

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza vybraných sacharidů pomocí HPLC-
ELSD**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Rostislav Halouzka
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	7. 5. 2012

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

/vlastnoruční podpis/

Poděkování:

Chtěl bych především poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za odborné vedení, čas a především trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat všem pracovníkům a spolužákům z katedry biochemie za jejich ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Rostislav Halouzka
Název práce	Analýza vybraných sacharidů pomocí HPLC-ELSD
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na analýzu sacharidů pomocí systému HPLC-ELSD a určení množství laktosy v reálném vzorku mléka za zjištěných optimalizovaných podmínek nastavení přístrojového vybavení a příslušného detektoru. Teoretická část se především zabývá sacharidy, jejich výskytu, struktuře, složení a rozdělení. Je zde věnována kapitola také nanočásticím, enzymu laktase, který štěpí vazby v laktose. Mimo jiné teoretická část obsahuje popis metody, která slouží k separaci a detekci sacharidů - HPLC-ELSD. Experimentální část je věnována nalezení optimálních podmínek pro separaci a detekci laktosy, galaktosy a glukosy v reálném vzorku mléka a stanovení operační stability enzymu laktasy imobilizovaného na mikročásticích chitosanu se zabudovanými magnetickými jádry.

Klíčová slova	sacharidy, HPLC, ELSD, HILIC, nanočástice, laktasa
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Rostislav Halouzka
Title	Analysis of selected saccharides by HPLC-ELSD
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2012

Abstract

This bachelor thesis is focused on analysis of a carbohydrates by HPLC-ELSD and lactose determination in milk under optimized conditions. A theoretical part deals with saccharides, their occurrence, structure, composition and distribution. In addition, there is a chapter devoted to lactase, which cleