	Normálne fázy
PFP	Pentafluorfenyl
PP	Zrážanie proteínov
pSFC	Náplňová superkritická fluidná chromatografia
RI	Index lomu
RP	Reverzné fázy
RSD	Relatívna smerodatná odchýlka
SF	Stacionárna fáza
SFC	Superkritická fluidná chromatografia
SPE	Extrakcia na tuhú fázu
STD	Štandard
T	Tokoferol
T <sub>3</sub>	Tokotrienol
TBP	Tokoferol viažuce proteíny
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>p</sub>	Trojný bod
U/V	Napätie/amplitúda

UHPSFC	Ultra-vysokoučinná superkritická fluidná chromatografia
UV/VIS	Ultra-fialovo viditeľné
VLDL	Lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou

## 1 Úvod

Vitamín E patrí medzi vitamíny rozpustné v tukoch. Je považovaný za silný antioxidant, ktorý existuje v ôsmich izomérnych formách. V roku 2016 boli na Katedre analytickej chémie v Hradci Králové pomocou UHPSFC (ultra-vysokoučinná superkritická fluidná chromatografia) vyvinuté dve účinné metódy na stanovenie 8 derivátov vitamínu E v ľudskom sére, ktoré netrvali viac ako 4,5 minúty.

Diplomová práca na tento výskum naväzuje a zaoberá sa optimalizáciou podmienok vyvinutých HS a HR metód na stanovenie tokoferolov a tokotrienolov v moči pomocou UHPSFC, ktoré by poskytli rýchlejšiu a účinnejšiu analýzu ako tieto metódy.

Okrem stanovovaných analytov (tokoferoly a tokotrienoly) sa v moči nachádzajú aj iné látky, ktoré s týmito analytmi môžu koeluovať, vyvolať tak matricové efekty a pri analýze negatívne ovplyvniť odozvu hmotnostného spektrometra. Matricové efekty (ME) dokážu ovplyvniť linearitu, presnosť, správnosť, limit detekcie a kvantifikácie metódy, preto je dôležitý vývoj metódy na úpravu vzorky na elimináciu alebo zmenšenie ME.

Vďaka lipofilnému charakteru a acidobázickým vlastnostiam vitamínu E sa ako vhodná metóda úpravy vzorky javí extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE), pri ktorej prechádzajú analyty z moču do organického nepolárneho rozpúšťadla. Jednoduchou a účinnou metódou je riedenie vzorky, pri ktorom dochádza k nariedeniu nielen analytov, ale aj prítomných interferencií, ktoré by mohli výsledky analýzy ovplyvniť.

## 2 Cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť a optimalizovať efektívnu UHPSFC-MS metódu na analýzu všetkých derivátov vitamínu E, ktorá by poskytovala vyššiu rýchlosť a lepšie výsledky separácie ako metódy vyvinuté v roku 2016. Preto sa testovali novo vyvinuté Torus kolony (dietylamin, 1-aminoantracen, 2-pikolyamin, diol), vplyv zloženia mobilnej fázy (typ a koncentrácia modifikátora) a rôznych aditív na separáciu a odozvu hmotnostného spektrometra.

Druhým krokom bolo optimalizovať metódu na úpravu vzorky moču obsahujúceho T<sub>2</sub> a T<sub>3</sub> vitamínu E. Cieľom metódy riedenia bolo zvoliť vhodné rozpúšťadlo s ohľadom na SFC analýzu a vlastnosti moču. Pri optimalizácii podmienok extrakcie z kvapaliny do kvapaliny bolo potrebné vybrať vhodné rozpúšťadlo, správny pomer rozpúšťadla k moču (1:1 alebo 2:1) a čas trepania pripravenej vzorky (5, 10 a 20 minút).

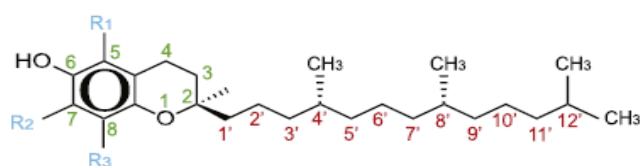
Tretím cieľom bolo hodnotenie matricových efektov na odozvu detektora po úprave vzorky pomocou vopred optimalizovanej metódy riedenia a LLE, následne ich porovnanie pri piatich koncentračných hladinách vitamínu E v moči (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml).

### 3 Teoretická časť

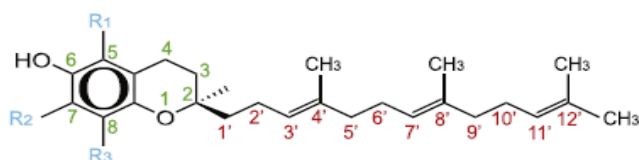
#### 3.1 Vitamín E

Vitamín E patrí medzi vitamíny rozpustné v tukoch, rovnako ako vitamíny A, D, a K. Je známy vďaka svojim antioxidantným účinkom a priaznivým vplyvom na zdravie človeka. Vo svojej čistej forme sa vyskytuje ako žltá viskózna kvapalina (olej), ktorá po vystavení svetlu alebo kyslíku ľahko oxiduje. Vitamín E existuje v ôsmich stereoizomérnych formách:  $\alpha$ -;  $\beta$ -;  $\gamma$ -;  $\delta$ -tokoferol (T) a  $\alpha$ -;  $\beta$ -;  $\gamma$ -;  $\delta$ -tokotrienol (T<sub>3</sub>) (Obr.1). Najviac biologicky aktívny homológ vitamínu E je  $\alpha$ -T [1]. Tokochromanoly (T a T<sub>3</sub>) obsahujú hlavnú skupinu chromanolu a dlhý vedľajší izoprenoidný reťazec. V závislosti od povahy isoprenoidného reťazca možno rozlíšiť T<sub>3</sub> (fitylový reťazec) a T (geranyl geranylový reťazec). Jednotlivé deriváty sa potom líšia v počte a pozícií metylových skupín na chromanolovom jadre [2].

(A)



(B)



Zlúčenina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Molekulárna hmotnosť	logP	pKa
$\alpha$ -tokoferol	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	430,71	10,51	10,80
$\beta$ -tokoferol	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>	416,68	9,99	10,47
$\gamma$ -tokoferol	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	416,68	9,99	10,47
$\delta$ -tokoferol	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	402,65	9,48	10,14
$\alpha$ -tokotrienol	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	424,66	9,23	10,80
$\beta$ -tokotrienol	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>	410,63	8,78	10,47
$\gamma$ -tokotrienol	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	410,63	8,78	10,47
$\delta$ -tokotrienol	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	396,61	8,26	10,14

Obr. 1: Chemická štruktúra tokoferolov (A) a tokotrienolov (B) a fyzikálno-chemické vlastnosti ich derivátov [1] [3].

### 3.1.1 Zdroj vitamínu E

V prírode sa vitamín E nachádza v zelenine, rastlinách alebo rastlinných olejoch. Deriváty  $\alpha$ -tokoferolu možno nájsť v zelených listnatých rastlinách, zatiaľ čo  $\gamma$ -tokoferol je prítomný v nezelených častiach rastlín, ako sú plody a semená. Za potravinové zdroje  $\alpha$ -tokoferolu sa považujú mandle, avokádo, lieskové orechy, arašidy, slnečnicové semiačka;  $\beta$ -tokoferolu oregano a mak;  $\gamma$ -tokoferolu pistácie, sezamové semiačka, vlašské orechy;  $\delta$ -tokoferolu fazuľa a maliny. Potravinové a rastlinné zdroje tokotrienolov sú vzácnejšie; možno ich nájsť v semenách jednoklíčnolistových rastlín alebo v plodoch dvojklíčnolistových rastlín. T<sub>3</sub> ďalej možno získať z obilných zŕn ako je pšenica, ryža, ovos alebo raž. Keďže doplnky vitamínu E obsahujú hlavne deriváty  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -tokoferol acetát), je dôležité kontrolovať hladinu iných T a T<sub>3</sub> v potrave [1] [4].

### 3.1.2 Vitamín E ako antioxidant

Tento vitamín sa považuje za jeden z najsilnejších antioxidantov. Antioxidačný účinok sa pripisuje hydroxylovej skupine aromatického jadra, ktorá poskytuje vodík na neutralizáciu voľných radikálov alebo reaktívnych kyslíkatých zlúčenín. Voľné radikály napádajú bunkovú membránu, výsledkom sú peroxylové radikály a peroxidácia lipidov, ktoré sú zodpovedné za hypercholesterolémiu a kardiovaskulárne choroby. Z toho vyplýva, že vitamín E znižuje hladinu cholesterolu v krvi, má kardioprotektívny a okrem iného aj neuroprotektívny účinok, znižuje agregáciu krvných doštičiek súvisiacu s trombózou a pôsobí ako regulátor enzymatickej aktivity. Nízke hodnoty T a T<sub>3</sub> môžu spôsobiť biliárnu atreziu, cystickú fibrózu a iné. Fyziologické hodnoty vitamínu E v plazme sa pohybujú v rozmedzí 4 - 12  $\mu\text{g/ml}$  [1][3][4].

### 3.1.3 Rozdiely medzi derivátmi

Za biologicky najpodstatnejší derivát je považovaný práve  $\alpha$ -T, a preto sa najčastejšie používa v doplnkoch stravy. Pre optimálnu koncentráciu sa odporúča denný príjem  $\alpha$ -T 15 - 30 mg [5].  $\beta$ -T v porovnaní s  $\alpha$ -T neinhibuje aktivitu proteín kinázy, nemá žiaden vplyv na uvoľňovanie interleukínu IL-1 $\beta$  v monocytoch, ani na aktivitu kaspázy-3.  $\gamma$ -T je vo veľkej miere zastúpený v americkej strave, čo viedlo k mnohým štúdiám na

objasnenie jeho fyziologických a molekulárnych funkcií. Ukázalo sa, že  $\gamma$ -T vykazuje pozitívne účinky proti rakovinovým bunkám in vitro a inhibuje rast rakovinových buniek prostaty [6].  $\alpha$ -T má silnejšie antioxidačné účinky ako  $\gamma$ -T, napriek tomu má  $\gamma$ -T vynikajúce protizápalové účinky [5].  $\delta$ -T môže zabrániť progresii karcinómu prsníka závislého od hormónov, karcinogéze hrubého čreva a vzniku pľúcneho nádoru.  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T poskytujú protizápalové, antineoplastické a natriuretické účinky vďaka špecifickým väzbovým interakciám [6][7]. Nenasýtený bočný reťazec  $T_3$  umožňuje účinnejšiu penetráciu do tkanív ako je mozog alebo pečeň.  $T_3$  v skutočnosti majú také funkcie, ktoré T nevykazujú. Nanomolárne koncentrácie  $\alpha$ - $T_3$  zabraňujú indukovanej neurodegenerácii pomocou mediátorov bunkovej smrti. Orálne podávanie  $T_3$  slúži ako prevencia mŕtvice.  $\delta$ - $T_3$  stimuluje ubikvitinizáciu a degradáciu reductázy a blokuje spracovanie proteínov viažucich sa na regulačné elementy sterolov [7]. Zistilo sa, že  $\gamma$ - $T_3$  má najslubnejšiu protirakovinovú aktivitu. Niektoré štúdie zistili, že jednoduchým orálnym podávaním je ťažké dosiahnuť terapeutické hladiny  $\gamma$ - $T_3$  v krvi a cieľových tkanivách v dôsledku jeho zlej rozpustnosti vo vode, orálnej biodostupnosti a obmedzenej absorpcii [8].

#### **3.1.4 Transport vitamínu E**

Pre vitamín E na rozdiel od ostatných vitamínov rozpustných v tukoch, v plazme neexistuje transportér, a preto je prenášaný pomocou lipoproteínov. Štúdie, ktoré na označenie tokoferolu použili deutérium zistili, že jednotlivé homológy sú uvoľnené z črevných enterocytov do lymfy v chylomikrónoch, ktoré sú následne v obehu katalyzované lipoproteínovou lipázou. Po transporte do pečene je  $\alpha$ -tokoferol včlenený do lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou (VLDL) a je transportovaný do plazmy, kde sa objavuje súčasne v LDL (lipoproteíny s nízkou hustotou) aj HDL (lipoproteíny s vysokou hustotou), zatiaľ čo ostatné izoméry sú vylučované žlčovými kanálmi [9]. Dôvody akumulácie  $\alpha$ -tokoferolu zatiaľ nie sú presne známe, no nedávne štúdie ukázali, že sa jedná o tokoferol viažuce proteíny (TBP), ktoré sa nachádzajú v cytosole pečene [10].

### 3.1.5 Analýza vitamínu E

T a T<sub>3</sub> boli najčastejšie analyzované pomocou HPLC metódy (vysoko účinná kvapalinová chromatografia) so zameraním na analýzu rôznych matríc. HPLC je rýchla, jednoduchá a citlivá metóda, ktorá nahradila plynovú chromatografiu použitú na začiatku 70. rokov. HPLC separácie boli vykonané na reverznej (RP) aj normálnej fáze (NP) s použitím izokratickej elúcie a UV alebo fluorescenčnej detekcie [4][11]. Pri použití normálnych fáz (silikagél) je výsledkom separácia homológov podľa vzrastajúcej polarizácie založenej na metylových substituentoch na chromanovom jadre. Kolony s normálnou fázou poskytujú separáciu všetkých derivátov. NP-HPLC je vhodná na priamu analýzu olejov a tukov [11].

System reverzných fáz poskytuje separáciu na základe saturácie fytylového bočného reťazca. Izoméry, ktoré sú najviac saturované, sú na reverznej fáze dlhšie zadržované. C<sub>18</sub>-RP nedokáže jednoduchým spôsobom separovať β- a γ-T, ale môžu byť separované pomocou polymerickej kolony, ktorá je dnes komerčne dostupná. Použitie reverznej fázy je preferované kvôli kratším časom ekvilibračie a lepšej reprodukovateľnosti [11].

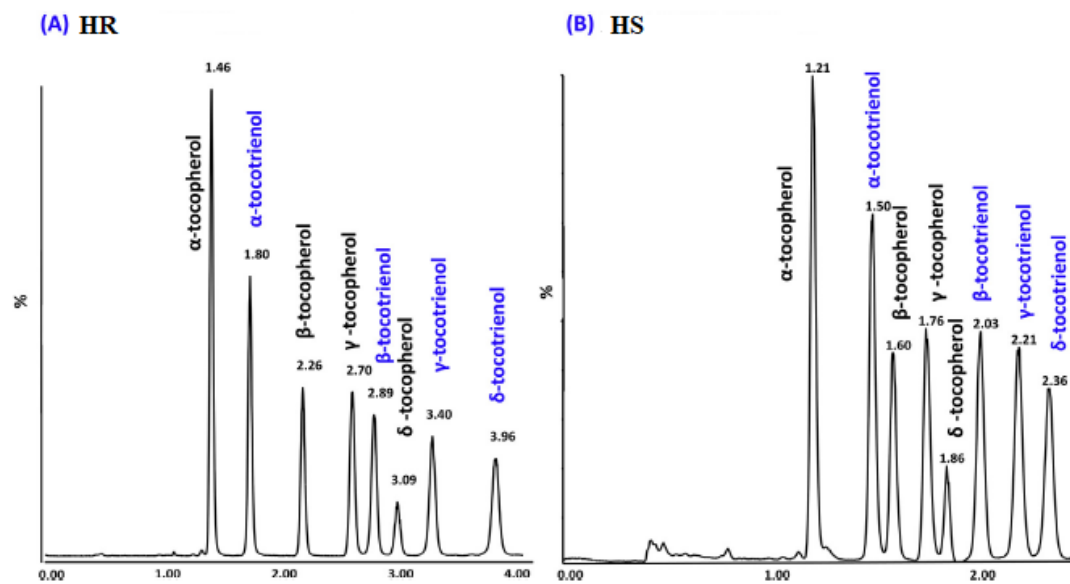
V roku 1993 Snyder a kol. použili SFC-MS (superkritickú fluidnú chromatografiu s hmotnostnou spektrometriou) na analýzu štyroch tokoferolov v rastlinných olejoch pomocou čistého CO<sub>2</sub>. V tom istom čase Yarita so svojím kolektívom zistili, že prídavok metanolu (MeOH) ako modifikátora môže zlepšiť rozlíšenie pre kvantifikáciu tokoferolov. MeOH s prídavkom malého množstva vody stal najpoužívanejšou mobilnou fázou, ktorá bola na kvantifikáciu tokoferolov použitá [11]. Prvá kvantifikácia tokoferolu a tokoferol acetátu s použitím náplňových kolon SFC-UV sa objavila vďaka Buskovi v roku 1999. V roku 2004 bola predstavená kvantifikácia všetkých ôsmich derivátov, ktorej analýza trvala okolo 40 minút [4].

Už v roku 1994 sa Richheimerovi a kol. podarila separácia v RP-LC kritických izomérov β-T a γ-T pomocou pentafluorfenylovej kolony (PFP). Ich metóda však nezahŕňala separáciu T<sub>3</sub> a trvala 20 minút. Nedávno boli vyvinuté PFP fázy s pevným jadrom, ktoré sú dnes komerčne dostupné. Pre úplné oddelenie T a T<sub>3</sub> sa v roku 2012 ako stacionárna fáza použila práve PFP s pevným jadrom a poréznym povrchom, ktorá poskytuje zníženie difúzie analytov cez častice, lepší prenos hmoty, a tým lepšie rozlíšenie pri



nižšom spätnom tlaku. Analýza využívajúca túto kolonu trvala 15 minút a dokázala vyseparovať všetky analyty [19].

V roku 2016 boli v Hradci Králové vyvinuté dve SFC metódy, ktoré umožnili separáciu všetkých izomérov vitamínu E. Vysoko rýchlostná metóda (HS), ktorá trvala len 2,5 minúty a o niečo dlhšia, vysoko rozlišovacia metóda (HR), ktorej dĺžka bola 4,5 minúty. Obe metódy využívajú mobilnú fázu zloženú z CO<sub>2</sub> a metanolu s prídavkom mravenčanu amónneho (AmF) a stacionárnu fázu s ethylénovými mostíkmi modifikovanú 2-ethylpiridinom (BEH 2-EP) (Obr.2) [3].



Obr. 2: Chromatogramy pre vysoko rozlišovacu HR (A) a vysoko rýchlostnú HS (B) UHPSFC-MS metódu [3].

V tab. 1 sú uvedené jednotlivé metódy na separáciu derivátov T a T<sub>3</sub>. Z údajov je jasne vidieť, že prvé vyvinuté metódy neboli schopné separovať všetky existujúce deriváty vitamínu E. Až použitie náplňových kolon SFC (pSFC) dokázalo vyseparovať tieto deriváty a niekoľkonásobne skrátiť čas analýzy oproti predtým používaným kapilárnym SFC (cSFC). Moderné pSFC trvali menej než 10 minút. Zatiaľ najrýchlejšou metódou je vyššie spomínaná HS s časom analýzy 2,5 minúty. Začiatkom roka 2018 bola na kvantifikáciu T a T<sub>3</sub> v pekanových orechoch použitá kvapalinová chromatografia s nevodnou reverznou fázou (NARP), kde boli analyty eluované do 8 minút [3][28][29].

Tab. 1: Metódy stanovenia tokoferolov a tokotrienolov (upravené podľa 3) [28] [29].

Analyt	Vzorka	Príprava vzorky	Separácia	Kolona	Prietok MF	Čas anályzy [min]	Detekcia	Citlivosť [LLOQ]	Rok publikácie
a-T, b-T, g-T, d-T	Roztok štandardu	SFE	Kapilárna SFC	Náplňová kolona so silikagélovými časticami pokrytými polyethylenglykolom (250 x 0,5 mm) SB-Octyl-50 (10 m x 50 µm)	CO <sub>2</sub>	30	FID	-	1999 [12]
a-T, b-T, g-T, d-T, D <sub>3</sub> , triacylglyceroly	Rakytníkový olej, olej z moruše	-	Kapilárna SFC	SB-Octyl-50 (10 m x 50 µm) SB-Cyanopropyl-25 (10 m x 50 µm)	CO <sub>2</sub> 0,37	55	FID, MS	-	1995 [13]
a-T, g-T, d-T, steroly	Sójový olej	Extrakcia zahrievaním	Kapilárna SFC	SP-Octyl-50 (10 m x 50 µm)	CO <sub>2</sub>	35	FID	-	1997 [14]
a-T acetát, a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Sójový olej	Riedenie	SFC	Amine Luna NH <sub>2</sub> (150 x 2,0 mm, 3 µm)	CO <sub>2</sub> :EtOH + 0,1% FA 1,5	5	MSMS	50 pmol	2016 [15]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Roztok štandardu	-	SFC	Acquity UPC <sup>2</sup> BEH (100 x 3,0 mm, 1,7 µm)	CO <sub>2</sub> :MeOH (99,5:0,5) 2,5	5,5	MS-APCI	10,6 mg/l	2015 [16]
Retinol, retinyl acetát, a-T acetát, a-T, g-T, d-T	Olivový, slnečnicový, sójový olej	LLE odparovanie	RP-HPLC	Lichrosorb RP-18 (150 x 4,0 mm, 10 µm)	Hexadecyltrimethylammonium bromid:n-propanol	15	UV (290-330 nm)	0,12 - 0,28 mg/l	2011 [17]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Rastlinné oleje, semená, vajcia, múka	Zmydelňovanie, LLE odparovanie	NP-HPLC	LiChrosorb Si60 (250 x 4,0 mm, 5 µm)	Hexan:isopropanol:kyselina octová (98,9:0,6:0,5) 1	25	FLD	105 - 335 ngm/l	2011 [18]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Ľudská plazma, pečeneňové tkanivo	Zmydelňovanie, LLE odparovanie	RP-HPLC	Phenomenex Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 µm)	MeOH:H <sub>2</sub> O (85:15) 0,8	15	FLD	92 - 519 pg	2012 [19]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Rastlinné vzorky	Zmydelňovanie, LLE odparovanie	RP-HPLC	Kinetex PFP (150 x 3 mm, 2,6 µm); Develosil RP Aqueous 30 (150 x 3 mm, 3 µm)	MeOH:H <sub>2</sub> O:Metylbutyleter 0,3; 0,5	45; 63	FLD	-	2015 [20]

Tab.1: pokračovanie.

Analyt	Vzorka	Príprava vzorky	Separácia	Kolona	Prietok MF	Čas analýzy [min]	Detekcia	Cistlivosť [LLOQ]	Rok publikácie
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Ovocie, zelenina	PLE, DLLME odparovanie	RP-HPLC	Ascentis Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	MeOH:H <sub>2</sub> O (85:15) 1	17	FLC MS-APCI [M-H] <sup>+</sup>	1 - 5 ng/ml	2014 [21]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Obilniny	Zmydelňovanie, DLLME	RP-HPLC	Cosmosil π-NAP (250 x 4,6 mm, 5 µm)	H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN (13:80:7) 1	30	FLD	0,05 - 0,30 µg/ml	2013 [22]
a-T, g-T, d-T, retinol acetát	Kojenecká výživa na báze mlieka	LLE	NP-HPLC	Pinnacle II silica (50 x 21 mm, 3 µm)	0,5% ethyl acetát:hexan 0,4	25	DAD	1,8 - 73,7 µg/ml	2006 [23]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub> , g-oryzanol	Ryža	LLE	NP-HPLC	Inertsil CN-3, SIL-100A (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Hexan:isopropanol: etylacetát: kyselina octová (97,6:0,8:0,8:0,8) 0,7-1,5	25	FLD	0,05 - 0,5 µg/ml	2011 [24]
a-T, g-T, retinol	Ľudská plazma	LLE odparovanie	RP-HPLC	Waters Symmetry C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm)	MeOH 1,8	4	UV, FLD	0,03 - 0,32 mg/l	2014 [25]
a-T, a-T-d <sub>6</sub>	Ľudská plazma	PP, LLE odparovanie	NP-HPLC	EC Nukleosil (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Hexan:isopropanol 1	45	UV	83 pmol/ml	2003 [26]
a-T, a-T acetát, d-T, retinol, cholekalciferol, fylochinon, menachinon, xantofyl	Sérum ľudskej krvi	SPE odparovanie	RP-HPLC	Phenomenex Luna C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	ACN:MeOH 1,3	20	UV	0,1 - 1 µg/ml	2004 [27]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Roztok štandardu	PP, LLE	SFC	Acquity UPC <sup>2</sup> BEH 2-EP (3,0 x 100 mm, 1,7 µm)	CO <sub>2</sub> :MeOH (98:2) + 10mM AmF 1,5	4,5	MS-ESI	0,01 - 10 mg/ml	2016 [3]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Roztok štandardu	PP, LLE	SFC	Acquity UPC <sup>2</sup> BEH 2-EP (3,0 x 100 mm, 1,7 µm)	CO <sub>2</sub> :MeOH (95:5) + 10mM AmF 1,5	2,5	MS-ESI	0,05 - 10 mg/ml	2016 [3]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub>	Pekanové orechy	Zmydelňovanie	NARP	ProntoSIL C <sub>30</sub> column (4,6 x 250 mm, 3 µm)	MeOH:ACN (95:5) 1,0	16	MS-APCI	0,03 - 10 µg/100 mg	2018 [28]
a-T, b-T, g-T, d-T, a-T <sub>3</sub> , b-T <sub>3</sub> , g-T <sub>3</sub> , d-T <sub>3</sub> , a-tocomonoenol	Palmový olej	Riedenie	NP-HPLC	Agilent Zorbax Polaris Silica (4,6 x 150 mm, 3 µm)	n-heptan:etylacetat (93:7) 2,0	15	PAD	0,1 - 1,0 mg/ml	2017 [29]

## **3.2 Príprava vzorky pre analýzu**

Pre analýzu vzoriek je ich príprava pracovne aj časovo veľmi náročná, často vyžaduje použitie veľkého množstva vzorky a organického rozpúšťadla a môže ovplyvniť presnosť celej analýzy, keďže práve príprava vzoriek je náchylná ku chybe. Účinná príprava vzorky by mala minimalizovať jej stratu, viesť k vysokému výťažku cieľových zlúčenín a odstrániť nežiaduce látky z danej vzorky. Ideálna metóda prípravy vzorky by mala byť rýchla a jednoduchá [30].

### **3.2.1 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE)**

LLE bola jednou z prvých techník úpravy vzorky a aj naďalej sa používa na analýzu biologických vzoriek. LLE je založená na prechode analytu z vodnej fázy do rozpúšťadla s vodou nemiesiteľného [31]. Medzi vhodné organické rozpúšťadla pre LLE patrí cyklohexan, n-heptan, dichlormetan (DCM), chloroform, n-pentan, toluen, a.i. Organická a vodná fáza je najskôr pretrepaná, následne je vložená do centrifugy, rotačného zariadenia, ktoré vplyvom odstredivej sily rozdelí vzorku na dve frakcie. Organická frakcia je odpipetovaná do vialky a vložená do analyzačného zariadenia [32]. Táto metóda je často využívaná pri analýze moču, krvi alebo iných telesných tekutín. Výhodou LLE je potreba jednoduchého laboratórneho vybavenia a fakt, že sa jedná o relatívne univerzálnu metódu. Za nevýhodu sa považuje jej nevhodnosť pre hydrofilné zlúčeniny, vysoká spotreba rozpúšťadla, možnosť tvorby emulzií a časová náročnosť [30][31].

### **3.2.2 Extrakcia na tuhú fázu (SPE)**

SPE patrí medzi najpoužívanejšie metódy prípravy vzorky v rutinných bio analytických laboratóriách. Pozitívom je potreba menšieho množstva organického rozpúšťadla v porovnaní s LLE, väčšia možnosť automatizácie, jednoduchá prevádzkovateľnosť, vysoká výťažnosť a možnosť zakoncentrovania vzorky. Nevýhodou je časová náročnosť a vysoká cena koloniiek, ktoré sú určené na jedno použitie. V SPE sa analyzované vzorky rozdeľujú medzi pevnú a kvapalnú fázu. Analyt je zachytený na sorbente, zatiaľ čo balasty matrice sú vymyté von (alebo naopak). Retencia zahŕňa polárne, nepolárne alebo ionické interakcie [31][32]. Táto technika sa predovšetkým používa na prípravu

kvapalných vzoriek a extraktov z polo prchavých alebo neprchavých analytov a tiež na prípravu pevných látok predbežne extrahovaných do rozpúšťadla. Výber sorbentu závisí na fyzikálne chemických vlastnostiach analytov. Výsledky tiež závisia od druhu matrice a jej interakcií jak so sorbentom, tak s analytmi [31]. SPE proces pozostáva zo štyroch krokov: (1) aktivácia sorbentu (premytie organickým rozpúšťadlom), (2) nanosenie vzorky, (3) vymytie balastov pomocou vody alebo pufri, (4) elúcia analytov (premytie organickým rozpúšťadlom s vyššou elučnou silou) [30].

### **3.2.3 Deproteinizácia (PP)**

Biologické matrice (sérum a plazma) sú komplexné zmesi obsahujúce početné endogénne zložky, ako sú proteíny, soli alebo lipidy, ktoré môžu interferovať s analytmi počas ich separácie a detekcie. Z týchto interferencií môžu byť proteíny prítomné v plazme alebo v sére nevratne adsorbované na chromatografický nosič, čo spôsobuje zhoršenie účinnosti separácie a rýchle upchávanie kolony. Na odstránenie proteínov z biologických vzoriek sa používa prídavok činidla. PP je založená na rozdielnej rozpustnosti endogénnych proteínov a cieľových analytov [33][31]. Prídanie precipitačného činidla k biologickej vzorke spôsobuje denaturáciu proteínov, analyty sa rozpúšťajú v kvapalnej fáze a sú oddelené od proteínov. Precipitačné činidlá môžu byť organické rozpúšťadla (acetonitril, MeOH, etanol, acetón), kyseliny (chloristá, trichloroctová, fosforečná) alebo koncentrované soli. Bežne používané pomery vzorky k rozpúšťadlu sú 1:1, 1:2, 1:4 a 1:5. Organické rozpúšťadla môžu odstrániť až 95% plazmatických proteínov [34]. Extrakt, supernatant nie je úplne čistý a môže obsahovať značné množstvo nevyzrážaných komponentov matrice. Za ďalšiu nevýhodu sa považuje nutnosť centrifugácie pre oddelenie fáz, nízka selektivita, ktorá môže indukovať potlačenie MS signálu. Výhodou PP je jednoduchosť, rýchlosť, potreba jednoduchého zariadenia a možnosť rýchlej optimalizácie [31].

### **3.2.4 Nariedenie vzorky (DS)**

Nariedenie vzorky vhodným vodným roztokom obvykle v pomere 1:1 – 1:200 je jednoduché, lacné a rýchle. Jedná sa o možnosť riedenia vzoriek do rozmedzia validovanej kalibračnej krivky tak, aby mohli byť kvantifikované. Tento spôsob úpravy vzorky je využívaný najmä u vzoriek s nízkou koncentráciou proteínov (moč).

Hlavným negatívom je nízka selektivita [32]. Riedenie znižuje jak obsah analyzovanej látky, tak celkový obsah látok, ktoré sú v hodnotenej vzorke obsiahnuté, čím sa znižuje nielen počet molekúl, ktoré podliehajú ionizácií, ale aj látok, ktoré môžu ionizáciu analytu ovplyvniť. Stupeň zriedenia je obmedzený citlivosťou metódy a závisí na type matrice [35].

### **3.3 Superkritická fluidná chromatografia (SFC)**

SFC je separačná metóda, využívajúca superkritickú tekutinu ako mobilnú fázu (MF) [36]. Dnes už tento názov nie je úplne presný, pretože MF nie je vždy v superkritickom stave [37]. Bola vyvinutá na rozšírenie schopností plynovej chromatografie (GC) v snahe analyzovať ťažšie zlúčeniny, ktoré pre elúciu vyžadovali vysoké teploty, ale nedokázali im odolávať bez tepelného rozkladu. Najužitočnejším objavom v SFC bola miesiteľnosť CO<sub>2</sub> s kvapalnými organickými rozpúšťadlami [38]. Ako hlavná zložka MF sa používa superkritický CO<sub>2</sub>, ktorý je netoxický a nepolárny, vďaka čomu sú pomocou SFC dobre separovateľné menej polárne zlúčeniny ako karotenoidy, tokoferoly a lipidové zlúčeniny. Polárnejšie zlúčeniny boli separované vďaka malému prídavku organického modifikátora [36]. Pri prvom použití tekutiny v superkritickom stave, po stlačení a zahriatí vykazovali niektoré látky osobitné správanie ako chromatografické eluenty. Viskozita a difuzivita takýchto tekutín je blízka plynu, čo vedie k vyššej účinnosti separácie pri vysokej rýchlosti MF a zachovaní nízkeho tlaku. Hustota a solvatačná schopnosť sú podobné kvapaline, poskytujú dobrú rozpustnosť a rýchly transport analytov [37]. Ako stacionárna fáza (SF) sa v súčasnosti využíva čistý silikagél alebo silikagél viazaný s rôznymi ligandmi [36].

#### **3.3.1 Vývoj SFC**

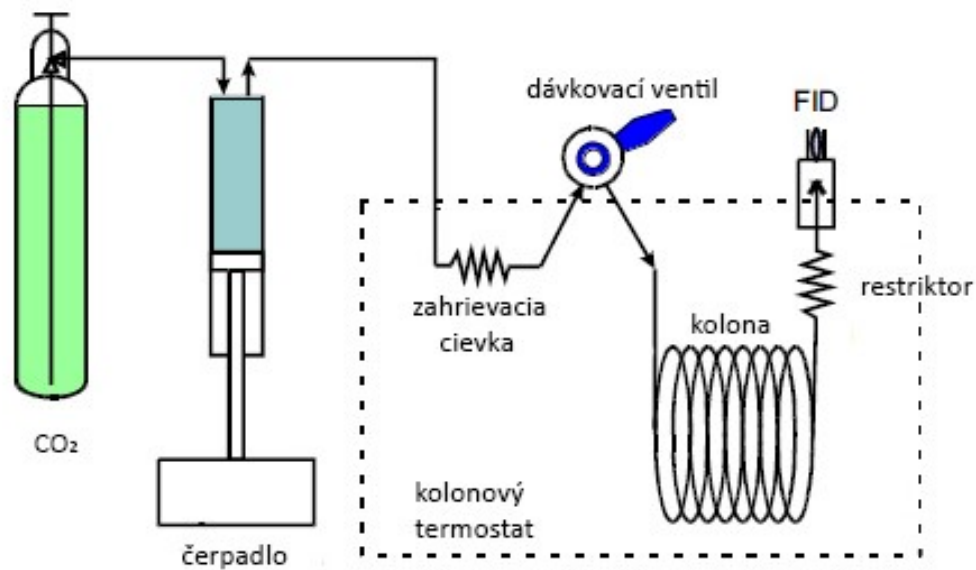
Prvýkrát sa správa o SFC objavila v roku 1962 v časopise Journal of Organic Chemistry. Za zakladateľa SFC sa považuje Klesper a kol., ktorí popísali separáciu termolabilných porfyrínových derivátov použitím superkritického chlorfluormetánu pri tlakoch do 140 barov a pri teplotách 150-170°C. Táto metóda sa v nasledujúcich rokoch vyvíjala teoreticky aj experimentálne. Sie a kol. v roku 1966 a 1967 vyvinuli sofistikovaný pneumaticky riadený dávkovač na nastrekovanie vzorky za vysokotlakových a vysokoteplotných podmienok [39].

V roku 1968 Klesper so svojimi kolegami predstavili nový SFC systém, ktorý vybavili mechanickým regulátorom kontrolujúcim tlak nezávisle na prietoku. Ako detektor použili fotometer s vysokotlakovou prietokovou celou. O rok neskôr Giddings vo svojom článku uviedol, že jednou z najzaujímavejších vlastností ultra-vysokotlakovej plynovej chromatografie je jej konvergencia s klasickou kvapalinovou chromatografiou (LC), zmienil sa o tom, že hustota kvapaliny je 1000x väčšia ako je hustota plynu. Napriek tomu sa pri použití vysokého tlaku častice plynu k sebe navzájom priťahujú podobnými silami ako sú sily v kvapaline [39].

V roku 1981 Novotny a Lee predstavili kapilárnu kolonu. Typická kolona bola z oxidu kremičitého o vnútornom priemere 50  $\mu\text{m}$  a vnútorná stena bola potiahnutá polymérom, napr. dimetylpolysiloxanom, ktorý fungoval ako stacionárna fáza [39][40]. Neskôr si firma Lee Scientific dala patentovať cSFC systém, ktorý pozostával z čerpadla, dávkovacieho ventilu, kolonového termostatu, kapilárnej kolony, fixného restriktora a plameňo-ionizačného detektora (FID) (Obr. 3). Pri cSFC sa tlak nemôže meniť nezávisle od rýchlosti prietoku v dôsledku obmedzenia fixného restriktora. Navyše štandardný FID nebol použiteľný s prídavkom organického modifikátora [39].

V 80. rokoch Novotny a kol. skúmali retenciu náplňových kolon za rôznych podmienok, pri ktorej zistili, že tieto kolony neposkytujú dostatočnú účinnosť a linearitu prietoku, pretože tlak sa pri prechode kolonou postupne znižuje. Tieto kolony boli vyvinuté takmer nezávisle od kapilárnej kolony. V roku 1982 Gere a kol. modifikovali HPLC systém, aby pracoval ako SFC pridaním regulátora tlaku a ďalších zariadení. Ukázalo sa, že SFC poskytuje vyššiu účinnosť pri použití kolon s veľkosťou častíc 3, 5 a 10  $\mu\text{m}$ , najmä pri vysokej rýchlosti prietoku [39]. pSFC sa stala všestrannou technikou, vďaka ktorej je možné dosiahnuť vysokú účinnosť a separáciu vysoko polárnych zlúčenín [41].

V tom istom čase Okamoto a kol. vyvinuli vysoko účinné a všestranné chirálne stacionárne fázy. V roku 1985 Mourier a kol. predstavili chirálnu separáciu fosfínových oxidov pomocou superkritického a subkritického  $\text{CO}_2$ . V 90. a 20. rokoch 20. storočia sa vďaka pokrokom na chirálnej stacionárnej fáze stala chirálna separácia najdôležitejšou a najpoužívanejšou metódou v SFC [39].

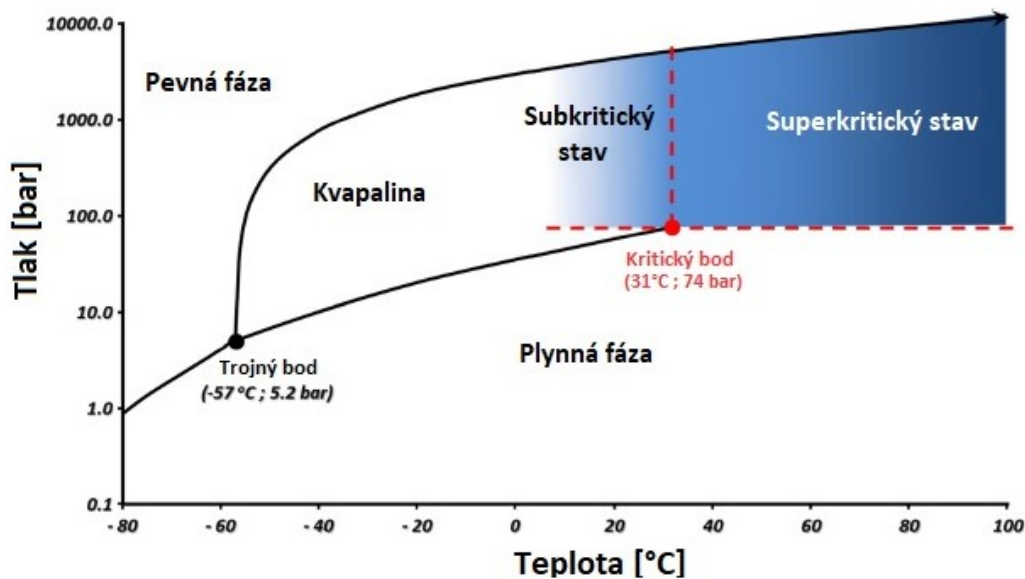


Obr. 3: Schematické znázornenie SFC, ktoré vychádza z GC. Keďže rýchlosť prietoku je pomalá, používa sa injekčné čerpadlo. Stály spätný tlak systému je udržiavaný pomocou restriktora, ktorý vykazuje tokový odpor. Reguláciu tlaku zabezpečuje zmena prietokovej rýchlosti. Obrázok upravený podľa [39]

### 3.3.2 Superkritická tekutina

Superkritický stav je stav tekutiny, ktorý vzniká, ak je látka vystavená vyššej teplote a tlaku ako je jej kritická teplota a kritický tlak. Nadkritickosť bola objavená de la Tourom v roku 1822, zatiaľ čo rozpúšťacia sila superkritickej tekutiny bola rozpoznaná Hannayom a Hogarthom až v roku 1879. Definícia superkritického stavu je založená na P-T diagrame, ktorý zobrazuje rovnovážne správanie plynnej a kvapalnej fázy zlučiny (Obr. 4). Táto rovnovážna krivka existuje medzi trojným bodom ( $T_p$ ), kde sú tri fázy; pevná, kvapalná a plynná v rovnováhe a kritickým bodom ( $C_p$ ). V  $C_p$  je hustota plynu a kvapaliny rovnaká, superkritická tekutina bude existovať pri vyššej teplote a tlaku. Pri teplote a tlaku pod ich kritické hodnoty sa tekutina nachádza v tzv. subkritickom stave. Ostatné dva kvadranty P-T diagramu nemajú definovaný názov. Tekutina pri vyšších tlakoch ako je kritický tlak, ale pri teplotách nižších, ako je kritická teplota, by sa mohla nazývať kvapalina s vysokou hustotou a kvapalina pri tlakoch nižších, ako je kritický tlak, ale pri teplote vyššej ako je kritická teplota by mohla byť vysokoteplotným plynom, ale táto nomenklatúra nie je kodifikovaná [42].





Obr. 4: Fázový diagram oxidu uhličitého [43].

Ako superkritické tekutiny sa používali jednoduché uhľovodíky,  $N_2O$ , amoniak a chlorfluorované uhľovodíky, ktoré neboli vhodné pre analýzu termolabilných zlúčenín a ich aplikácia viedla k hardvérovým poškodeniam a znečisťovaniu životného prostredia. Preto sa dnes najčastejšie používa inertný, nehorľavý, lacný, netoxický a bezpečnejší  $CO_2$  [39]. Jeho hlavnou výhodou oproti ostatným kvapalinám sú nízke hodnoty kritického bodu ( $31^\circ C$ , 71 bar), ktoré sa dajú ľahko dosiahnuť použitím bežných chromatografických metód [43]. Kvapalný oxid uhličitý sa vyznačuje nízkou viskozitou a vysokou difuzivitou, dipólový moment oxidu uhličitého je nulový, za superkritických podmienok však vykazuje nepolárne vlastnosti. Polarita  $CO_2$  je podobná polarite hexanu [37][43].

### 3.3.3 Mobilné fázy pri SFC

Hlavnou zložkou MF je oxid uhličitý, ktorý je príliš nepolárny na elúciu polárnych zlúčenín, ako látok, ktoré sú donormi a/alebo akceptormi vodíka a môžu silne interagovať s polárnou stacionárnou fázou. Pre zvýšenie rozpúšťacej sily  $CO_2$  je nevyhnutný prídavok polárneho organického rozpúšťadla (modifikátora) [37][43]. Stlačený oxid uhličitý je miesiteľný s bežne používanými organickými rozpúšťadlami a po ich zmiešaní dochádza k zmene kritického bodu  $CO_2$ , čím sa mobilná fáza dostáva

do subkritického stavu. Vďaka kontinuite medzi vlastnosťami superkritických a subkritických kvapalín, ostávajú všetky výhody chromatografickej separácie nezmenené [37].

Výber modifikátora závisí od jeho elučnej sily, selektivity, účinnosti a od tvaru píku. Zlý tvar píku sa pripisuje akceptorom vodíka, voľným silanolom na povrchu SF, čo je hlavný dôvod prečo sú ako modifikátory preferované donory vodíka (alkoholy). Z alkoholov sa najčastejšie používa metanol, ktorý má najväčšiu elučnú silu, účinnosť aj polaritu a zároveň nízku viskozitu a bod varu. Acetonitril (ACN) sa kvôli slabej účinnosti s farmaceutickými zlúčeninami používa v SFC len veľmi málo. Riešením na zlepšenie selektivity je zmiešanie MeOH a ACN ako organického modifikátora [37].

Účinok samotného organického modifikátora je zvyčajne nedostačujúci na prekonanie vplyvu reziduálnych silanolových skupín a/alebo na umožnenie elúcie veľmi polárnych alebo zásaditých zlúčenín. Preto sa pri analýze používa aditívum do mobilnej fázy, ktorého úlohou je pokrytie aktívnych miest stacionárnej fázy a zmena polarita MF [43]. Pri analýze organických kyselín by mali byť použité kyslé aditíva (kyselina mravčia, kyselina octová, kyselina citrónová), zatiaľ čo pri analýze bázičných látok sa používajú aditíva bázičné (isopropylamin, dietylamín, trietylamín). Najnovším trendom je použitie prchavých aditív, ako je hydroxid amónny, octan amónny alebo mravenčan amónny. Ako aditívum možno použiť aj vodu. Voda nie je úplne rozpustná v CO<sub>2</sub>, ale môže byť zmiešaná v primeranom pomere (1-5%) s mobilnou fázou CO<sub>2</sub>-MeOH na zlepšenie tvaru píkov [37][43].

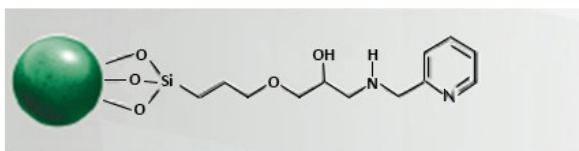
#### **3.3.4 Stacionárne fázy (SF)**

Stacionárne fázy pre pSFC, ako aj HPLC možno rozdeliť na chirálne a achirálné. Zatiaľ čo v LC sú potrebné rôzne chromatografické módy: chromatografia na normálnej fáze (NP-LC), chromatografia na reverznej fáze (RP-LC), HILIC (hydrofilná interakčná chromatografia) a iné, v SFC môže byť veľké množstvo zlúčenín rôznej polarita analyzované použitím mobilnej fázy založenej na CO<sub>2</sub> v kombinácií s rozličnými stacionárnymi fázami, jak polárnymi, tak nepolárnymi [38][43]. Dnes je pre analýzu SFC dostupné veľké množstvo kolon, len veľmi málo z nich bolo vyrobených zámerne pre

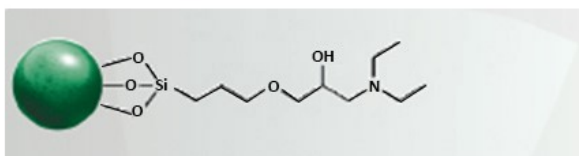
SFC. [37]. Prakticky všetky stacionárne fázy použité pri HPLC môžu byť použité aj pri SFC [43].

V roku 2001 bola pre SFC špeciálne navrhnutá prvá kolona, ktorá sa skladala z 2-etylpyridinovej stacionárnej fázy naviazanej na silikagel a bola úspešne použitá na analýzu bežných zlúčenín bez prídavku aditív. Tento postup neskôr nasledovali aj iné firmy pri vývoji stacionárnej fázy. Boli vyvinuté ďalšie stacionárne fázy: 4-etylpyridin, pyridinamid, propylacetamid a.i. (Princeton), amino fenyl, pyridil amid a.i. (ES Industries). Spoločnosť Waters predstavila špecifické SF pre achirálnu analýzu, Torus kolony (dietylamin, 1-aminoantracen, 2-pikolyamin, diol) (Obr. 5) [38][44]. Vďaka dvom OH skupinám možno za najpolárnejšiu SF považovať diolovú (DIOL), o niečo menšiu polaritu vykazuje dietylaminová kolona (DEA). Menej polárne SF sú 2-pikolyaminová (2-PIC) a najmenej 1-aminoantracenová (1-AA) pre svoj vyšší počet uhlíkov [45]. Kolony používané na začiatku vývoja SFC boli plnené časticami o veľkosti 5  $\mu\text{m}$ . Úsilie o zlepšenie účinnosti moderných kolon a zrýchlenie analýzy viedlo k vývoju kolon so sub-2  $\mu\text{m}$  časticami alebo povrchovo poréznymi časticami. Pokročilá moderná verzia SFC využívajúca tieto kolony sa nazýva ultra-vysokoúčinná superkritická fluidná chromatografia (UHPSFC) [38][42][43].

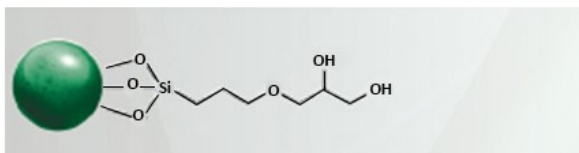
Torus 2-PIC 1,7  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$   
2-Pikolyamin



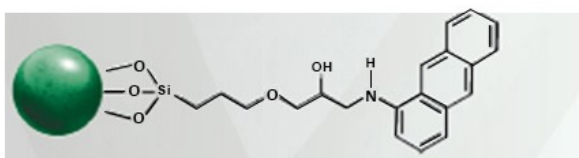
Torus DEA 1,7  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$   
Diethylamin



Torus DIOL 1,7  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$   
Diol



Torus 1-AA 1,7  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$   
1-Aminoantracen



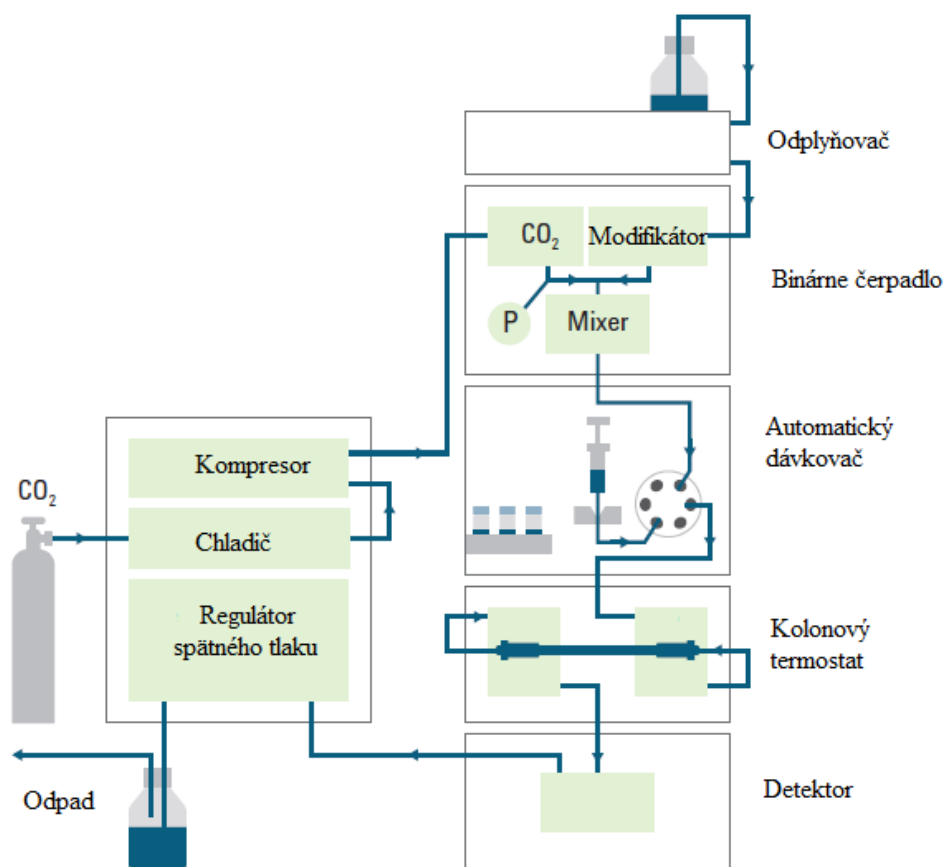
Obr. 5: Chemická štruktúra Torus kolon [45].

### 3.3.5 Inštrumentácia SFC

Moderná SFC inštrumentácia je podobná HPLC inštrumentácií. Komponenty, z ktorých sa SFC skladá zahŕňajú: odplyňovač, binárne čerpadlo, automatický dávkovač, kolonový termostat, detektor a regulátor spätného tlaku (Obr. 6) [46].

#### 3.3.5.1 Binárne čerpadlo

Binárne čerpadlo slúži na čerpanie CO<sub>2</sub> z ocelevej bomby a organických modifikátorov zo sklenených fliaš. Tieto čerpadlá majú za úlohu regulovať objemový prietok a zloženie mobilnej fázy. V bombe, v ktorej sa nachádza CO<sub>2</sub>, je tlak 55 barov pri teplote 20°C. Akékoľvek zvýšenie teploty alebo zníženie tlaku CO<sub>2</sub> po opustení bomby vedie k odparovaniu kvapaliny, čo môže spôsobiť kavitáciu a následne zastavenie prietoku. Na udržanie oxidu uhličitého v kvapalnom stave je hlava čerpadla chladená na 2 - 5°C [47].



Obr. 6: Príklad schematickeho zobrazenia SFC systému [48].

### 3.3.5.2 Automatický dávkovač

Rozdiel medzi automatickým dávkovačom u HPLC a SFC je spojený s charakterom mobilnej fázy, ktorá je v SFC vysoko stlačená. Krokový motor v SFC slúži na naplnenie ihly a dávkovacej slučky vzorkou z vialky na požadovaný objem vďaka jeho schopnosti ovládať piest injekčnej striekačky dávkovača. Keď je injekčný ventil v nástrekovej polohe, striekačka, hadička a ihla sú naplnené vysoko stlačenou mobilnou fázou. Aby sa z ihly odstránili prípadné zvyšky a zabránilo sa tak kontaminácií vzorky, používa sa silné rozpúšťadlo na oplach ihly, potom nasleduje oplach ihly slabým rozpúšťadlom, aby sa zabránilo zhoršeniu tvaru píku. Po návrate injekčného ventilu späť do plniacej polohy je mobilná fáza zo striekačky, hadičky, ihly vystavená atmosférickému tlaku a môže zväčšovať svoj objem až 500 násobne. Takáto prázdna striekačka nedokáže odsáť kvapalnú vzorku, preto je dôležité prepláchnuť systém oplachovou kvapalinou medzi nástrekmi a naplnením injekcie striekačky [47].

### 3.3.5.3 Regulátor spätného tlaku (BPR)

Hustota MF závisí na jej zložení, tlaku systému a teplote kolony. Pri zvýšení tlaku dochádza k zmene hustoty, rozpúšťacej sily tekutiny a adsorpcie MF na stacionárnu fázu, čoho výsledkom je pokles retencie analytov. Zmena retencie závisí na zložení MF. Pre čistý, vysoko stlačiteľný  $\text{CO}_2$ , môže byť zmena hustoty veľká a viesť tak k retenčným posunom. Prídavok organického modifikátora do MF znižuje jej stlačiteľnosť a zmeny tlaku majú na retenciu analytov veľmi obmedzený vplyv. Pri použití čistého oxidu uhličitého je možné zmeny retencie ovplyvniť pomocou zmien tlaku a teploty [39]. Pri atmosférickom tlaku je  $\text{CO}_2$  jednoduchý plyn, svoje rozpúšťacie schopnosti vykazuje v prípade, ak je udržiavaný v hustotách podobných kvapaline, čo vyžaduje tlak minimálne  $80 \pm 20$  barov (v závislosti od teploty) [47].

BPR je pravdepodobne najzložitejšia časť SFC. Problém vzniká pri expanzii MF medzi otvorom a regulátorom prietoku. Prvé mechanické regulátory neboli schopné tlak dostatočne regulovať. Moderné BPR sú ovládané elektronicky [47]. Dynamický BPR udržiava požadovaný tlak na výstupe kolony, ktorý sa nemení s prietokom alebo s viskozitou tekutiny. Fixné restriktory umožňujú jednoduché spojenie SFC systému s odparovacím detektorom rozptylu svetla alebo s hmotnostnou spektrometriou (MS) [49].

#### **3.3.5.4 SFC detektory**

Kombinácia chromatografie s detektormi poskytujúcimi štruktúrne informácie má veľký význam pre identifikáciu zložiek komplexných zlúčenín [50]. Keď sa ako MF používa čistý CO<sub>2</sub>, možno využiť detekciu podobnú GC ako plameňo-ionizačný detektor (FID), detektor elektrónového záchytu (ECD), chemiluminiscenciu a iné. Pri usporiadaní podobnom LC sa používajú detekčné systémy, ktoré sú využívané aj v HPLC. Najpoužívanejším je UV detektor, odparovací detektor rozptylu svetla (ELSD), detektor nabitého aerosólu (CAD) alebo hmotnostný spektrometer [43].

##### **a) UV/VIS detektory (ultra-fiolovo-viditeľné)**

Detektory používané pri SFC sú rovnaké ako pri HPLC, s výnimkou toho, že prietoková cela pri SFC musí byť schopná odolávať vysokým tlakom. Tieto detektory sú umiestené pred BPR, ktorý udržiava konštantný tlak MF. V opačnom prípade by sa mobilná fáza čiastočne previedla do plynného stavu, čo má za následok zvýšenie detekčného šumu [47][49][51]. Intenzita šumu závisí od indexu lomu (RI) mobilnej fázy ovplyvniteľného teplotou a tlakom. Zmeny teploty, tlaku alebo zloženia mobilnej fázy ovplyvňujú RI, čo má za následok vznik šumu na základnej línii. RI oxidu uhličitého sa pohybuje v rozmedzí 1,06 až 1,24 pri bežných SFC podmienkach [47][49][52]. Ďalší aspekt, ktorý vyvoláva zmeny RI je rozdiel teplôt MF a prietokovej cely detektoru. Teplota mobilnej fázy opúšťajúcej kolonu môže byť pomocou tepelného výmenníka nastavená na teplotu odpovedajúcu prietokovej cele detektoru. Alternatívne boli navrhnuté prietokové cely izolované od optického systému [47].

##### **b) Odparovací detektor rozptylu svetla (ELSD)**

ELSD sa používa na detekciu neprchavých zlúčenín, ktoré vo svojej štruktúre neobsahujú chromoforické skupiny. MF rozprašovaná cez trysku vytvára v rozprašovacej komore kvapky, ktoré sa následne zahrejú. Prchavé molekuly sa odparia, neprchavé molekuly sú schopné rozptýliť svetlo vyžarované fotodiódou, a tak poskytnúť odpoveď. ELSD a ďalšie detektory založené na rozprašovaní sú vďaka jednoduchšiemu vyparovaniu superkritickej mobilnej fázy lepšie využiteľné v SFC ako pri HPLC. Pri použití týchto detektorov je často potrebné dodatočné zahrievanie

rozhrania, aby sa predišlo riziku vzniku suchého ľadu, ktorý je výsledkom chladiaceho efektu po návrate superkritickej kvapaliny do atmosférického tlaku [43][49].

### **c) Detektor nabitého aerosólu (CAD)**

V CAD je mobilná fáza vychádzajúca z chromatografickej kolony najskôr nebulizovaná (vznik aerosolu), zlúčeniny sú v kolíznej komore zmiešané s kladne nabitým nosným plynom, ktorý im predáva svoj kladný náboj a následne sú detekované elektrometrom. Odozva detektora závisí na veľkosti častíc solutu a množstve modifikátora. Rovnako ako pri ELSD je potrebné dodatočné zahrievanie rozhrania. Pre mobilné fázy, ktoré sú zložené len z malého množstva organického modifikátora sa po odtlakovaní odporúča použitie prídavnej kvapaliny, aby sa zabránilo precipitácií analytov. CAD má širší lineárne dynamický rozsah ako ELSD [43][49].

### **c) Hmotnostný spektrometer**

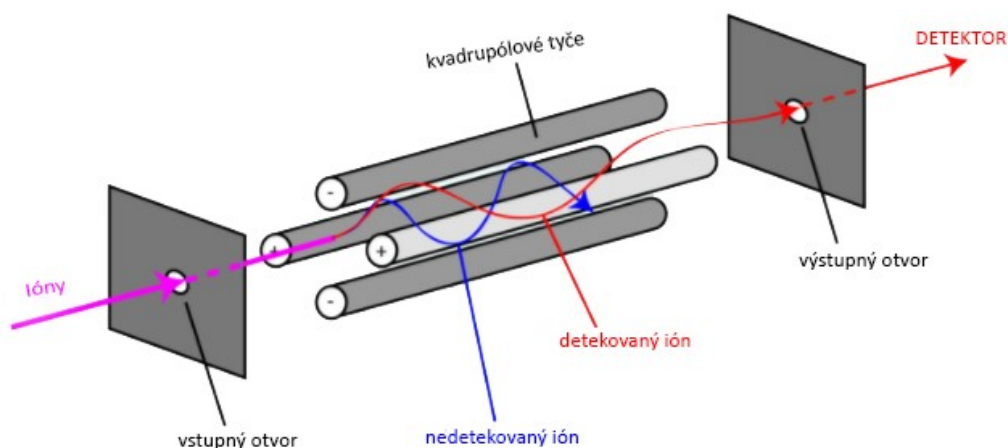
Hmotnostná spektrometria (MS) je často používaná v spojení s SFC vďaka vysokej citlivosti, presnosti a rýchlosti analýzy [53]. Detekcia pomocou MS umožňuje odlíšenie cieľových enantiomérov od achirálnych nečistôt, analýzu komplexných matric, používa sa na identifikáciu cieľových zlúčenín najmä vo farmaceutickom priemysle alebo na objasnenie chemickej štruktúry [46][39]. Inertný CO<sub>2</sub> používaný ako hlavná zložka mobilnej fázy zlepšuje vyparovanie počas ionizačného procesu [43][51].

Za nevýhodu spojenia SFC-MS sa považuje odtlakovanie kvapaliny medzi BPR a spektrometrom, čo môže vyvolávať rozšírenie píku a/alebo prenos analytu kvôli zníženiu rozpustnosti rozpustenej látky v kapiláre. Súčasný pokles teploty počas expanzie tekutiny tento jav zvyšuje. Keď takýto jav nastane, molekuly analytu sa môžu prilepiť na steny kapiláry, čím sa zníži množstvo zlúčeniny zavedené do detektora. Toto negatívum možno ovplyvniť vysokým prídavkom modifikátora, tzv. pomocnou kvapalinou [49]. Ako organický modifikátor, donor protónov, sa vďaka svojmu nižšiemu povrchovému napätiu používa MeOH častejšie ako isopropanol (IPA) alebo etanol (EtOH) [51]. Výber zdroja ionizácie súvisí s ionizáciou zlúčeniny, ktorá závisí od vlastností analytu [49].

Na ionizáciu neutrálnych molekúl analytu využíva SFC elektrosprej (ESI), chemickú ionizáciu za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizáciu za atmosférického tlaku (APPI)

[46]. Ionizácia pomocou elektrospreja sa uskutočňuje prenosom protónov v kvapalnej fáze, a preto je prídavok pomocnej kvapaliny nevyhnutný [41]. Pre ESI-MS účinok množstva modifikátora závisí od ionizačného módu (pozitívny alebo negatívny). Množstvo článkov opisuje použitie ESI na analýzu neiónových povrchovo aktívnych látok, alkoxylovaných polymérov, polárnych lipidov, polárnejších, stredne až vysokomolekulárnych zlúčenín a iných. Pri APPI bol pozorovaný vysoký pomer signálu k šumu, pretože CO<sub>2</sub> a MeOH nie sú fotoionizované [49]. APCI je ionizácia v plynnej fáze pomocou korónového výboja. Keď sú vzorky prítomné v plynnej fáze, môžu byť ionizované pri atmosférickom tlaku. Táto ionizačná metóda vyžaduje, aby teploty restriktora boli vyššie ako 200°C, aby sa úplne odparilo rozpúšťadlo a rozpustená látka [54].

Na delenie iónov podľa pomeru ich hmotnosti a náboja ( $m/z$ ) slúži analyzátor, ktorý je umiestnený za iónovým zdrojom a delenie v ňom prebieha za vysokého vákua (v závislosti od druhu analyzátor). Najčastejšie používané analyzátory sú kvadrupól, iónová pasca a analyzátor doby letu. Vďaka svojej jednoduchosti a nízkej cene sa za najpoužívanejší analyzátor považuje kvadrupól, ktorý pozostáva zo štyroch paralelných tyčí, na ktoré je kladené vysokofrekvenčné striedavé napätie. Dve protiľahlé tyče majú potenciál kladný, zatiaľ čo druhé dve zasa záporný. Ióny prechádzajú stredom osy kvadrupólu, kde začnú oscilovať. Pre určitý pomer napätia a amplitúdy ( $U/V$ ) sú oscilácie stabilné iba pre ión s určitou hodnotou  $m/z$ . Plynulá zmena  $U/V$  umožňuje postupné prepustenie všetkých iónov na detektor (Obr. 7) [55].



Obr. 7: Kvadrupól (upravené podľa 56)



V iónovej pasci sú ióny zachytené pôsobením troch hyperbolických elektród; prstencová a dve koncové. Na tieto elektródy sú aplikované rôzne napätia vedúce k vytvoreniu dutiny, v ktorej sú ióny zachytávané a následne vypudené vhodným nastavením pomeru napätia na elektródach. V analyzátoch doby letu sú všetky ióny prichádzajúce zo zdroja vystavené rovnakej počiatkovej kinetickej energii a letia trubicou analyzátoch, kde sú separované v závislosti od ich hmotnosti. Ľahšie ióny sa dostanú do detektora ako prvé, ióny s rovnakým  $m/z$  prídu do detektora súčasne [56].

### 3.3.6 Vplyv nástrekového rozpúšťadla na tvar píku v SFC

Za správnu laboratórnu prax sa považuje rozpustenie vzorky v slabšom rozpúšťadle, ktoré pozostáva z rovnakých zložiek ako použitá MF, ale v inom pomere. Bolo dokázané, že použitie nevhodného rozpúšťadla môže spôsobiť deformáciu píku v SFC. Z hľadiska tvaru píku sa za najlepšie rozpúšťadlo považuje nepolárny heptan (HP) a hexan (HX) vďaka svojej podobnosti s  $\text{CO}_2$ . Takto prchavé rozpúšťadlá sa v zásobníku vzoriek vyparujú a môžu tak koncentrovať vzorky vo vialkách. Za nevýhodu sa považuje, že pri použití ionizovateľných zlúčenín je rozpúšťacia sila nepolárnych rozpúšťadiel obmedzená. Pre dosiahnutie dobrej rozpustnosti a prijateľného tvaru píku sa často odporúča zmiešať nepolárne rozpúšťadlá s polárnymi [43][57].

Dôležitou vlastnosťou tohto rozpúšťadla je jeho aprotický charakter. Pri použití polárnej SF sú vodíkové väzby hlavným dôvodom retencie a protické rozpúšťadla vykazujú veľkú eluotropnú silu. Pri nástreku vzorky rozpustenej v takomto rozpúšťadle, môže byť časť vzorky eluovaná rýchlejšie ako sa očakávalo a viesť tak k deformácii píku. Pre väčšinu zlúčenín boli najlepšie výsledky separácie dokázané použitím aprotického rozpúšťadla (ACN, dichlormetán, metyl terc-butyléter, cyklopentyl metyléter). ACN je špecifický prípad, pretože je polárnejší ako ostatné, ale je tiež aprotický, a preto je veľmi dobrým injekčným rozpúšťadlom [58].

Ďalšou dôležitou fyzikálne-chemickou vlastnosťou rozpúšťadla je jeho viskozita. Výsledkom zmiešania kvapalín s veľmi odlišnými hodnotami viskozity je ich nedokonalá miesiteľnosť. Kvapalina s nižšou viskozitou má tendenciu preniknúť do druhej tekutiny, čo vedie k strate integrity píku. Viskozita MF v SFC je kvôli vysokému podielu  $\text{CO}_2$  veľmi nízka, v dôsledku toho môže byť nástrek vzorky rozpustenej v rozpúšťadle s vysokou

viskozitou pre separáciu škodlivý. Preto sú pre SFC vhodné rozpúšťadla s nízkou viskozitou – ACN, MTBE a DCM (Tab. 2) [58].

	MTBE	ACN	HP	DCM	THF	MeOH	H <sub>2</sub> O	EtOH	IPA
<i>Molekulová hmotnosť (g·mol<sup>-1</sup>)</i>	88,15	41,05	100,21	84,93	72,11	32,04	18,02	46,07	88,15
<i>Viskozita (cP)</i>	0,27	0,34	0,42	0,44	0,55	0,59	1,00	1,08	2,40
<i>Index polarity</i>	2,5	5,8	0,1	3,1	4,0	5,1	10,2	4,3	3,9

Tab. 2: Fyzikálne-chemické vlastnosti niektorých rozpúšťadiel (MTBE-metyl terc-butyléter; DCM-dichlormetan, THF-tetrahydrofuran; ACN-acetonitril; HP-heptan; MeOH-metanol; EtOH-etanol; IPA-izopropanol,) [58].

### 3.4 Matricové efekty (ME)

Presný mechanizmus ME nie je známy, môže byť spôsobený endogénnymi zlúčeninami (proteíny, fosfolipidy, soli) v matrici, rovnako aj exogénnymi zlúčeninami zavedenými počas extrakcie alebo analýzy. Prítomnosť endogénnych zlúčenín a ich koelúcia s cieľovými analytmi by mohla zasahovať do zdroja MS a meniť ich ionizačný výťažok, čo by viedlo k nepresným kvantitatívnym výsledkom. Množstvo iónov vytvorených v zdroji pod vplyvom matricových entít by mohlo byť zvýšené (zvýšenie signálu), alebo častejšie, znížené (supresia signálu) v porovnaní so situáciou, keď nie je prítomná žiadna matrica. Tento fenomén sa nazýva matricový efekt a prvýkrát bol objavený v roku 1993 Kebarle a Tangom [35][59][60]. Akýkoľvek proces, ktorý mení ionizačnú účinnosť a vyskytuje sa v kvapalnej a plynnej fáze, spôsobí matricové účinky. Napríklad, niektoré štúdie ukázali, že prítomnosť interferujúcich zlúčenín pri vyššej koncentrácii môže zvýšiť viskozitu a povrchové napätie kvapiek, a zmeniť tak účinnosť ich tvorby a odparovania. Zmeny v kvapalnej fáze môžu mať za následok zmenu množstva nabitých iónov v plynnej fáze. Navyše matricové zložky alebo prídavné látky v mobilnej fáze, ktoré pôsobia ako činidlá na párovanie iónov, zvyčajne znižujú ionizačnú účinnosť [60].

### 3.4.1 Hodnotenie matricových efektov

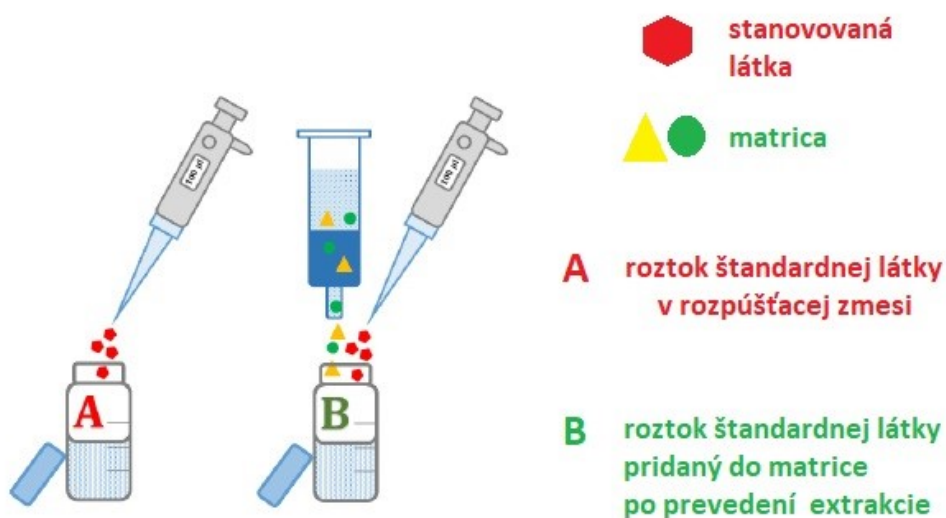
ME dokážu ovplyvniť účinnosť analýzy pri kvantifikácii aj identifikácii analytu, čo môže viesť k falošne pozitívnym alebo falošne negatívnym výsledkom. Hodnotenie ME je uvedené v smerniciach pre bioanalýzu [60]. Prítomnosť ME sa hodnotí troma odlišnými metódami, ktoré poskytujú kvalitatívne alebo kvantitatívne informácie; metóda porovnania smerníc kalibračných kriviek, metóda postextrakčného prídavku a postkolonová infúzia [35].

#### 3.4.1.1 Metóda postextrakčného prídavku

V kvantitatívnej metóde postextrakčného prídavku sa porovnáva plocha píku analytu v nástrekovom rozpúšťadle (B) s plochou píku cieľového analytu v pozorovanej matrici (A) (Obr.8). Rozdiel signálov sa pripisuje matricovému efektu a dá sa kvantifikovať pomerom oboch nameraných hodnôt pomocou vzorca:

$$ME = \frac{A}{B} \times 100$$

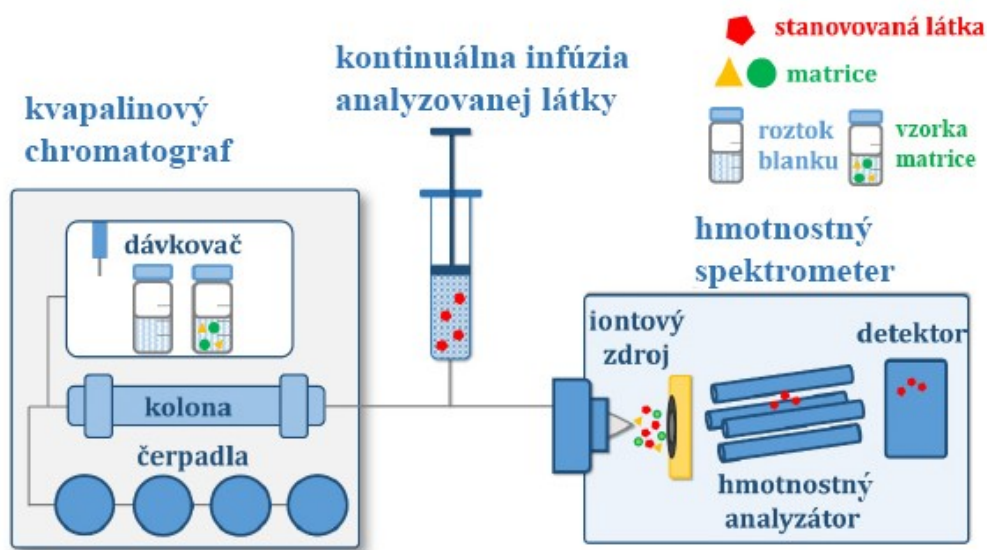
Hodnota ME v rozmedzí 85%-115% potvrdzuje neprítomnosť matricových efektov, hodnoty ME < 85% dokazujú potlačenie ionizácie (hodnoty pod 50% sú považované za silné potlačenie signálu) a ak je ME > 115% došlo k zosilneniu ionizácie (hodnoty nad 150% sa považujú za silné zvýšenie signálu) [59][60].



Obr. 8: Schéma metódy postextrakčného prídavku [35].

### 3.4.1.2 Metóda postkolonovej infúzie

V tejto metóde sú MF a roztok štandardu obsahujúci stanovované analyty priamo vháňané do zdroja ionizácie, zatiaľ čo do chromatografickej kolony je vstrekovaná zmes, ktorá neobsahuje komponenty matrice a ani analyzovanú látku (blank) a nástrek matrice, v ktorej sa analyzovaná látka stanovuje (Obr. 9). Tento postup umožňuje odhaliť úseky potlačenia alebo zvýšenia signálu v rámci celej analýzy [35][59][60].



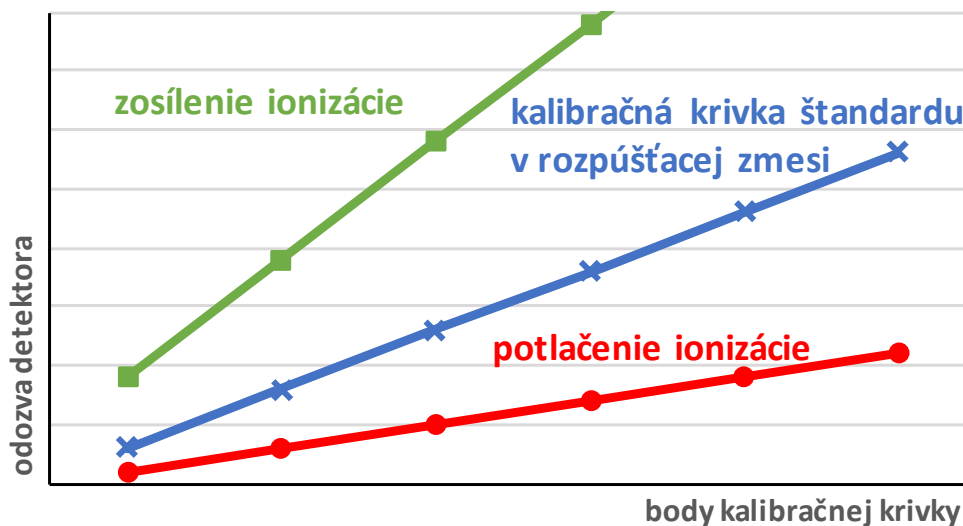
Obr. 9: Schéma metódy postkolonovej infúzie [35].

Pomocou tejto metódy je možné na chromatograme jasne označiť oblasť, v ktorej sú analyty a vnútorný štandard ovplyvnené matricovými efektmi. Infúzia po kolóne môže byť tiež použitá na optimalizáciu pH mobilnej fázy alebo koncentrácie aditív na podporu tvorby aduktových iónov a minimalizáciu ME bez značnej zmeny chromatografických podmienok [60].

### 3.4.1.3 Metóda porovnania smerníc kalibračných kriviek

Efekt matrice možno posúdiť aj porovnaním smernice kalibračnej krivky zostrojenej v rozpúšťacej zmesi a smernice kalibračnej krivky, ktorá vznikla pridaním štandardu do frakcie hodnotenej matrice podrobenej úprave vzorky. Ak je smernica kalibračnej krivky zostrojenej v pozorovanej matrici nižšia ako smernica kalibračnej krivky pripravenej v rozpúšťacej zmesi, jedná sa o potlačenie ionizácie. Metóda sa využíva

najmä pre rastlinné alebo biologické vzorky s prirodzeným výskytom sledovaných analytov (Obr. 10) [35][60].



Obr. 10: Metóda porovnania smerníc kalibračných kriviek (upravené podľa 35).

### 3.4.2 Odstránenie matricových efektov

Odstránenie alebo zmenšenie vplyvu matricových efektov je možné viacerými spôsobmi. Jednou z možností kompenzácie je použitie izotopicky značených vnútorných štandardov, ktoré sa od stanovovaných analytov líšia nahradením niektorých atómov analógmi  $^2\text{H}$  alebo  $^{13}\text{C}$  v štruktúre. Keďže predstavujú takmer identickú chemickú štruktúru mali by sa počas extrakcie, separácie a detekcie správať rovnako ako stanovovaná látka a umožniť tak korekciu zmien v analytickom signále. Tieto zmeny spôsobené ME sa totiž prejavajú v rovnakej miere na odozve vnútorného štandardu aj analyzovanej látky. Druhou možnosťou je zlepšiť úpravu vzorky a znížiť tak prítomnosť endogénnych častíc v konečnom extrakte. Najbežnejšie používané metódy na úpravu vzorky sú riedenie, extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, zrážanie proteínov, extrakcia na tuhú fázu. Treťou alternatívou je zmena podmienok MS, pretože výskyt ME sa môže meniť v závislosti od zdroja ionizácie, ionizačnej techniky alebo režimu. Prechod z pozitívneho ESI režimu na negatívny alebo z ESI na APCI dokáže úspešne obmedziť ME. Nakoniec, lepšiu separáciu cieľových analytov od zlúčenín zodpovedných

za potlačenie alebo zlepšenie ionizácie možno dosiahnuť modifikáciou chromatografických podmienok [59].

Podľa EMA (Európska lieková agentúra) sa faktor matrice vypočíta pri koncentrácií nepresahujúcej trojnásobok LLOQ (dolný limit kvantifikácie). Jedná sa o podiel plochy píku vo vzorke s prítomnosťou matrice a plochy píku analytu vo vzorke bez prítomnosti matrice (kapitola 3.4.1.1). Relatívna smerodatná odchýlka (RSD) faktoru matrice stanoveného v matrici zo šiestich rôznych zdrojov nesmie byť väčšia ako 15% a tolerancia výťažnosti pri koncentráciách blízkych LLOQ je  $\pm 20\%$  [61].

## 4 Experimentálna časť

### 4.1 Použité chemikálie a prístroje

2-propanol, 2-propanol LC-MS Chromasolv® ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Acetonitril, Acetonitrile LC-MS Chromasolv® ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Amoniak, Ammonium hydroxide LC-MS ≥ 25% (Fluka Analytical)

Dichlormetan, Dichloromethane Chromasolv® pre HPLC ≥ 99,8% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Etanol, Ethanol absolutný p.a ≥ 99,8% (PENTA s.r.o., Česká republika)

Heptan, Heptane Chromasolv® pre HPLC ≥ 99% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Hexan, Hexane Chromasolv® pre HPLC ≥ 97,9% (GC) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Metanol, Methanol LC-MS Chromasolv® ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Mravenčan amónny, Ammonium formate ≥ 98% (Riedel-de Haën, Nemecko)

Octan amónny, Ammonium acetate ≥ 98% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Oxid uhličitý ≥ 99,995% (Messer, Česká republika)

#### 4.1.1 Štandardné látky

Tokoferoly, Tocopherols 25 mg/ml v hexane ( $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol,  $\delta$ -tocopherol) ≥ 98% (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Tokotrienoly, Tocotrienols 5 mg/ml v etanole ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol,  $\delta$ -tocotrienol) ≥ 98% (Larodan, Švédsko)

#### 4.1.2 Prístrojové vybavenie

Automatické mikropipety so špičkami, Biohit, ČR

UHPSFC chromatografický systém Acquity UPC<sup>2</sup> (Waters, Milford, USA)

Analytické kolony

Acquity UPC<sup>2</sup>™ Torus DEA, 100 x 3,0 mm x 1,7  $\mu$ m

Acquity UPC<sup>2</sup>™ Torus 1-AA, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm

Acquity UPC<sup>2</sup>™ Torus 2-PIC, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm

Acquity UPC<sup>2</sup>™ Torus DIOL, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm

Acquity UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm

Analytické váhy, Sartorius, ČR

Šrubovacie vialky s uzávermi, Vitrum, ČR

Trepačka, Thermo-Shaker, BioSan SIA

Centrifuga, Andreas Hettich, Nemecko

#### **4.1.3 Podmienky UHPSFC separácie**

Podmienky separácie pre vysoko rozlišovaciu metódu (HR) boli nastavené: izokratická elúcia MF zloženej z 98% CO<sub>2</sub> a 2% MeOH s prídavkom 10mM mravenčanu amónneho (AmF) pri prietoku 1,5 ml/min, nástrek 2 μl, prídavná kvapalina 5% H<sub>2</sub>O v MeOH, hybridná SF s ethylenovými mostíkmi modifikovaná 2-ethylpiridinom (BEH 2-EP), teplota kolony je 40°C a tlak BPR 23,4 MPa.

Ako druhá bola použitá vysoko rýchlostná metóda (HS) vhodná najmä pre rýchly laboratórny skrining jednoduchých matric. Podmienky separácie HS metódy; izokratická elúcia CO<sub>2</sub>:MeOH s 10 mM AmF (95:5), prietok 1,5 ml/min, nástrek 2 μl, 5% H<sub>2</sub>O v MeOH ako prídavná kvapalina, kolona BEH 2-EP, teplota kolony 50°C, tlak BPR 13,0 MPa.

## **4.2 Pracovný postup**

### **4.2.1 Príprava štandardu**

Zo zásobného roztoku T (25 mg/ml) bolo odobraných 40 μl a doplnených 960 μl hexanu, zo zásobného roztoku T<sub>3</sub> (5 mg/ml) bolo odobraných 200 μl a doplnených 800 μl etanolu, čím vznikli roztoky o koncentrácií 1 mg/ml. Tieto roztoky boli nariedené nasledujúcim spôsobom; z každého dostupného roztoku bolo do vialky odobraných 50 μl a doplnených do 1000 μl roztokom izopropanol:hexan 1:9 (IPA:HX), čím vznikli roztoky s koncentráciou 0,05 mg/ml. Z každého nariedeného roztoku bolo opäť



odobraných 50  $\mu\text{l}$  a objem bol doplnený na 1000  $\mu\text{l}$  roztokom IPA:HX, výsledkom bola zmes ôsmich derivátov o koncentrácií 0,0025 mg/ml.

#### **4.2.2 Príprava prídavných kvapalín**

Pripravený bol 0,1% roztok  $\text{NH}_4\text{OH}$  o objeme 100 ml; do odmernej banky o objeme 100 ml boli napipetované 0,4 ml 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Táto banka bola doplnená metanolom po rysku. Ako ďalšia prídavná kvapalina bol pripravený 10 mM roztok mravenčanu amónneho (AmF) nasledujúcim postupom; do kadičky bolo navážených 0,06306 g mravenčanu amónneho, ktorý bol zmiešaný s malým množstvom metanolu. Rozpustený AmF bol prevedený do 100 ml odmernej banky, táto banka bola po rysku doplnená MeOH. Rovnakým spôsobom bol pripravený aj roztok 10 mM octanu amónneho (AmAc), ktorého hmotnosť bola 0,07708 g. Pri príprave 2% roztoku  $\text{H}_2\text{O}$  boli odpipetované 2 ml vody do odmernej banky o objeme 100 ml, tento objem bol následne doplnený po rysku MeOH. 5% roztok vody v MeOH bol pripravený nasledujúcim spôsobom; do 100 ml odmernej banky bolo odpipetovaných 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a doplnených MeOH po rysku.

#### **4.2.3 Príprava MF a aditív**

Ako organické modifikátory mobilnej fázy boli použité rozpúšťadlá: metanol, etanol (EtOH), izopropanol (IPA), zmes MeOH a ACN v pomere 1:1. Príprava ďalších mobilných fáz (0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 10 mM AmF, 10 mM AmAc, 2%  $\text{H}_2\text{O}$ ) odpovedá príprave prídavných kvapalín v odstavci 4.2.2.

#### **4.2.4 Riedenie moču**

Zriedením 150 ml ACN s 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  do 200 ml nádoby bol pripravený 75 % roztok ACN. Následne boli do vialiek pripravené vzorky štandardov (STD); na prípravu  $\text{STD}_1$  o koncentrácií 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  boli použité zásobné roztoky T a  $\text{T}_3$ , ktorých koncentrácia bola 0,1 mg/ml, z týchto roztokov bolo odobraných 15  $\mu\text{l}$  T, 15  $\mu\text{l}$   $\text{T}_3$  a 1470  $\mu\text{l}$  75% ACN.  $\text{STD}_2$  o koncentrácií 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bol pripravený zmiešaním 32,5  $\mu\text{l}$  T, 32,5  $\mu\text{l}$   $\text{T}_3$ , ktorých koncentrácia bola 1 mg/ml a 6435  $\mu\text{l}$  75% ACN. Takto pripravené roztoky boli použité na 10, 20, 50 a 100 násobné zriedenie moču podľa nasledujúcej tabuľky (Tab. 3). Každé

riedenie prebehlo na piatich koncentračných úrovniach (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml a 20 µg/ml).

Tab. 3: Postup prípravy vzoriek moču riedením.

µg/ml	Moč	STD <sub>1</sub>	STD <sub>2</sub>	ACN
1A	100	50	0	850
2A	100	100	0	800
3A	100	0	100	800
4A	100	0	200	700
5A	100	0	400	500
1B	50	25	0	925
2B	50	50	0	900
3B	50	0	50	900
4B	50	0	100	850
5B	50	0	200	750
1C	20	10	0	970
2C	20	20	0	960
3C	20	0	20	960
4C	20	0	40	940
5C	20	0	80	900
1D	10	5	0	985
2D	10	10	0	980
3D	10	0	10	980
4D	10	0	20	970
5D	10	0	40	950

#### 4.2.5 Príprava vzoriek pre LLE

Pri optimalizácii metódy bolo zo zmesi štandardov T<sub>3</sub> a T o koncentrácií 0,1 mg/ml odpipetovaných 5 µl a doplnených močom do 1000 µl. Z takto pripraveného zásobného roztoku bolo do ependorfiek odobraných 100 µl a extrahovaných nepolárnym organickým rozpúšťadlom o objeme 100 alebo 200 µl. Takto pripravené vzorky boli podrobené trepaniu na vortexe v troch odlišných časoch (5, 10 a 20 min) a následne boli prevedené na centrifugu, kde došlo vplyvom odstredivej sily k oddeleniu T a T<sub>3</sub> do nepolárneho organického rozpúšťadla. Každá vzorka bola pripravená dvakrát. Po centrifugácii bola zo vzorky organická vrstva odpipetovaná do vialky. Pripravené

vzorky boli nastrekované do chromatografického prístroja a podrobené analýze. Jednotlivé rozpúšťadla, ich objemy a časy trepania sú uvedené v Tab. 4.

Vzorky použité na meranie ME boli pripravené nasledovne: vzorky čistého moču boli upravené pomocou LLE za použitia 200 µl heptanu, následne podrobené 20 minútovému trepaniu a vložené do centrifugy. K takto upraveným vzorkám moču boli pridané štandardy, čoho výsledkom boli koncentračné hladiny T a T<sub>3</sub> 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml a 20 µg/ml.

Tab. 4: Príprava vzoriek pre optimalizáciu LLE (HX-hexan, HP-heptan, DCM-dichlormetan).

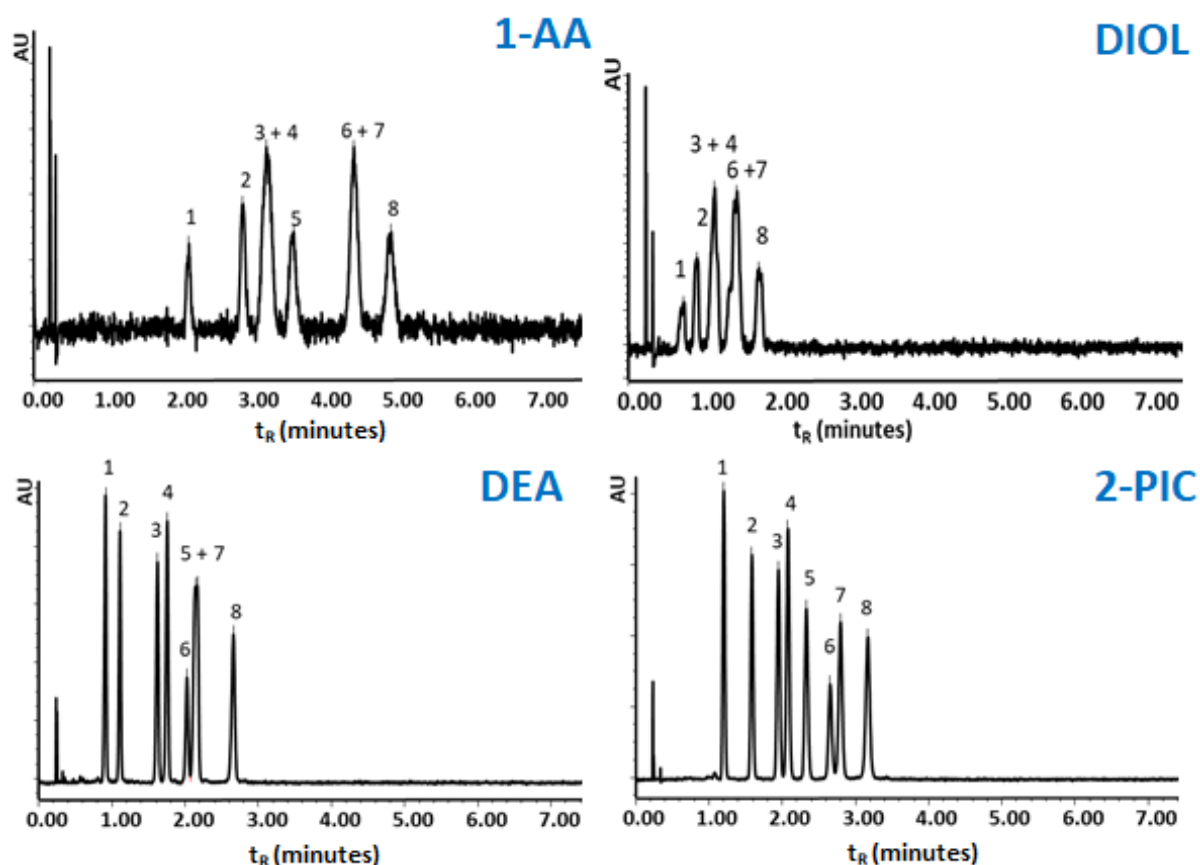
moč + STD	5 min		10 min		20 min	
	100 µl		100 µl		100 µl	
HX	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl
HP	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl
HX/DCM 9:1	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl
HX/DCM 8:2	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl
HP/DCM 9:1	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl
HP/DCM 8:2	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl	100 µl	200 µl

## 5 Výsledky a diskusia

### 5.1 Vývoj chromatografickej metódy

Deriváty vitamínu E sú štruktúrne podobné, líšia sa svojou účinnosťou, počtom a pozíciou metylových skupín na chromanolovom jadre. Problémom pri vývoji účinnej metódy je separácia kritických párov izomérov ( $\beta$ - a  $\gamma$ - T a T<sub>3</sub>), ktoré majú rovnaký počet metylových skupín v rôznych polohách, rovnaké hodnoty molekulovej hmotnosti a pomer hmotnosti a náboja ( $m/z$ ), čo je dôležitý aspekt pri detekcii látok pomocou MS.

Ako prvý krok vývoja UHPSFC metódy bol zvolený skríning nových Torus kolon. Použité boli kolony: dietylamínová (DEA), 1-aminoantracénová (1-AA), 2-pikolylamínová (2-PIC) a diolová (DIOL), ktoré obsahovali častice o veľkosti 1,7  $\mu\text{m}$  a líšili sa svojou polaritou a selektivitou (kapitola 3.3.4) (Obr. 11).

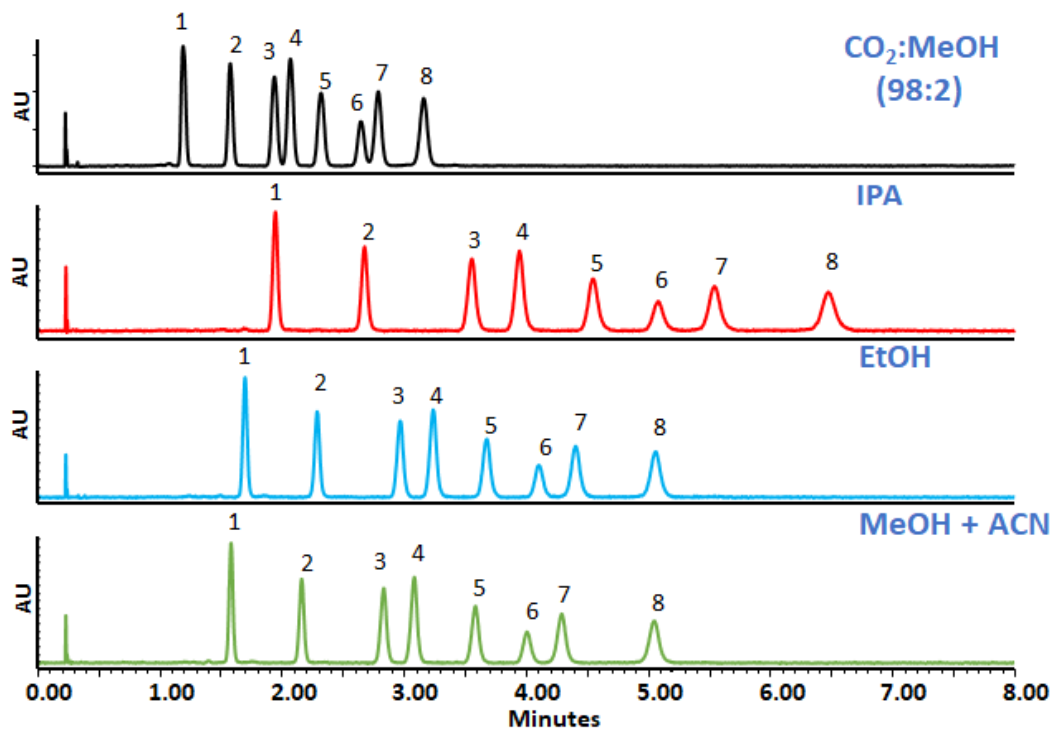


Obr. 11: Skríning Torus kolon pre určenie optimálnej stacionárnej fázy pre analýzu vitamínu E. (1)  $\alpha$ -tokoferol, (2)  $\alpha$ -tokotrienol, (3)  $\beta$ -tokoferol, (4)  $\gamma$ -tokoferol, (5)  $\delta$ -tokoferol, (6)  $\beta$ -tokotrienol, (7)  $\gamma$ -tokotrienol, (8)  $\delta$ -tokotrienol.

Na všetkých kolonach prebehla analýza za chromatografických podmienok: izokratická elúcia CO<sub>2</sub>:MeOH (98:2), prietok 2 ml/min, nástrek 2 µl, teplota kolony 40°C a tlak BPR 12,9 MPa, prídavná kvapalina 0,1% NH<sub>4</sub>OH v MeOH. Napriek zmenám v retencii jednotlivých derivátov boli všetky testované látky eluované na všetkých použitých stacionárnych fázach.

Na Obr. 11 je možné vidieť, že pri použití 1-AA kolony kritické páry β-; γ-T a β-; γ-T<sub>3</sub> spolu koeluovali v dvoch zreteľných píkoch, okrem toho je na chromatograme viditeľný veľký šum, z uvedených dôvodov nebola 1-AA kolona pre separáciu za stanovených podmienok vhodná. Rovnaký problém s koelúciou týchto izomérov nastal aj pri použití DIOL kolony. Dostatočnú selektivitu neposkytovala ani DEA kolona, kde sa do jedného píku zliali δ-T a γ-T<sub>3</sub>, čo bolo menej očakávané, čím došlo k posunu píku 6 pred pík 5. Najlepšiu selektivitu poskytla 2-PIC stacionárna fáza, na ktorej došlo k jasnej separácii všetkých analytov do 3,5 minúty. Pre nedostatočné odlíšenie pík 3 a 4, 6 a 7 až na základnú líniu boli na tejto kolone testované ďalšie zmeny podmienok separácie.

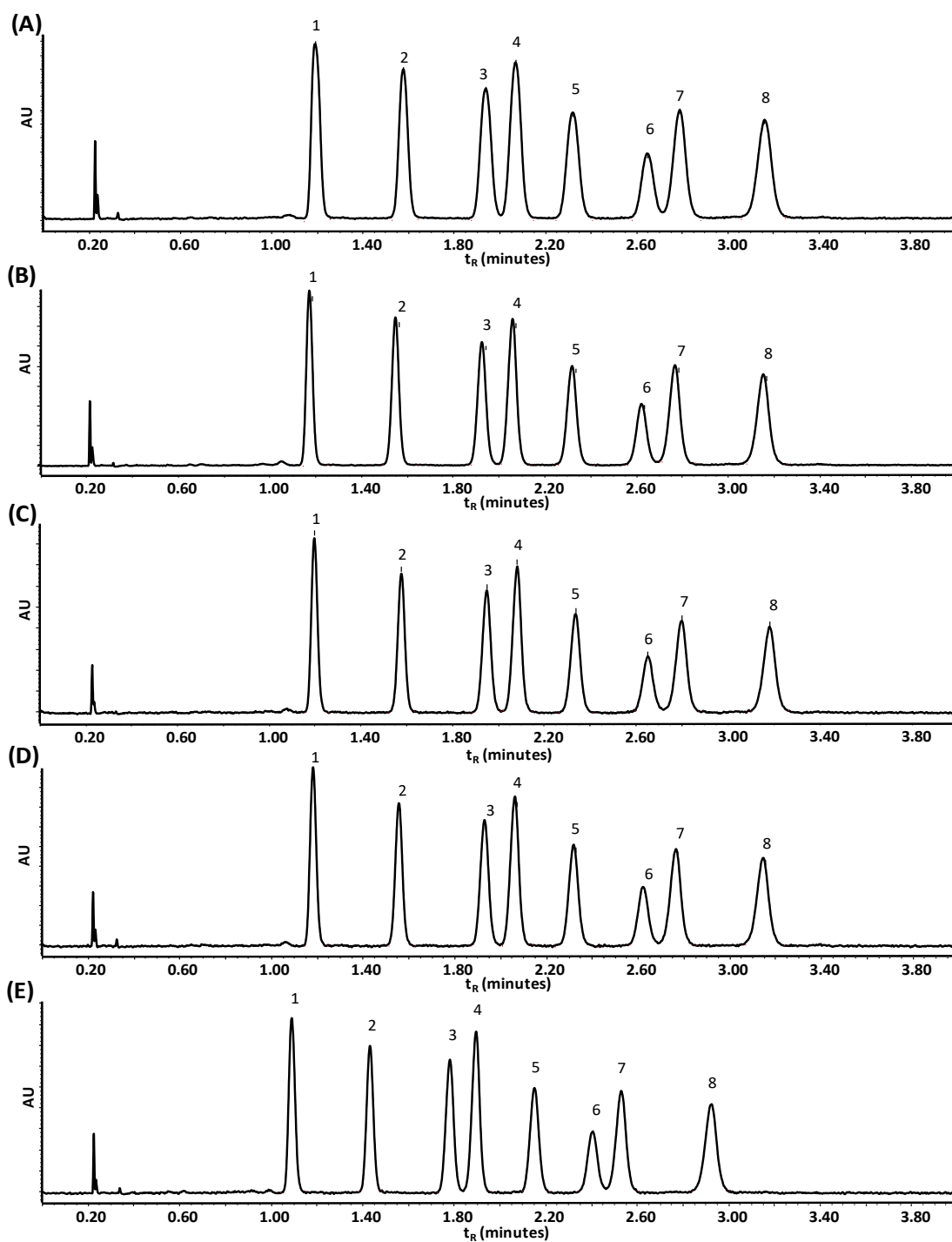
V ďalšom kroku bol testovaný vplyv mobilnej fázy (MF). Zloženie MF ovplyvňuje tvar píku, čas retencie, selektivitu a odpoveď MS. V snahe zvýšiť selektivitu a elučnú silu mobilnej fázy, ktorá by vyvolala posun retenčných časov a zlepšila rozlíšenie medzi píkmami, bola v ďalšom kroku na 2-PIC stacionárnej fáze nastavená izokratická elúcia CO<sub>2</sub>:modifikátor (97:3). Modifikátory mobilnej fázy (EtOH, IPA, MeOH/ACN) by v porovnaní s MF CO<sub>2</sub>:MeOH (98:2) mali zvýšiť selektivitu, zlepšiť rozlíšenie pík. Ostatné podmienky separácie ostali nezmenené (Obr. 12).



Obr. 12: Optimalizácia zloženia mobilnej fázy: (1)  $\alpha$ -tokoferol, (2)  $\alpha$ -tokotrienol, (3)  $\beta$ -tokoferol, (4)  $\gamma$ -tokoferol, (5)  $\delta$ -tokoferol, (6)  $\beta$ -tokotrienol, (7)  $\gamma$ -tokotrienol, (8)  $\delta$ -tokotrienol. SFC podmienky:  $\text{CO}_2$ :Modifikátor (97:3), prietok 2 ml/min, nástrek 2  $\mu$ l, teplota kolony 40°C, tlak BPR 12,99 MPa.

Výmenou  $\text{CO}_2$ :MeOH (98:2) za  $\text{CO}_2$ :IPA (97:3) došlo k oddeleniu všetkých píkav až na základnú líniu. Táto metóda však nebola vyhovujúca, pretože trvala takmer 7 minút, čo je v porovnaní s použitím čistého metanolu dvakrát dlhšie. Využitie EtOH ako modifikátora MF zlepšilo separáciu a skrátilo dĺžku analýzy na 5 minút. Rovnako dobré rozlíšenie a selektivita sa ukázala aj pri použití zmesi MeOH a ACN 1:1. Plochy jednotlivých píkav boli o niečo väčšie pri použití MeOH/ACN, z čoho možno usúdiť, že z testovaných MF sa táto zmes javila ako najlepšia, ale čas analýzy bol viac ako 5 minút, čo je oproti už vyvinutej HS metóde (kapitola 3.1.5) dvakrát viac.

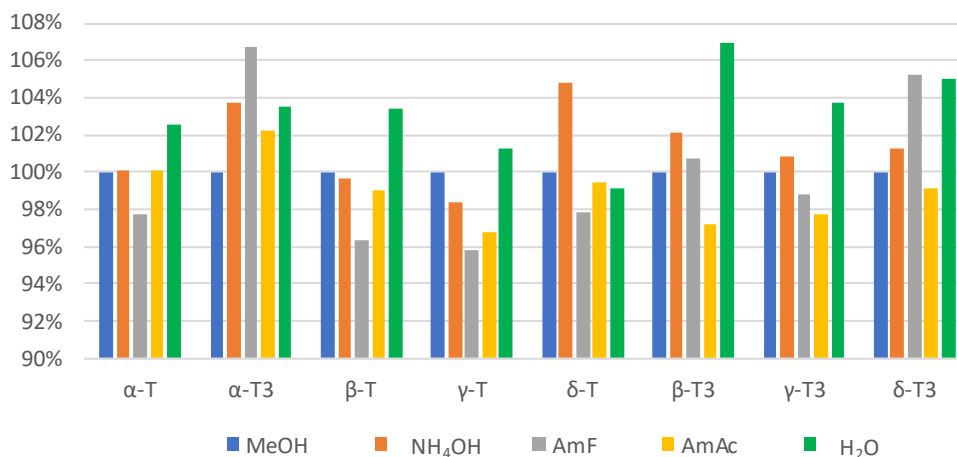
Vo vývoji vhodnej metódy pre stanovenie T a T<sub>3</sub> sa pokračovalo prídavkom aditív do mobilnej fázy, teda do metanolu (0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 10mM AmF, 10mM AmAc a 2%  $\text{H}_2\text{O}$ ). T a T<sub>3</sub> sa považujú za neutrálne molekuly, z toho dôvodu sa zmeny v retencii a selektivite pri použití rôznych aditív neočakávali. Porovnával sa ich vplyv na odozvu MS detektora a citlivosť metódy (Obr. 13).



Obr. 13: Optimalizácia zloženia mobilnej fázy: chromatogramy tokoferolov pri použití (A)  $\text{CO}_2\text{:MeOH}$  (98:2) a aditív v  $\text{CO}_2\text{:MeOH}$ , (B)  $\text{MeOH} + 10 \text{ mM AmF}$ , (C)  $\text{MeOH} + 10 \text{ mM AmAc}$ , (D)  $\text{MeOH} + 0,1\% \text{ hydroxid amónny}$ , (E)  $\text{MeOH} + 2\% \text{ voda}$ . SFC podmienky:  $\text{CO}_2\text{:MeOH} + \text{aditívum}$  (97:3), prietok 2 ml/min, teplota kolony 40°C, tlak BPR 12,99 MPa.

Použitie týchto aditív prinieslo veľmi podobné výsledky bez ohľadu na ich zloženie. Najväčšie plochy píkov v porovnaní s metanolom sa ukázali pri použití 2% vody. 10mM mravenčan amónny (AmF) ako aditívum dokázal mierne zvýšiť intenzitu signálu, teda pomer signálu k šumu (S/N). Napriek miernemu zväčšeniu plochy píkov, ktoré dosiahlo

použitie 2% H<sub>2</sub>O ako aditíva, trvala analýza 2,9 minúty, čo je viac ako vyvinutá HS metóda (Obr. 14).

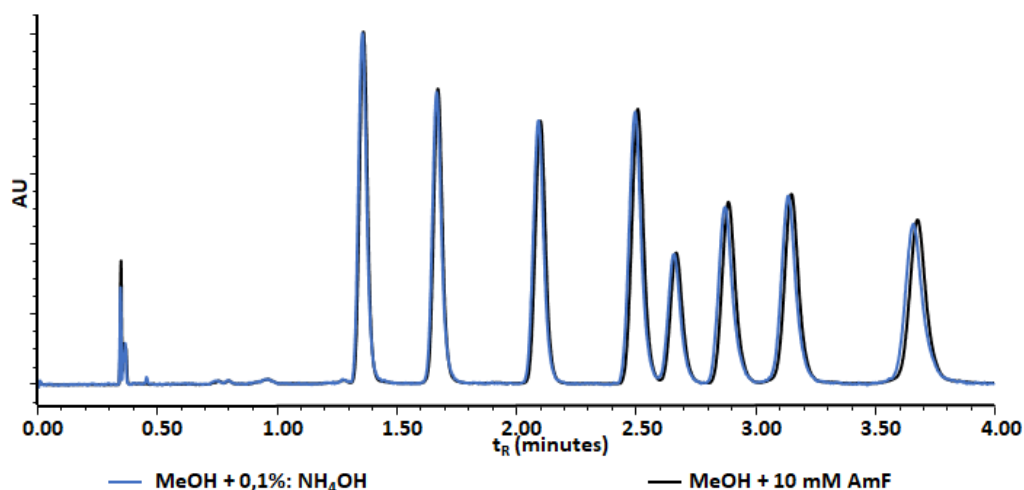


Obr. 14: Porovnanie plochy pík po pridaní aditív k CO<sub>2</sub>:MeOH (97:3), prídavná kvapalina MeOH s CO<sub>2</sub>:MeOH (98:2).

Z vyššie uvedeného teda vyplýva, že za najvhodnejšie chromatografické podmienky, ktoré boli testované boli zvolené: izokratická elúcia CO<sub>2</sub>:MeOH/ACN (97:3), prietok 2 ml/min, nástrek 2 µl, 2-PIC kolona, teplota kolony 40°C a spätný tlak 12,96 MPa. Táto metóda však trvala približne 5 minút, čo je viac ako predtým vyvinuté metódy HS a HR na kolone BEH 2-EP, preto sa pri ďalšom vývoji metódy použili práve tieto metódy. Na začiatok boli obe metódy krátko overené.

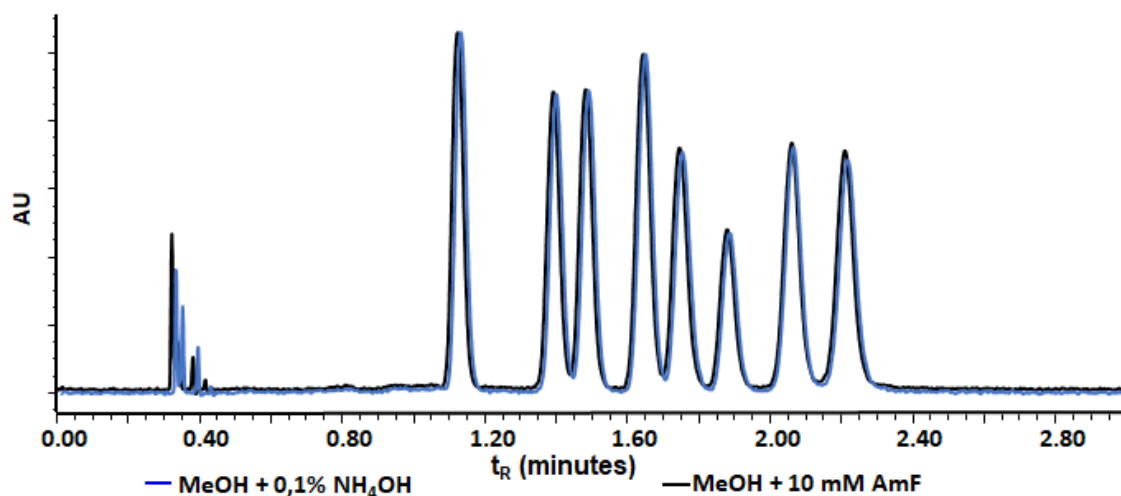
V snahe zlepšiť odozvu MS detektora, bol modifikátor AmF použitý pri HS a HR metóde nahradený hydroxidom amónnym. Ako prvá bola spustená analýza HR za podmienok: CO<sub>2</sub>:MeOH (98:2) s prídavkom 0,1% NH<sub>4</sub>OH pri prietoku 1,5 ml/min, nástrek 2 µl, prídavná kvapalina MeOH s 5% H<sub>2</sub>O, BEH 2-EP kolona, teplota kolony je 40°C a tlak BPR 23,4 MPa (Obr. 15). Po zmene aditíva nedošlo vo výsledkoch k žiadnej zmene.





Obr. 15: Porovnanie výsledkov po zmene aditíva mravenčanu amónneho za 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  pri použití HR metódy.

Rovnaký výsledok bol dosiahnutý aj pri analýze pomocou HS metódy, ktorá prebehla za podmienok:  $\text{CO}_2:\text{MeOH}$  s 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (95:5), prídavná kvapalina 5%  $\text{H}_2\text{O}$  s MeOH, prietok 1,5 ml/min, nástrek 2  $\mu\text{l}$ , kolona BEH 2-EP, teplota kolony 50°C, a tlak BPR 13,0 MPa (Obr. 16).

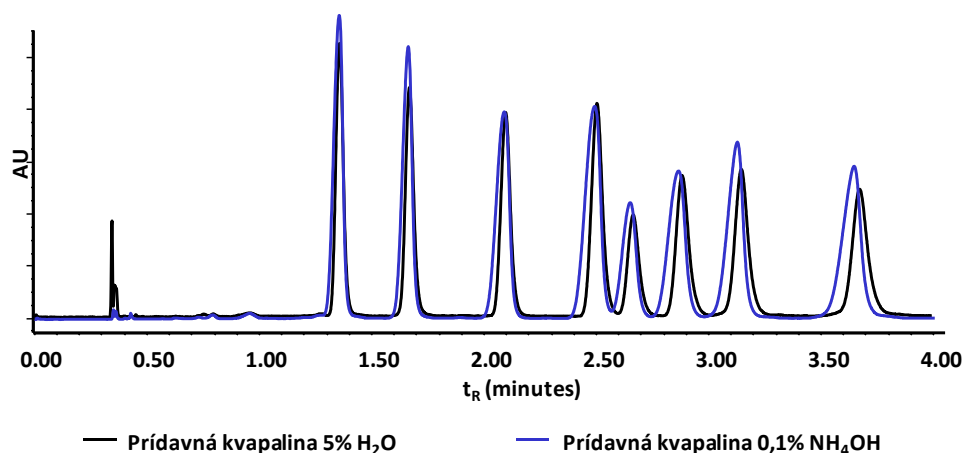


Obr. 16: Porovnanie výsledkov po zmene aditíva mravenčanu amónneho za 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  pri použití HS metódy.

Ako sa podľa neutrálneho charakteru vitamínu E dalo očakávať, zmena aditíva nezlepšila selektivitu metódy, ale ani odozvu MS detektora. Z porovnania chromatogramu pred a po zmene aditíva je jasne vidieť, že nedošlo k žiadnej zmene a pôvodne vyvinuté metódy neboli zlepšené.

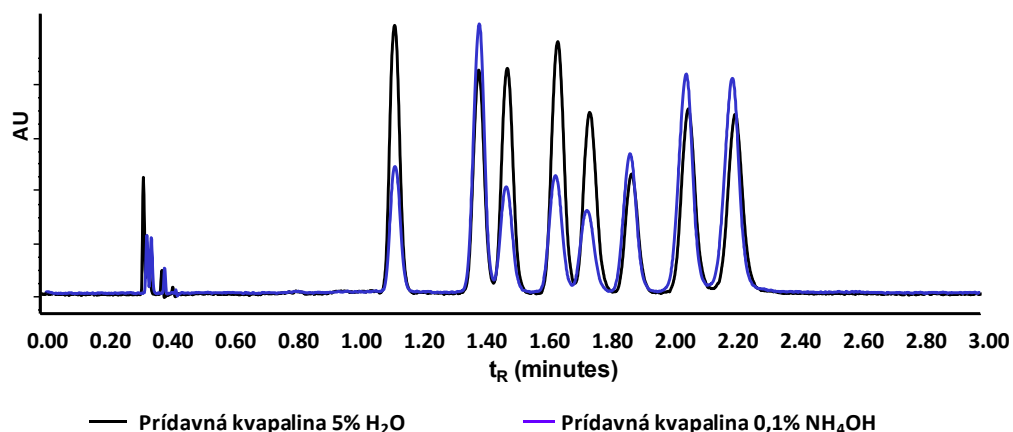
V ďalšom kroku bol testovaný vplyv zmeny prídavnej kvapaliny na ionizáciu analytov. Ako prídavná kvapalina bol namiesto 5%  $\text{H}_2\text{O}$  použitý 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , od ktorého sa

očakávalo zvýšenie citlivosti metódy. Takto upravená metóda bola spustená za podmienok HS aj HR. Vplyv použitia 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  ako prídavnej kvapaliny za podmienok HR bol takmer zanedbateľný (Obr. 17).



Obr. 17: Porovnanie chromatogramov po zmene 5% vody ako prídavnej kvapaliny za 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  pri HR metóde.

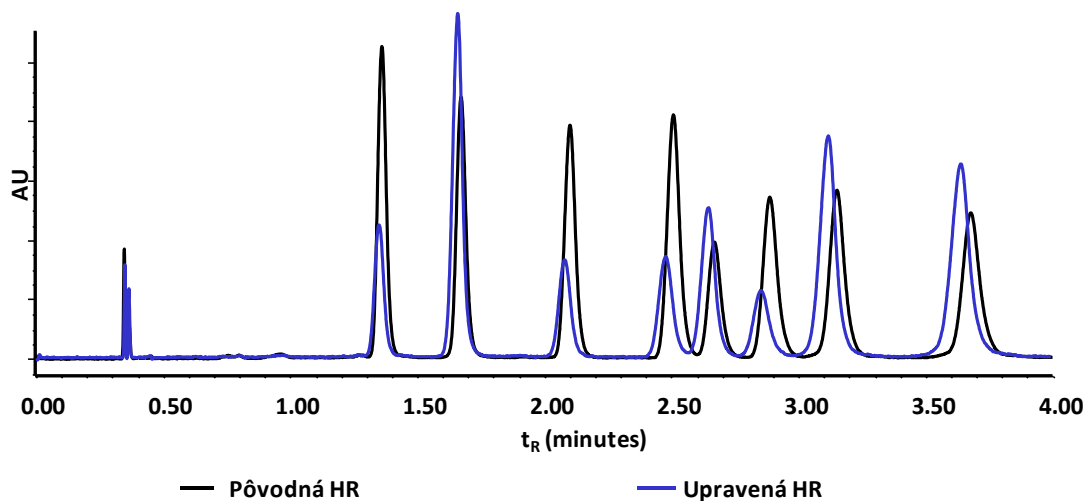
Po zmene prídavnej kvapaliny za 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  pri HS podmienkach bola odozva MS znížená u derivátov T až o 26% (Obr. 18). Z uvedených chromatogramov vyplýva, že nami zvolené podmienky separácie nevykazovali lepšie výsledky ako vyvinuté HS a HR metódy.



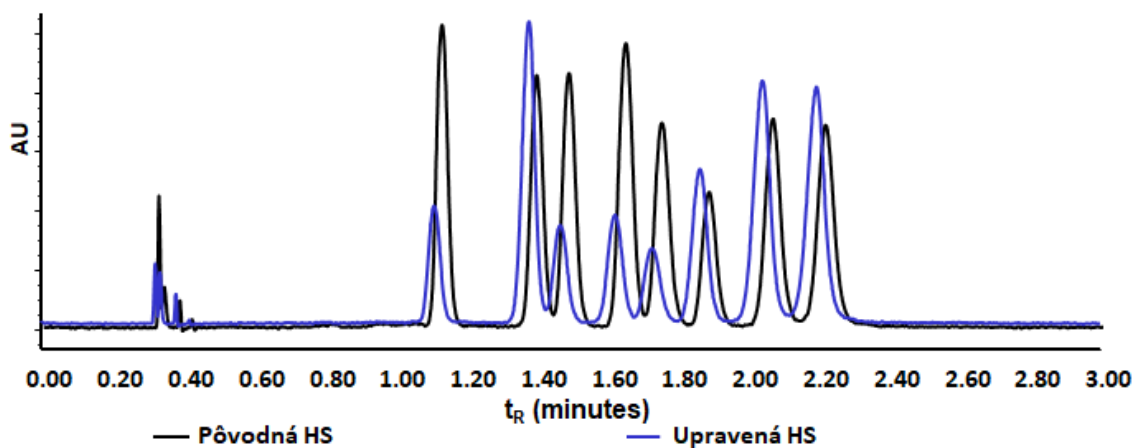
Obr. 18: Porovnanie chromatogramov po zmene 5% vody ako prídavnej kvapaliny za 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  pri HS metóde.

Samotná výmena prídavnej kvapaliny a MF za ionizáciu podporujúci  $\text{NH}_4\text{OH}$  nepriniesla pozitívne výsledky, preto posledným pokusom o vývoj lepšej a citlivejšej metódy bola zmena MF súčasne so zmenou prídavnej kvapaliny za hydroxid amónny, ostatné podmienky HR (Obr.19) a HS analýzy (Obr. 20) ostali nezmenené. Ani táto zmena MF

a prídavnej kvapaliny neprinesla lepšie výsledky, v oboch metódach došlo k zníženiu odozvy zhruba o 40% u derivátov tokoferolu, taktiež došlo k malému zníženiu selektivity v porovnaní s pôvodnými metódami. Z porovnania odozvy vyplynulo, že zmena prídavnej kvapaliny nevedla k vyššej citlivosti ani u jednej z metód. Z tohto dôvodu boli pre ďalší výskum ako najvhodnejšie zvolené práve HS a HR metódy za ich štandardných podmienok.



Obr. 19: Porovnanie pôvodnej HR metódy ( $CO_2:MeOH + 10\text{ mM AmF } (98:2)$ , prídavná kvapalina  $MeOH + 5\% H_2O$ ) so zmenenou HR metódy ( $CO_2:MeOH + 10\text{ mM } NH_4OH (98:2)$ , prídavná kvapalina  $MeOH + 0,1\% NH_4OH$ ).



Obr. 20: Porovnanie pôvodnej HS metódy ( $CO_2:MeOH + 10\text{ mM AmF } (95:5)$ , prídavná kvapalina  $MeOH + 5\% H_2O$ ) so zmenenou HS metódy ( $CO_2:MeOH + 0,1\% NH_4OH (95:5)$ , prídavná kvapalina  $MeOH + 0,1\% NH_4OH$ ).

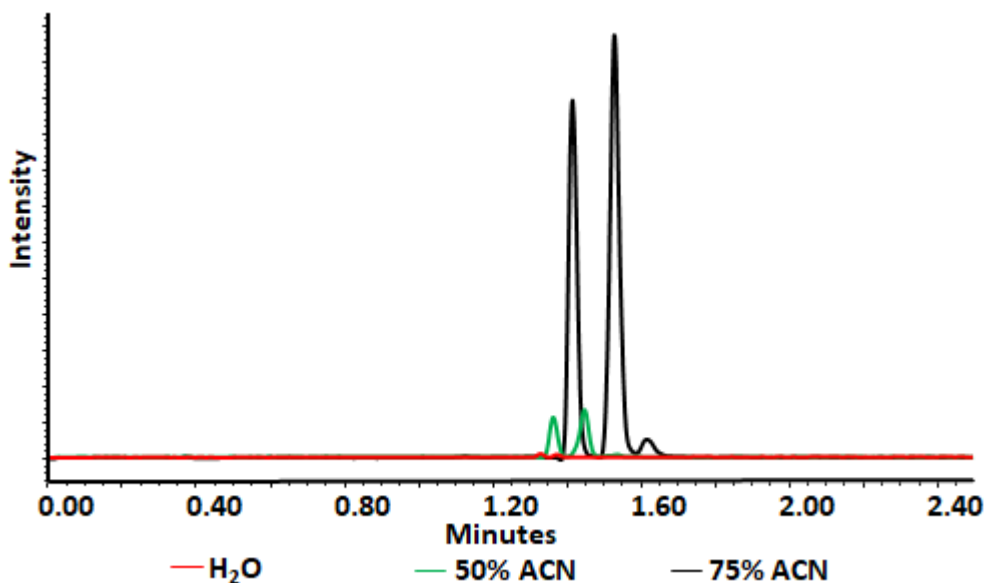
## 5.2 Úprava vzorky pomocou riedenia

### 5.2.1 Optimalizácia metódy

Na začiatok bolo potrebné vybrať vhodné rozpúšťadlo, ktorým by sa vzorky moču riedili. Pre moč ako polárnu kvapalinu by sa ako najvhodnejšie rozpúšťadlo javila práve voda pre svoju podobnosť s močom. Pre nepolárne vlastnosti mobilnej fázy použitej pri SFC je pre riedenie vzorky najvhodnejšie nepolárne organické rozpúšťadlo.

Príliš veľký rozdiel medzi polaritou vody a polaritou CO<sub>2</sub> a ich vzájomná nemiesiteľnosť je dôvodom prečo nebola voda vhodná voľba pre nariedenie vzorky analyzovanej pomocou SFC (Obr. 21). Voda sa od začiatku javila ako nevhodné rozpúšťadlo aj pre svoju vysokú viskozitu oproti CO<sub>2</sub>, pretože zmiešanie kvapalín s veľmi odlišnou hodnotou viskozity môže výrazne narušiť integritu píku. Nízka odozva píkov taktiež vyplýva z nerozpustnosti vitamínu E vo vode.

Ako ďalšie rozpúšťadlo bol testovaný 50% a 75% ACN pre svoju nízku viskozitu podobnú CO<sub>2</sub>. Najvyššia odozva β-T a γ-T bola po zriedení vzorky pomocou 75% ACN. Vyššia polarita 50% ACN oproti 75% ACN sa na chromatograme prejavila v zmene retencie. Ako najvhodnejšie rozpúšťadlo pre riedenie vzoriek vitamínu E v moči bol vybraný práve 75% ACN, ktorý je vďaka svojim vlastnostiam vhodný kompromis jak pre nepolárnu MF, tak pre polárny moč.

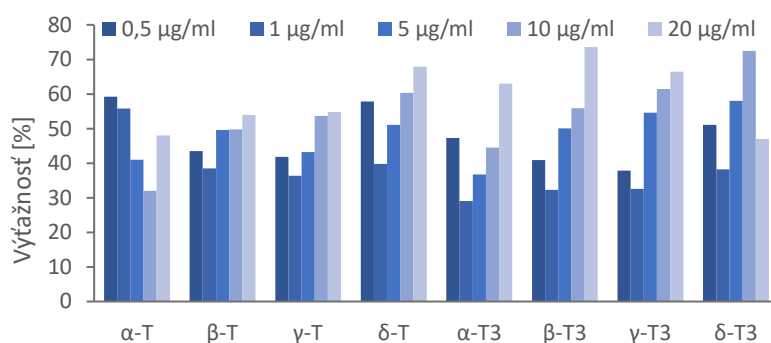


Obr. 21: Porovnanie vplyvu rozpúšťadiel na tvar píku pre β- a γ-T za podmienok HS.

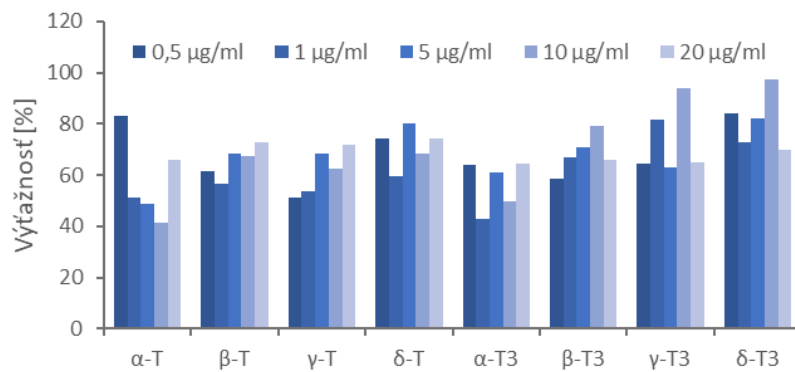
### 5.2.2 Vplyv riedenia na ME

Moč bol nariedený 10, 20, 50 a 100 násobne 75% ACN na piatich koncentračných hladinách (20, 10, 5, 1 a 0,5 µg/ml). Z výsledkov meraní bola vypočítaná výťažnosť takto riedených vzoriek vzhľadom ku štandardnému roztoku pre každý derivát zvlášť pri použití HR aj HS metódy.

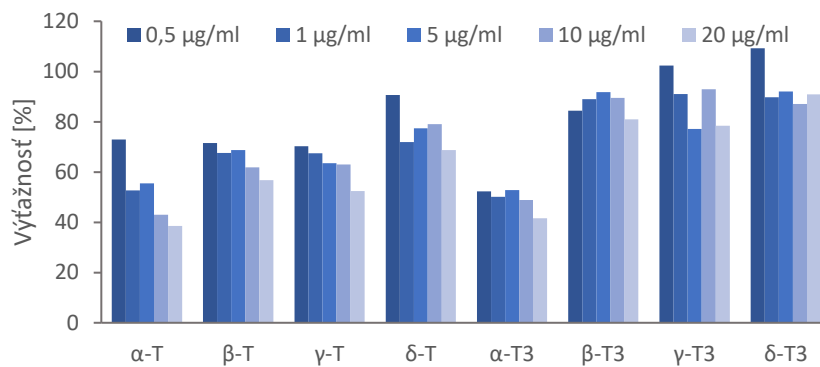
Na nasledujúcich grafoch (Obr. 22-25) je možné vidieť, že za použitia HS pri 10 násobnom zriedení, u žiadneho derivátu nebol dosiahnutý výťažok väčší ako 80%, z čoho vyplýva, že v nariedenom moči sa vyskytuje interferujúca látka, ktorá znižuje signál všetkých derivátov vitamínu E, prejavil sa matricový efekt. Až pri 50 násobnom zriedení dosiahol  $\gamma$  a  $\delta$ -T<sub>3</sub> výťažnosť nad 100% pri koncentrácií 0,5 µg/ml, toto zriedenie však nepostačovalo na 100% výťažnosť aj u ostatných derivátov. Ďalej bol moč zriedený až stonásobne, pri tomto zriedení sa ukázali najmenšie matricové efekty. Dobrá výťažnosť sa však prejavila len u dvoch derivátov pri koncentrácií 0,5 µg/ml, u ostatných derivátov boli hodnoty výťažnosti stále pod 100%. Aj keď boli koncentrácie vitamínu E vyššie, výťažnosť nedosiahla potrebné hodnoty u všetkých stanovovaných derivátov. Žiadnym nariedením vzorky analyzovanej za HS podmienok sa nepodarilo matricové efekty úplne odstrániť.



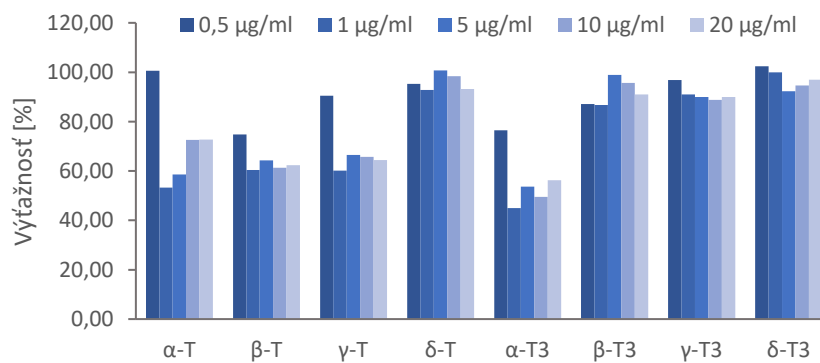
Obr. 22: Výsledky analýzy vzoriek moču po 10 násobnom zriedení pri použití HS metódy



Obr. 23: Výsledky analýzy vzoriek moču po 20 násobnom zriedení pri použití HS metódy



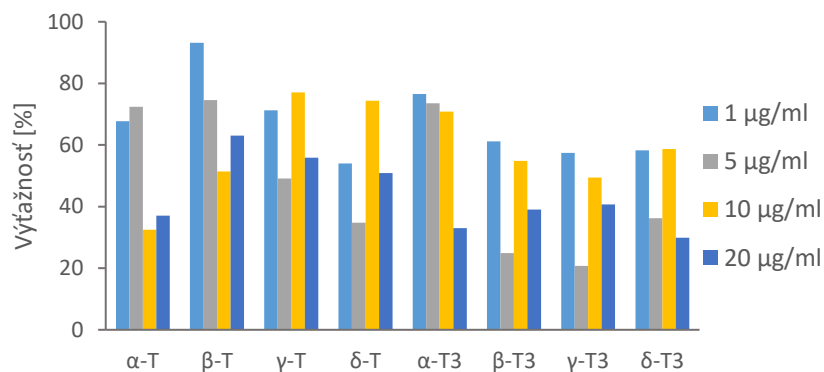
Obr. 24: Výsledky analýzy vzoriek moču po 50 násobnom zriedení pri použití HS metódy



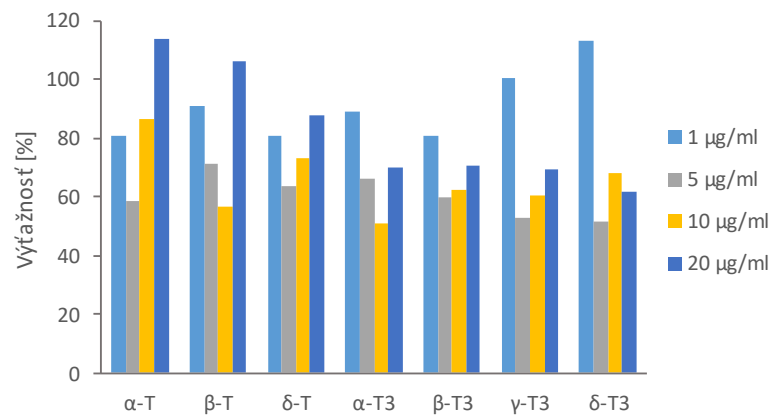
Obr. 25: Výsledky analýzy vzoriek moču po 100 násobnom zriedení pri použití HS metódy.

V druhom kroku boli vzorky analyzované za HR podmienok (Obr. 26-29). Na grafe 10 násobného zriedenia je vidieť, že toto zriedenie neposkytlo 100% výťažnosť ani u jedného z derivátov. Z ďalších grafov vyplýva, že so zvyšujúcim sa zriedením, stúpala výťažnosť derivátov, teda klesal vplyv maticového efektu. 50 násobné zriedenia bolo najvhodnejšie pri koncentráciách 20 µg/ml, kde bola výťažnosť v priemere 113%. Ani po 100 násobnom zriedení sa nepodarilo dosiahnuť 100% výťažnosť u všetkých

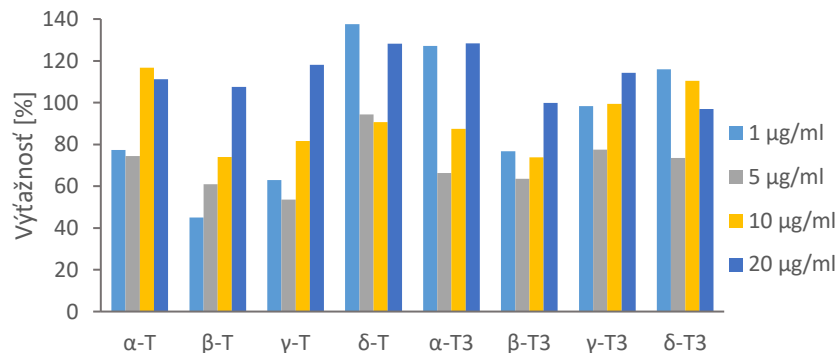
derivátov na všetkých koncentračných hladinách. Najlepšie výsledky po 100 násobnom zriedení sa ukázali v prípade, keď bola koncentrácia T a T<sub>3</sub> 10 µg/ml. Nižšie koncentrácie T a T<sub>3</sub> v moči (ako skúšaných 0,5 µg/ml) boli po stonásobnom zriedení také nízke, že sa nedali vôbec detekovať. Z uvedeného vyplýva, že úprava vzorky riedením pri HR metóde je vhodná, ak je koncentrácia vitamínu E v moči ≥ 10 µg/ml. Vzhľadom k obvyklým koncentráciám tokoferolov a citlivosti metódy nebolo možné skúsiť väčšie zriedenie.



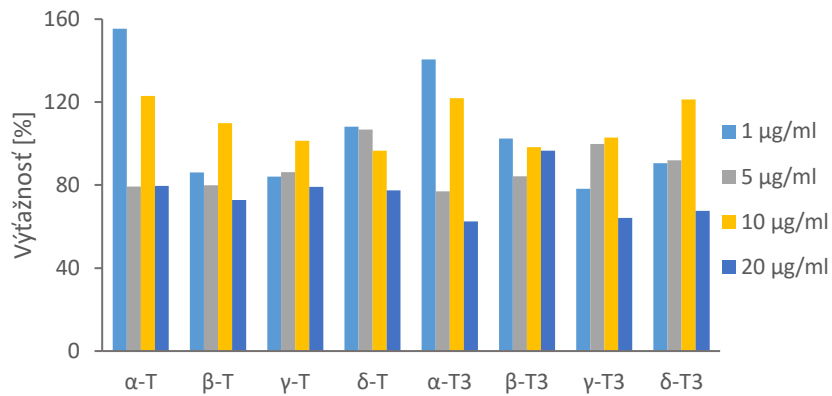
Obr. 26: Výsledky analýzy vzoriek moču po 10 násobnom zriedení pri použití HR metódy.



Obr. 27: Výsledky analýzy vzoriek moču po 20 násobnom zriedení pri použití HR metódy.



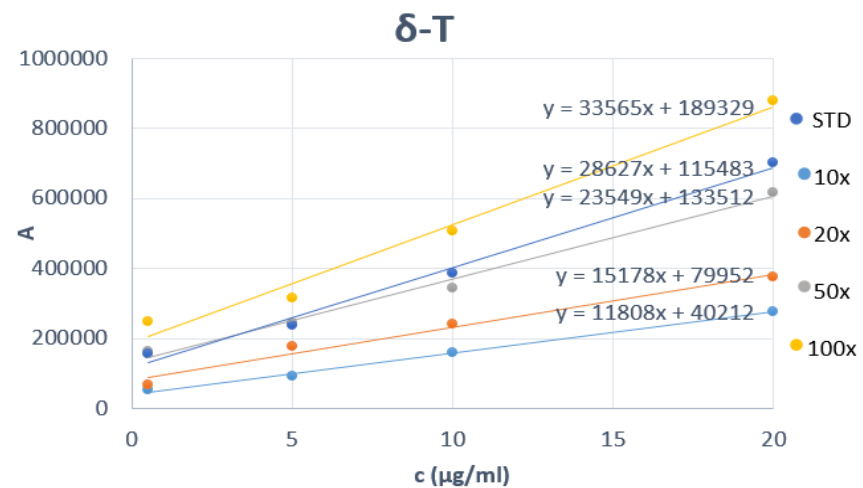
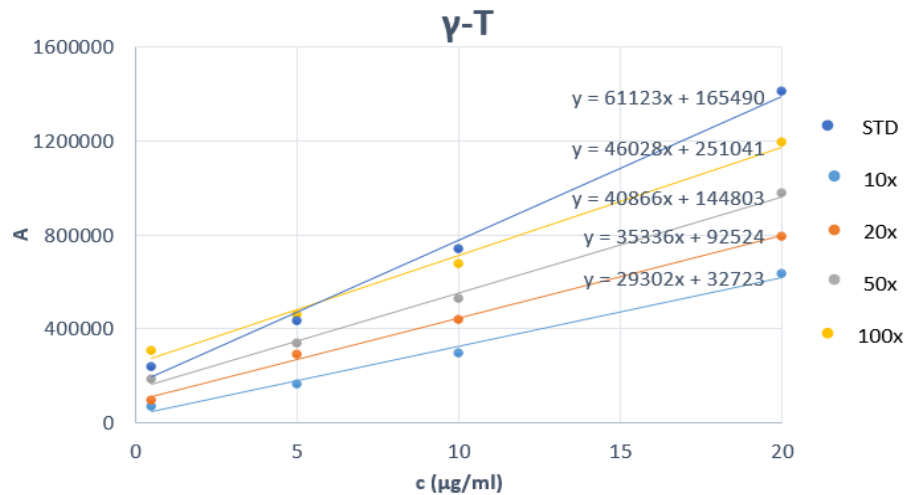
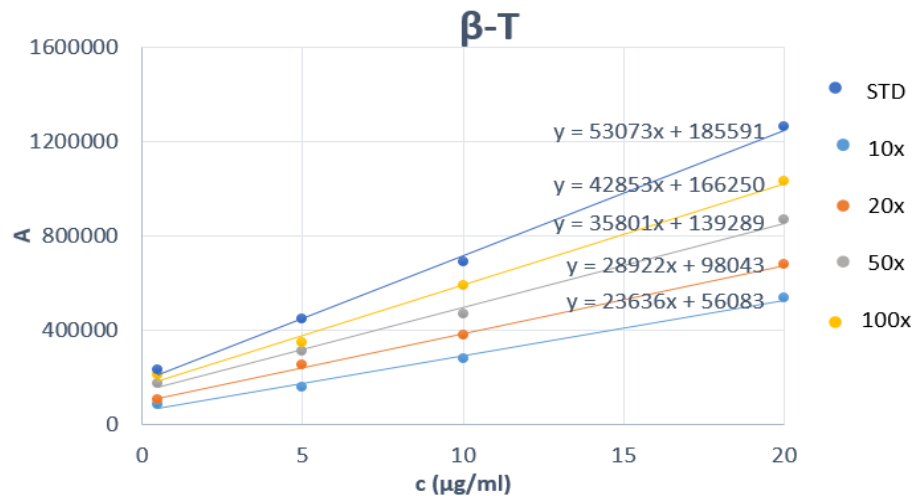
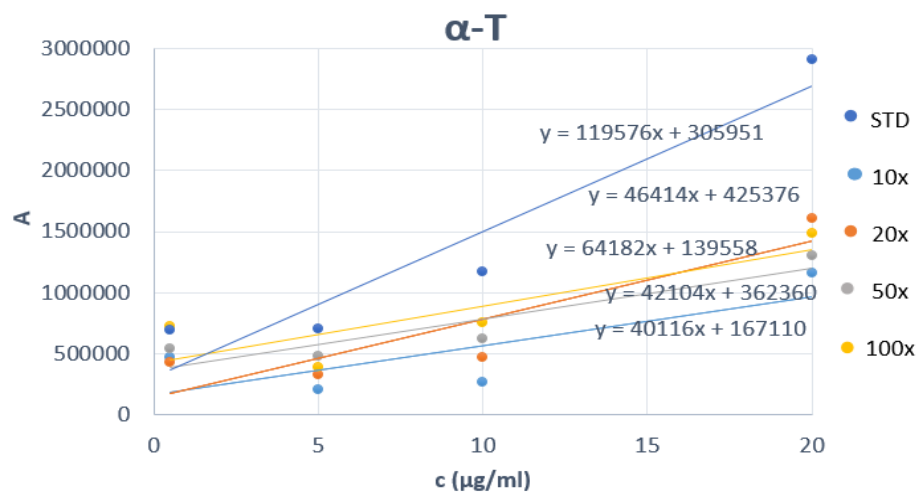
Obr. 28: Výsledky analýzy vzoriek moču po 50 násobnom zriedení pri použití HR metódy.



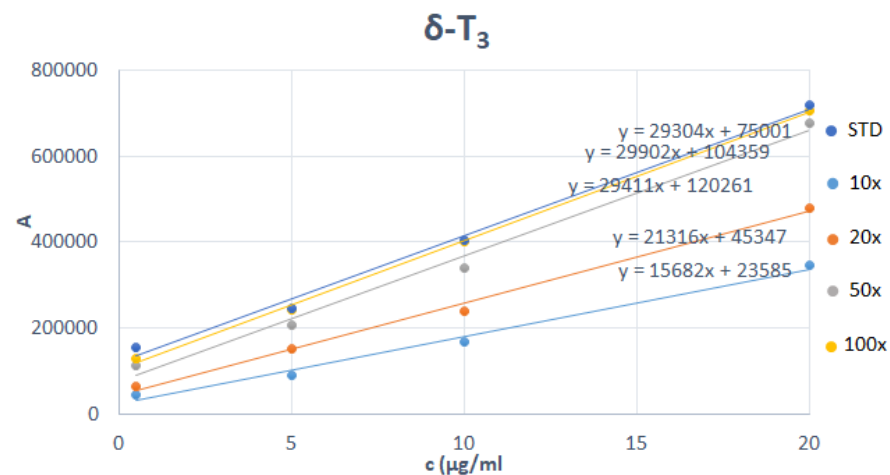
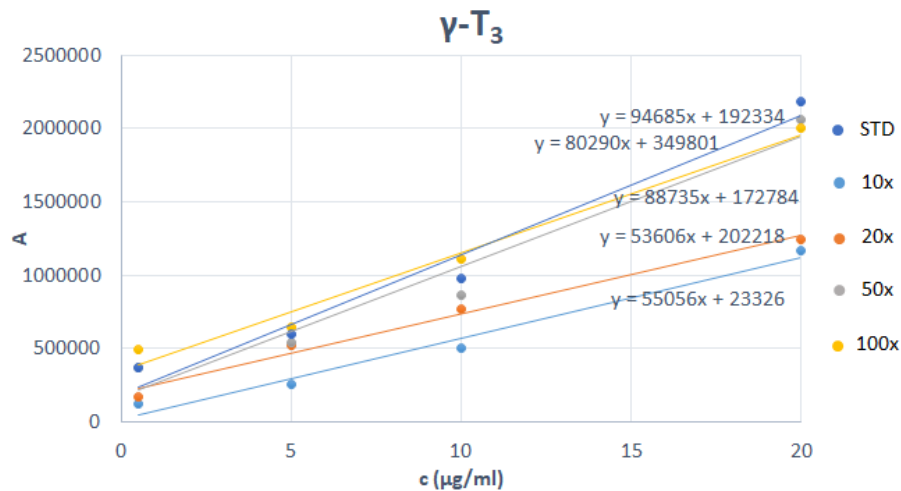
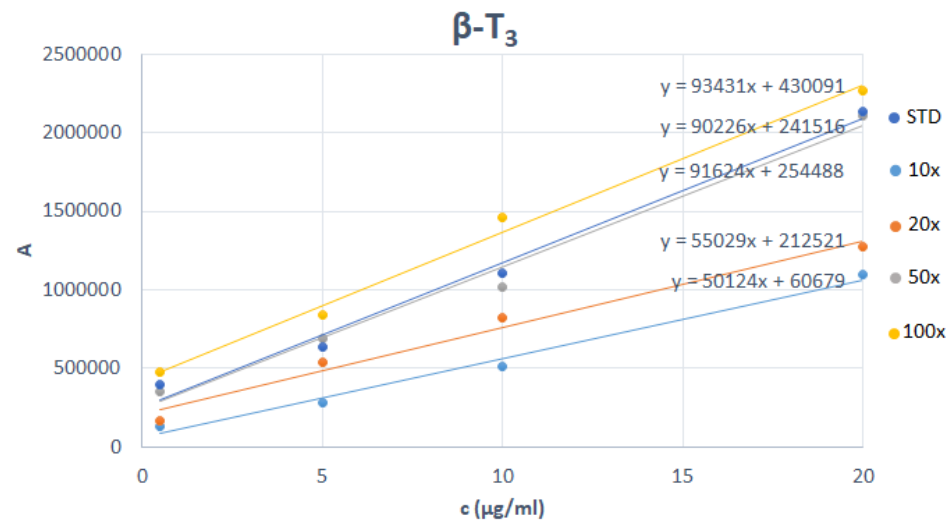
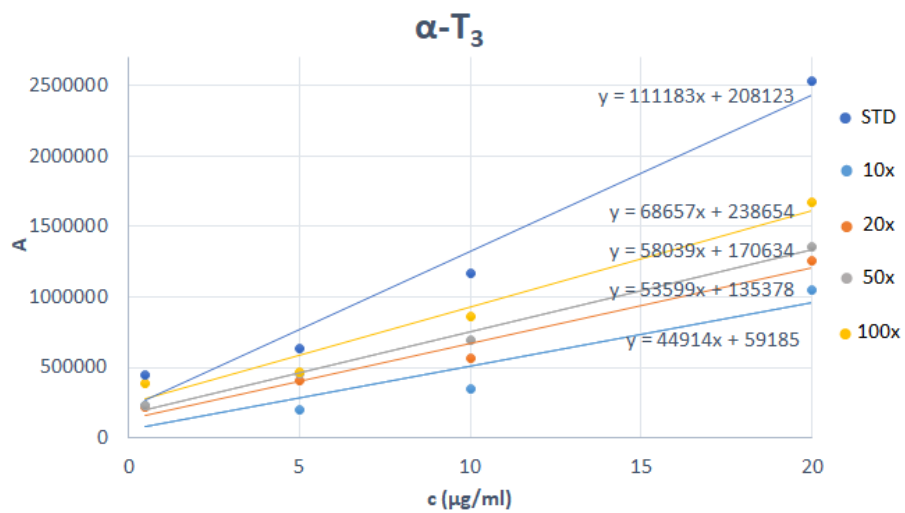
Obr. 29: Výsledky analýzy vzoriek moču po 100 násobnom zriedení pri použití HR metódy.

Matricové efekty boli taktiež spočítané podľa smernice kalibračných kriviek (Obr. 30 a 31), ktoré zobrazujú vplyv riedenia matrice na veľkosť plochy píku pri koncentráciách 0,5 μg/ml, 1 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml a 20 μg/ml. ME môžu ovplyvniť jak kvalitu, tak kvantitu analýzy, preto je podľa EMA stanovená tolerancia RSD faktoru matrice na  $\pm 15\%$  [61].





Obr. 30: Kalibračné krivky tokoferolov pri HS podmienkach.



Obr. 31: Kalibračné krivky tokotrienolov pri HS podmienkach.

Zo smerníc kalibračných kriviek ( $y = ax + b$ ) STD boli pre každý derivát zvlášť po 10, 20, 50 a 100 násobnom zriedení vyrátané ME. Smernica STD bola považovaná za 100%.

100% ..... smernica STD

$x\%$  ..... smernica meraného zriedenia

$$x - 100 = \mathbf{ME}(\%)$$

Tab. 6 dokazuje, že ani 100 násobné zriedenie vzorky u metódy HS a HR, nestačilo na to, aby boli matricové efekty odstránené. 10 a 20 násobné zriedenie nedokázalo ME odstrániť ani u jednej z použitých metód. Rozdiel medzi výsledkami matricových efektov pri HS a HR metóde vysvetľuje ich odlišné zloženie MF, ale aj odlišné poradie elúcie derivátov. Zmena MF vyvoláva zmenu retenčných časov analytov a zložiek matrice, ktoré budú v danom čase eluovať. S analytom tak mohla reagovať iná časť matrice, ktorej odozva v iónovom zdroji bola iná, tým pádom aj ME boli za podmienok HS odlišné od tých, ktoré boli stanovené za HR podmienok.

Tab. 5: Percentuálne vyjadrenie matricových efektov v moči za HS a HR podmienok po ich nariedení vyrátaných metódou porovnania smerníc kalibračných kriviek.

Matricové efekty									
HS	Zriedenie [%]				HR	Zriedenie [%]			
	10x	20x	50x	100x		10x	20x	50x	100x
$\alpha$ -T	-66,4	-46,3	-64,8	-61,2	$\alpha$ -T	-59,3	-20	50,4	8,4
$\beta$ -T	-55,5	-45,5	-32,5	-19,3	$\beta$ -T	-16,1	-10,8	27,9	65
$\gamma$ -T	-52	-42,2	-33	-24,6	$\gamma$ -T	-28	-23,2	28,6	28,5
$\delta$ -T	-58,7	-46,9	-17,7	17	$\delta$ -T	-21,8	-29,7	43,2	8,1
$\alpha$ -T <sub>3</sub>	-59,6	-51,8	-47,8	-38,2	$\alpha$ -T <sub>3</sub>	-60,9	-60,8	38,9	-7
$\beta$ -T <sub>3</sub>	-45,3	-40	-1,5	1,9	$\beta$ -T <sub>3</sub>	-34,6	-35,3	4,1	29,8
$\gamma$ -T <sub>3</sub>	-41,8	-43,3	-6,2	-15,2	$\gamma$ -T <sub>3</sub>	-40,2	-42,7	7,8	-38,9
$\delta$ -T <sub>3</sub>	-46,6	-27,5	-0,36	1,6	$\delta$ -T <sub>3</sub>	-56,6	-44	-13	-34,9

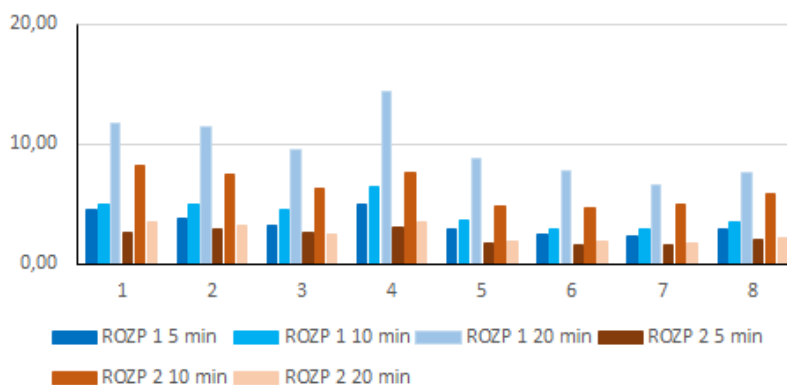
## 5.3 Úprava vzorky pomocou extrakcie z kvapaliny do kvapaliny

### 5.3.1 Optimalizácia metódy

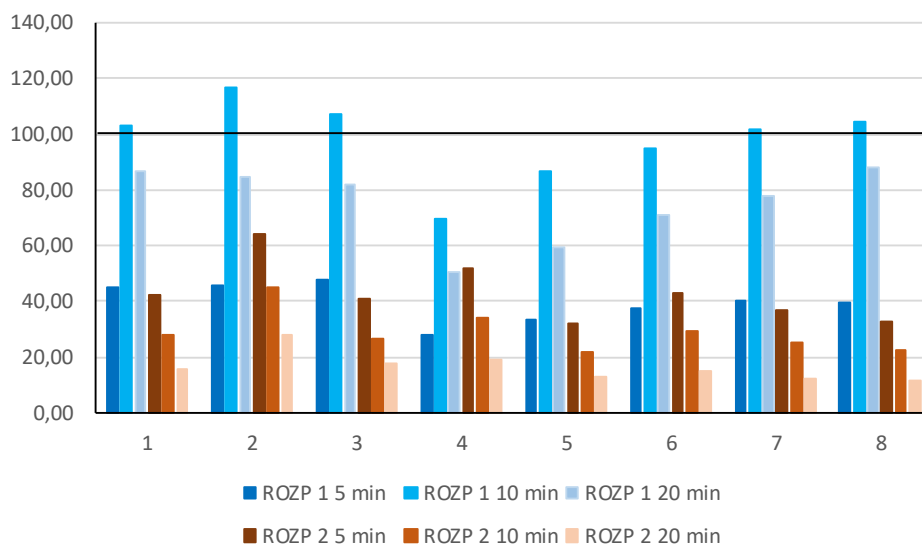
Na začiatku optimalizácie metódy úpravy vzorky pomocou LLE bolo potrebné vybrať vhodné rozpúšťadlo, v ktorom by sa extrahovaná zložka t.j. nepolárne deriváty vitamínu E prednostne rozpúšťala. Použité boli čisté nepolárne organické rozpúšťadla a ich zmesi. Voľba rozpúšťadiel vyplývala z lipofilných vlastností derivátov, ktoré by mali prechádzať do zvoleného nepolárneho rozpúšťadla, čím by došlo k odstráneniu vplyvu matrice pri analýze. Skúšali sa čisté nepolárne rozpúšťadla ako heptan a hexan, a ich zmesi s polárnejším dichlormetanom v pomere 9:1 a 8:2.

Pri optimalizácii metódy bolo každé jedno rozpúšťadlo extrahované so vzorkou moču, ktorá obsahovala štandardy T a T<sub>3</sub> o koncentrácií 0,5 µg/ml. Vzorky boli pripravené v pomere STD:rozpúšťadlo 1:1 a 1:2, každá vzorka bola pripravená dvakrát. Následne boli vzorky na trepačke premiešané pri troch odlišných časoch (5, 10 a 20 minút). Po trepaní boli vzorky podrobené centrifugácií, kde došlo k oddeleniu organickej vrstvy obsahujúcej štandardy od polárneho moču. Z hľadiska času analýzy HS a HR metód (2,5 vs. 4,5) bola odobraná organická vrstva analyzovaná za podmienok HS metódy.

Ako najhoršia sa javila kombinácia heptanu s dichlormetanom v pomere 8:2, kedy výťažnosť nedosahovala ani 20% pri žiadnych skúšaných podmienkach (Obr. 32). O niečo lepšie výsledky boli viditeľné pri zmiešaní hexanu s dichlormetanom (8:2), keď bol čas trepania 10 minút a pomer STD:rozpúšťadlo bol 1:1, ale ani tento výsledok nebol dostačujúci (Obr. 32).

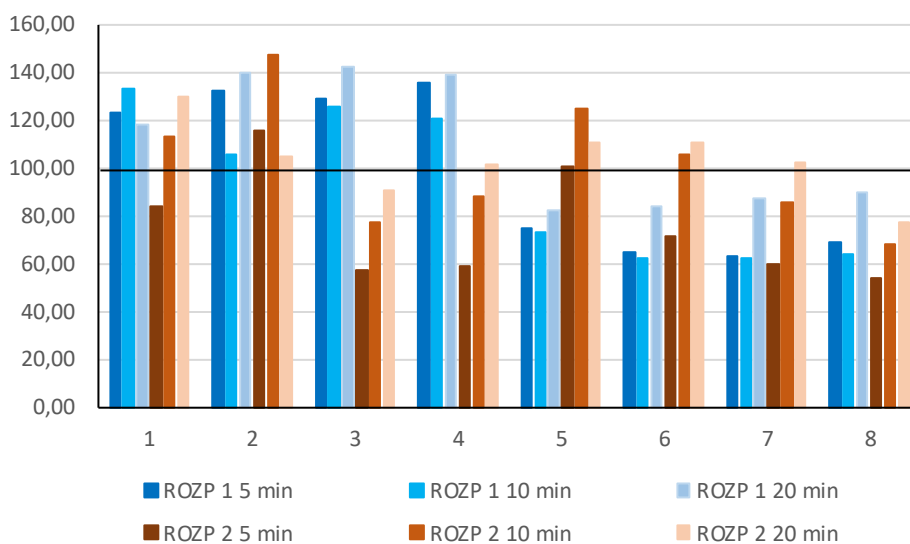


Obr. 32: Výťažnosť derivátov tokoferolov a tokotrienolov extrahovaných v rozpúšťadle heptan:dichlormetan 8:2 v pomere 1:1 a 1:2 po 5, 10 a 20 minútovom trepaní za HS podmienok.

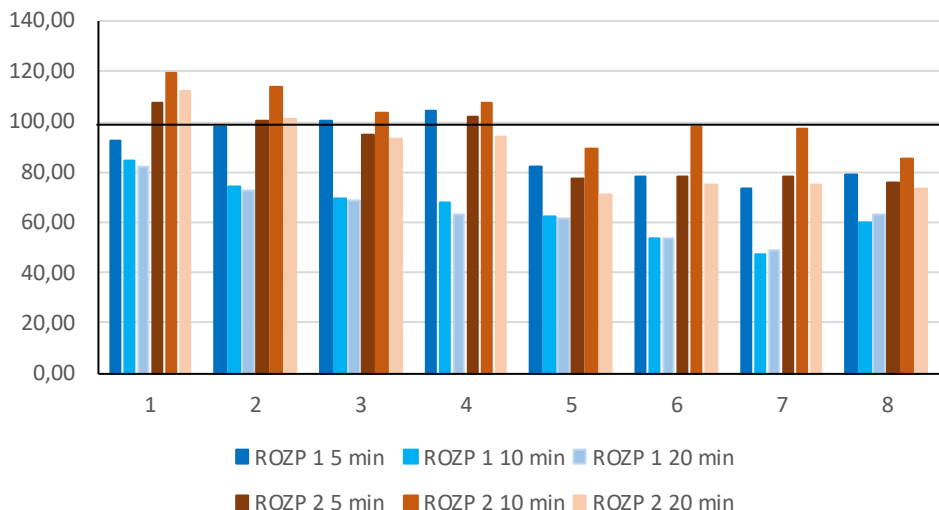


Obr. 33: Výťažnosť derivátov tokoferolov a tokotrienolov extrahovaných v rozpúšťadle hexan:dichlormetan 8:2 v pomere 1:1 a 1:2 po 5, 10 a 20 minútovom trepaní za HS podmienok.

Heptan:dichlormetan (9:1) poskytoval najlepšie výsledky u väčšiny derivátov po 20 minútovom trepaní pri použití pomeru STD:rozpúšťadlo 1:2,  $\gamma$ -T a  $\delta$ -T<sub>3</sub> nedosiahli 100% výťažnosť (Obr. 34). Zmes hexan a dichlormetan (9:1) nedokázala poskytnúť 100% výťažnosť všetkých derivátov pri žiadnych zvolených podmienkach (Obr. 35).

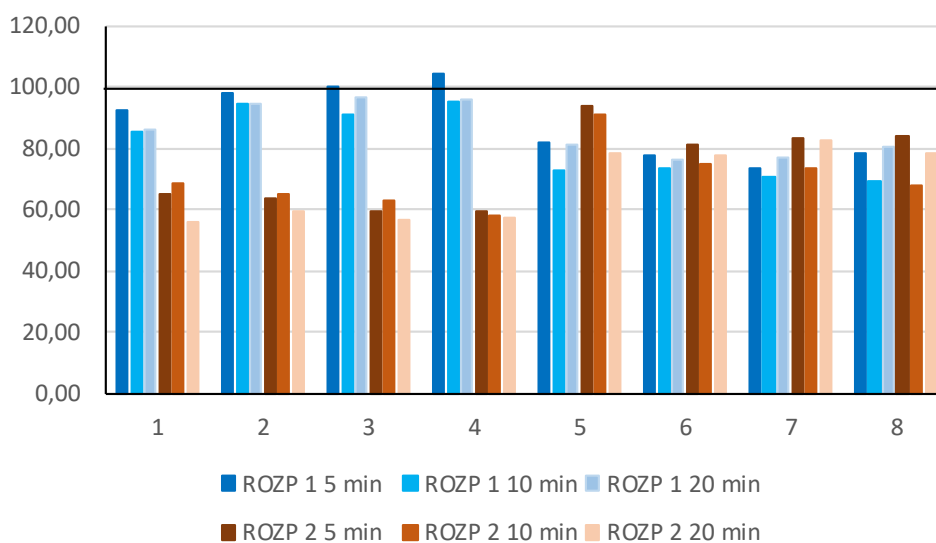


Obr. 34: Výťažnosť derivátov tokoferolov a tokotrienolov extrahovaných v rozpúšťadle heptan:dichlormetan 9:1 v pomere 1:1 a 1:2 po 5, 10 a 20 minútovom trepaní za HS podmienok.

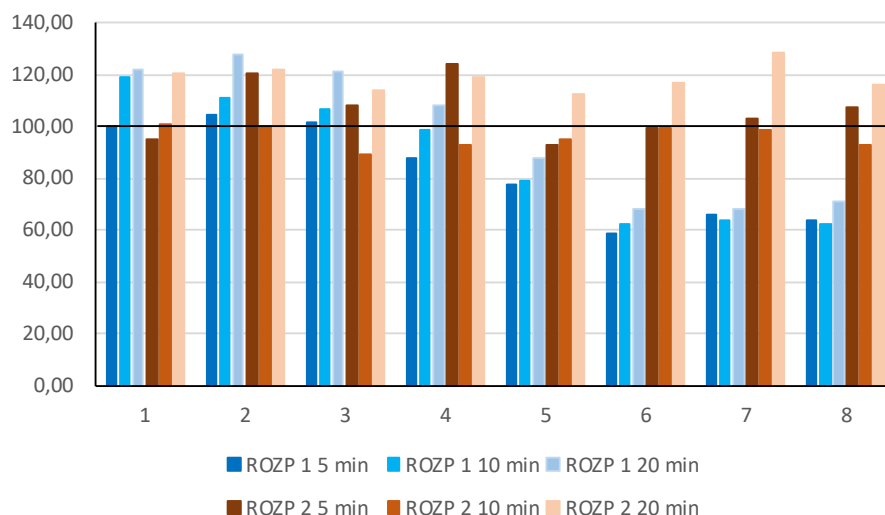


Obr. 35: Výťažnosť derivátov tokoferolov a tokotrienolov o extrahovaných v rozpúšťadle hexan:dichlormetan 9:1 v pomere 1:1 a 1:2 po 5, 10 a 20 minútovom trepaní za HS podmienok.

Pri extrahovaní hexanu do štandardu v pomere 2:1 sa výťažnosť bez ohľadu na čas trepania pohybovala v priemere okolo 70%. Zmena pomeru STD:hexan na 1:1 priniesla 100% výťažnosť iba  $\gamma$ -T po 5 minútovom trepaní. Použitie hexanu u ostatných derivátov neprinieslo dostatočnú výťažnosť (Obr.36). Pri extrahovaní štandardu s heptanom (1:2) po 5 minútovom trepaní bola výťažnosť takmer u všetkých derivátov 100%, okrem  $\beta$ - a  $\delta$ -T. Jediné podmienky, pri ktorých bola výťažnosť všetkých derivátov nad 100% bol heptan extrahovaný so štandardom v pomere 2:1 (200  $\mu$ l:100  $\mu$ l) po 20 minútovom trepaní (Obr. 37), preto bol použitý pri úprave vzorky pred analýzou ME.

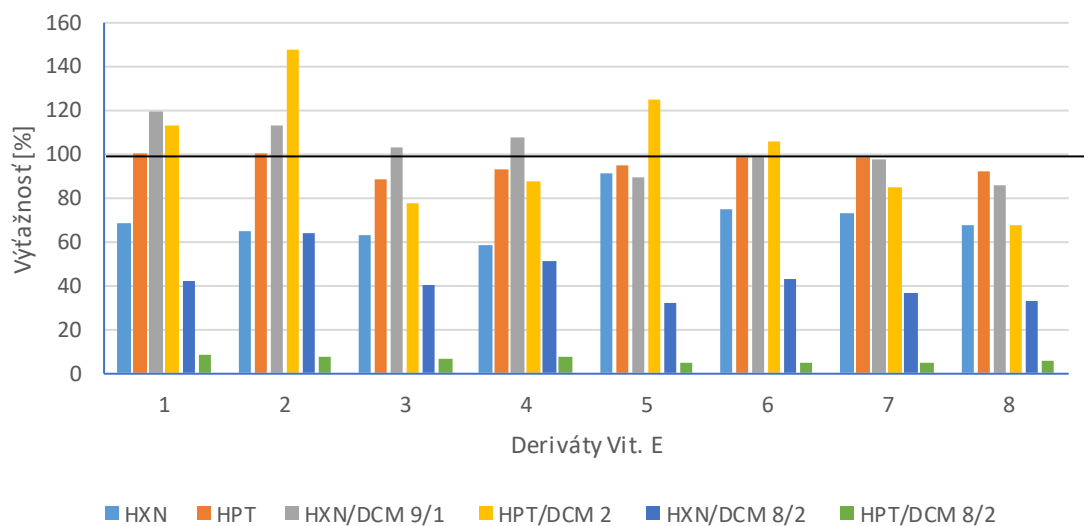


Obr. 36: Výťažnosť derivátov tokoferolov a tokotrienolov o extrahovaných v rozpúšťadle hexan v pomere 1:1 a 1:2 po 5, 10 a 20 minútovom trepaní za HS podmienok.



Obr. 37: Výťažnosť derivátov tokoferolov a tokotrienolov o extrahovaných v rozpúšťadle heptan v pomere 1:1 a 1:2 po 5, 10 a 20 minútovom trepaní za HS podmienok.

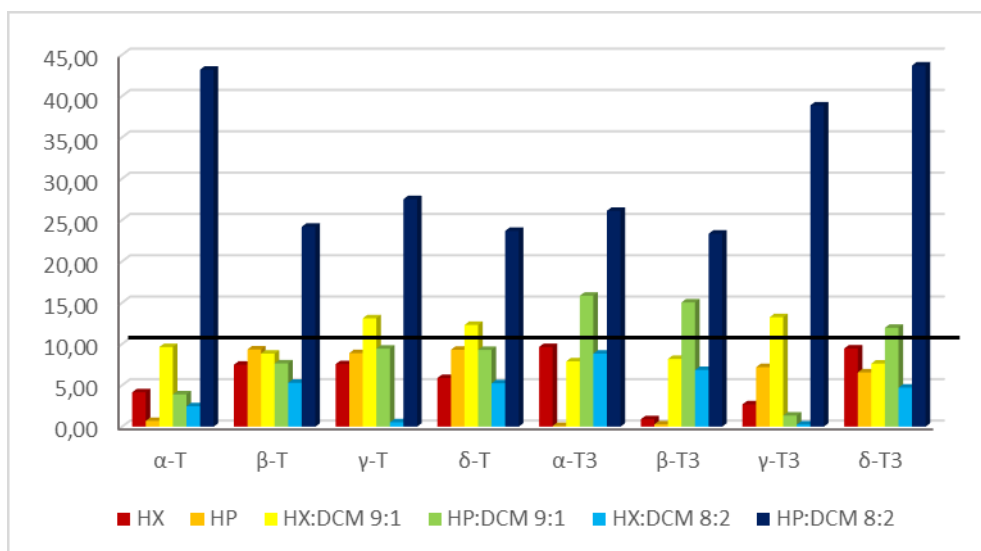
Na základe toho, že najlepšie výsledky úpravy vzorky pomocou LLE poskytoval heptan pridaný k STD (2:1) po 20 minútovom trepaní, bol vplyv jednotlivých použitých rozpúšťadiel porovnaný práve pri týchto podmienkach (Obr. 38).



Obr. 38: Porovnanie výťažnosti rozpúšťadiel pri extrakcii z kvapaliny do kvapaliny: rozpúšťadlo:STD v pomere 2:1, po 20 minútovom trepaní na trepačke za HS podmienok.

Každé rozpúšťadlo bolo aplikované na dve vzorky o rovnakej koncentracii. Na základe výsledných plôch pík boli vypočítané výťažnosti pre všetky deriváty, všetky časy trepania a oba pomery STD k rozpúšťadlu. Zároveň bola vypočítaná RSD medzi

výťažnosťami týchto dvoch vzoriek, ktorá poukazuje na opakovateľnosť pri použití daného rozpúšťadla. Za ideálne hodnoty RSD sa považuje hodnota  $\leq 10\%$ . Vhodnosť použiteľnosti skúmaných rozpúšťadiel pri 20 minútovom trepaní vzorky extrahovanej s rozpúšťadlom (1:1) zobrazuje Obr. 39, kde je vidieť, že rozpúšťadla ako HP:DCM 8:2 a HP:DCM 9:1 nemožno brať do úvahy pre ich veľký rozptyl pri opakovanom použití. Naopak RSD hexanu a heptanu je vždy pod 10%.



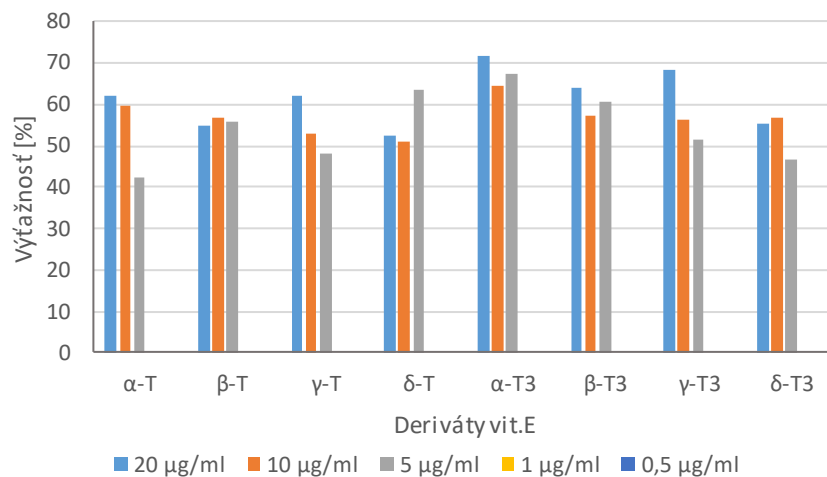
Obr. 39: RSD LLE extrakcie pri použitých rôznych rozpúšťadiel v pomere 2:1 za HS podmienok po 20 minútovom trepaní.

### 5.3.2 Vplyv LLE na ME

Po zvolení vhodného rozpúšťadla, boli pripravené vzorky moču so štandardmi na piatich rôznych koncentračných hladinách (0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Tieto vzorky boli upravené spôsobom LLE za použitia čistého heptanu ako rozpúšťadla. Heptan (200  $\mu\text{l}$ ) bol pridaný k matrici (100  $\mu\text{l}$ ) a vzorky boli podrobené 20 minútovému trepaniu a vložené do centrifugy. Následne bola organická fáza odpipetovaná a analyzovaná za HS podmienok na určenie výťažnosti a matricových efektov.

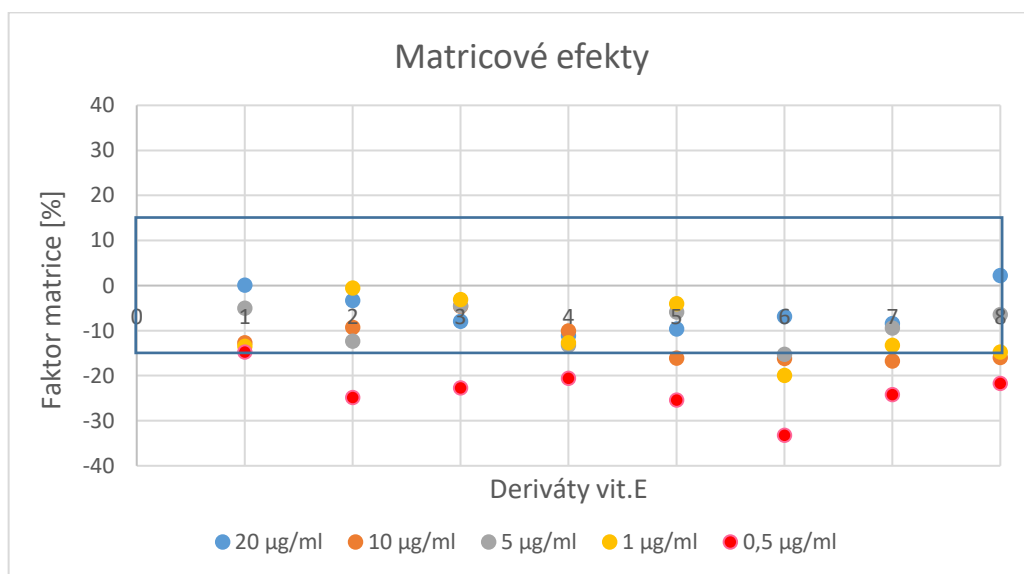
Po úprave vzorky moču obsahujúceho štandardy vitamínu E v piatich koncentračných hladinách prebehla HS analýza na stanovenie výťažnosti jednotlivých derivátov. Z Obr. 40 vyplýva, že výťažnosť derivátov bola príliš nízka a pohybovala sa v priemere okolo 57%. Nízke koncentrácie vitamínu E v moči ako sú 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a 1  $\mu\text{g/ml}$  nebolo možné z dôvodu citlivosti metódy vôbec detekovať.





Obr. 40: Výsledky analýzy vzoriek moču po úprave pomocou LLE za HS podmienok.

Z vypočítaných matricových efektov (Obr. 41) je vidieť rozdiel vplyvu ME na odozvu detektora v závislosti od koncentrácie vitamínu E v moči. Ak bola koncentrácia T a T<sub>3</sub> v moči 20 µg/ml bol efekt matrice v priemere -5% pre všetky deriváty. Pri koncentrácií 10 µg/ml efekt matrice potlačil odozvu troch derivátov o 16%. Zaujímavé výsledky nastali, keď bola koncentrácia derivátov 5 µg/ml, v tomto prípade nedošlo k ovplyvneniu odozvy o viac ako 15% pri žiadnom z derivátov, okrem δ-T (-15,25%). Výrazný vplyv matrice nebol pozorovaný ani pri koncentrácií vitamínu E v moči rovnej 1 µg/ml, k potlačeniu odozvy o 19% došlo len u β-T<sub>3</sub>. Pri koncentrácií derivátov T a T<sub>3</sub> 0,5 µg/ml bol vplyv matrice približne -23%.



Obr. 41: Výsledky vplyvu koncentrácie tokoferolov a tokotrienolov v moči na veľkosť ME po úprave vzorky LLE a analýze za HS podmienok.

## 6 Záver

V tejto práci sa podarilo potvrdiť, že HS a HR metódy sú nastavené optimálne a rýchlejšiu alebo účinnejšiu metódu sa vyvinúť nepodarilo. Najlepšie výsledky separácie derivátov vitamínu E boli dosiahnuté za podmienok: CO<sub>2</sub>:MeOH/ACN (97:3) pri prietoku 2 ml/min, nástrek 2 µl, Torus 2-PIC stacionárna fáza, teplota kolony 40°C, tlak 12,96 MPa. Čas analýzy bol 5 minút, čo je v porovnaní s HS a HR viac.

V experimentálnej časti boli vyvinuté dve metódy na úpravu vzorky moču obsahujúceho vitamín E pre metódy HS a HR. Ako prvá bola optimalizovaná metóda riedenia, v ktorej sa ako najvhodnejšie rozpúšťadlo javil 75% ACN. Pri úprave vzorky pomocou LLE boli za najvhodnejšie podmienky úpravy zvolený heptan ako rozpúšťadlo v pomere so vzorkou moču 2:1 a čas trepania 20 minút.

Na takto upravených vzorkách bol testovaný vplyv ME na odozvu detektora, kde bolo dokázané, že úprava vzorky pomocou LLE nedokázala pri koncentráciách vitamínu E v moči  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  odstrániť matricové efekty a poskytnúť dostatočnú výťažnosť derivátov pri HS analýze. Takáto úprava vzorky je vhodná pre moč obsahujúci T a T<sub>3</sub> v koncentráciách vyššej ako  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , kedy je vplyv matrice na všetky deriváty v rozmedzí  $\pm 15\%$ .

V prípade analýzy nariadenej vzorky za HS podmienok sa ani po jej stonásobnom zriedení nepodarilo dosiahnuť 100% výťažnosť pri žiadnej zo skúšaných koncentrácií. Pri analýze za HR podmienok je možné vzorky moču upraviť 50 násobným riedením v prípade, ak je koncentrácia vitamínu E nad  $20 \mu\text{g/ml}$ , alebo 100 násobným riedením, ak je vitamín E v moči prítomný v koncentráciách nad  $5 \mu\text{g/ml}$ . Vzorky s koncentráciou vitamínu E  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  sa po stonásobnom zriedení nedajú detekovať.

Z hľadiska výťažnosti jednotlivých derivátov možno úpravu vzorky pomocou riedenia považovať za lepšiu, v prípade vplyvu ME na odozvu detektora sa ako vhodnejšia javila úprava pomocou LLE. Pre vývoj optimálnej metódy úpravy vzorky by bola potrebná ďalšia optimalizácia.

## 7 Použitá literatura

1. Hong Yong Peh, W.S. Daniel Tan, Wupeng Liao, W.S. Fred Wong. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & Therapeutics*, 162 (2016), 152-169.
2. Drotleff A.M., Bohnsack Ch., Schneider I., Hahn A., Ternes W., Human oral bioavailability and pharmacokinetics of tocotrienols from tocotrienol-rich (tocopherol-low) barley oil and palm oil formulations. *Journal of Functional Food* 7 (2014), 150-160.
3. Pilařová V., Gottvald T., Svoboda P., Novák O., Benešová K., Běláková S., Nováková L., Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum. *Analytica Chimica Acta*, 934 (2016), 252-265.
4. Méjean M., Brunelle A., Touboul D., Quantification of tocopherols and tocotrienols in soybean oil by supercritical-fluid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015), 5133-5142.
5. Hampson G., Edwards S., Sankaralingam A., Harrington D.J., Voong K., Fogelman I., Frost M.L., Circulating concentrations of vitamin E isomers: Association with bone turnover and arterial stiffness in post-menopausal women. *Bone* 81 (2015), 407-412.
6. Azzi A., Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine* (2017), 1-12.
7. Sen Ch.K., Khanna S., Roy S., Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. *Molecular Aspects of Medicine* 28 (2007), 692-728.
8. Abu-Fayyad A., Behery F., Sallam A.A., Alqahtani S., Ebrahim H., El Sayed K.A., Kaddoumi A., Sylvester P.W., Carroll J.L., Cardelli J.A., Nazzal S., PEGylated c-tocotrienol isomer of vitamin E: Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 96 (2015), 185-195.
9. Kayden H.J., Traber M.G., Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *The Journal of Lipid Research* 34 (1993), 343-358.
10. Dutta Roy A.K., Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of  $\alpha$ -tocopherol: Role of tocopherol-binding protein. *Food and chemical toxicology* 37 (1999), 967-971.

11. Rupérez F.J., Martín D., Herrera E., Barbas C., Chromatographic analysis of  $\alpha$ -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A* 935 (2001), 45-69.
12. E. Ibanez, J. Palacios, G. Reglero, Analysis of tocopherols by on-line coupling supercritical fluid extraction - supercritical fluid chromatography, *Journal of Microcolumn Separation* 11 (1999), 605-611.
13. P. Manninen, P. Laakso, H. Kallio, Method for characterization of triacylglycerols and fat-soluble vitamins in edible oils and fats by supercritical fluid chromatography, *Journal of American Oil Chemists Society* 72 (1995) 1001-1008.
14. G. Galuba, M. Gogolewski, Separation of tocopherols and sterols in soybean oil condensate utilizing supercritical fluid chromatography, *Chem. Anal. Wars.* 42 (1997) 245-248.
15. M. M\_ejean, A. Brunelle, D. Touboul, Quantification of tocopherols and tocotrienols in soybean oil by supercritical-fluid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 5133-5142.
16. P.T. Gee, C.Y. Liew, M.C. Thong, M., C.L. Gaym, Vitamin E analysis by ultraperformance convergence chromatography and structural elucidation of novel  $\alpha$ -tocodienol by high-resolution mass spectrometry, *Food Chemistry* 196 (2016), 367-373.
17. M.P.S. Andr\_es, J. Otero, S. Vera, High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/npropanol in mobile phase, *Food Chemistry* 126 (2011) 1470-1474.
18. H.M. Pinheiro-Sant'Ana, M. Guinazi, D. da Silva Oliviera, C.M.D. Lucia, B. de Lazzari Reis, S.C.C. Brandao, Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 8496-8502.
19. N. Grebenstein, J. Frank, 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* 1243 (2012) 39-46.
20. K. Knecht, K. Sandfuchs, S.E. Kulling, D. Bunzel, Tocopherol and tocotrienol analysis in raw and cooked vegetables: a validated method with emphasis on sample preparation, *Food Chemistry* 169 (2015) 20-27.
21. P. Vinas, M. Bravo-Bravo, I. Lopez-García, M. Pastor-Belda, M. Hernandez-Cordoba, Pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for determination of tocopherols and tocotrienols in plant foods by liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection, *Talanta* 119 (2014) 98-114.

22. B. Shammugasamy, Y. Ramakrishnan, H.M. Ghazali, K. Muhammad, Combination of saponification and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1300 (2013) 31-37.
23. J.L. Ch\_avez-Servín, A.I. Castellote, M.C. Lop\_ez-Sabater, Simultaneous analysis of Vitamins A and E in infant milk-based formulae by normal-phase high performance liquid chromatography-diode array detection using a short narrowbore column, *Journal of Chromatography A* 1122 (2006) 138-143.
24. S.-H. Huang, L.-T. Ng, An improved high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and  $\gamma$ -oryzanol in rice, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 4709-4713.
25. C. Yuan, M. Burgyan, D.R. Bunch, E. Reineks, R. Jackson, R. Steinle, S. Wang, Fast, simple, and sensitive high-performance liquid chromatography method for measuring vitamins A and E in human blood plasma, *Journal of Separation Science* 37 (2014) 2293-2299.
26. M. Richelle, I. Tavazzi, L.B. Fay, Simultaneous determination of deuterated and non-deuterated  $\alpha$ -tocopherol in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 794 (2003) 1-8.
27. P.F. Chatzimichalakis, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B* 805 (2004) 89-296.
28. Pérez-Fernández V., Spagnoli M., Rocco A., Aturki Z., Sciubba F., De Salvador F.R., Engel P., Curini R., Gentili A., Non-aqueous reversed-phase liquid-chromatography of tocopherols and tocotrienols and their mass spectrometric quantification in pecan nuts. *Journal of Food Composition and Analysis* 64 (2017), 171-180.
29. Nagy Z., Daood H., Koncsek A., Molnár H., Helyes L., The simultaneous determination of capsaicinoids, tocopherols, and carotenoids in pungent pepper powder. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 40 (2017), 199-2019.
30. Poole C.F., *Liquid chromatography: Applications, Volume 2.* (2017) ISBN: 978-0-12-805392-8.
31. Nováková L., Vlčková H., A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 656 (2009), 8-35.
32. Kovaříková Petra, *Bioanalýza léčiv I.-bioanalytické metody [Prezentácia]*.
33. Souverain S., Rudaz S., Veuthey J.-L., Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004), 913-920.

34. Niu Z., Zhang W., Yu Ch., Zhang J., Wen Y., Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends in Analytical Chemistry* 102 (2018), 123-146.
35. Svoboda P., Matricové efekty v LC-MS analýze: vznik, hodnocení a jejich odstranění. *Disertační práce* (2017).
36. Yang J., Zhu L., Yang Z., Yongwei X., Qinglong S., Shuchen L., Chao L., Baiping M., Separation of furostanol saponins by supercritical fluid chromatography. *Journal of Pharmaceutical nad Biomedical Analysis*, 145 (2017), 71-78.
37. Desfontaine V., Guillarme D., Francotte E., Nováková L., Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113 (2015),56-71.
38. Tarafder A., Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: An Overview. *Trends in Analytical Chemistry*, 81 (2016), 3-10.
39. Muneo S., History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115 (2013), 590-599.
40. Taylor L.T., Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47 (2009), 566-573.
41. Arpino P.J., Haas P., Recent developments in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry coupling. *Journal of Chromatography A*, 703 (1995), 479-488.
42. Guiochon G., Tarafder A., Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 1037-1114.
43. Nováková L., Grand-Guillaume Perrenoud A., Francois I., West C., Lesellier E., Guillarme D., Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 $\mu$ m particles: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 824 (2014), 18-35.
44. Galea Ch., Mangeling D., Heyden I.V., Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. *Analytica Chimica Acta*, 886 (2015), 1-15.
45. Waters.com. SFC columns.  
Dostupné z: [http://www.waters.com/waters/en\\_IL/SFC-Columns---Trefoil%2C-Torus%2C-Viridis-nav.htm?cid=134696052&locale=en\\_IL](http://www.waters.com/waters/en_IL/SFC-Columns---Trefoil%2C-Torus%2C-Viridis-nav.htm?cid=134696052&locale=en_IL) [online 20.3.2018].
46. Speybrouck D., Lipka E., Preparative supercritical fluid chromatography: A powerful tool for chiral separations. *Journal of Chromatography A*, 1467 (2016), 33-55.
47. Berger T.A., Instrumentation for analytical scale supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1421 (2015), 171-183.
48. Berger T.A., Supercritical fluid chromatography [Prezentácia] 2015.

49. Lesellier E., West C., The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. *Journal of Chromatography A*, 1382 (2015), 2-46.
50. K. Jinno., *Techniques in Supercritical Fluid Chromatography and Extraction* (1992), ISBN 0-444-88794-6.
51. De Klerck K., Mangelings D., Heyden Y.V., Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69 (2012), 77-92.
52. Berger T.A., Berger B.K., Minimizing UV noise in supercritical fluid chromatography. I. Improving back pressure regulator pressure noise. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 2320-2326.
53. Qian X., Zhang Q., Lu X.Q., Yu Q., Ni K., Zhang Ch., Wang X.H., Development of electrospray/photoionization miniature ion trap mass spectrometer. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45 (2017), 1096-1101.
54. Combs M.T., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T., Packed column supercritical fluid chromatography – mass spectroscopy: A review. *Journal of Chromatography A*, 785 (1997), 85-100.
55. Holpaček M. Hmotnostní analyzátor.  
Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf) [online 05.04.2018].
56. Docplayer.cz. Molekulární modelování a bioinformatika. Hmotnostní spektrometrie I. Dostupné z: <http://docplayer.cz/45066844-Molekularni-modelovani-a-bioinformatika-motnostni-spektrometrie-i.html> [online 05.04.2018].
57. Fairchild J.N., Hill J.F., Iraneta P.C., Influence of sample solvent composition for SFC separations. *LC-GC North America* 3 (2013), 326-333.
58. Desfontaine V., Tarafder A., Hill J., Fairchild J., Grand-Giillaume Perrenoud A., Veuthey J.L., Guillarme D., A systematic investigation of sample diluents in modern supercriticalfluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1511 (2017), 122-131.
59. Desfontaine V., Capetti F., Nicoli R., Kuuranne T., Veuthey J.L., Systematic evaluation of matrix effects in supercritical fluid chromatography versus liquid chromatography coupled to mass spectrometry for biological samples. *Journal of Chromatography B*, 1079 (2018), 51-61.
60. Zhou W., Yang S., Wang P.G., Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis* 9 (2017), 1839-1844.
61. European medicines agency, *Guideline on bioanalytical method validation* (2011).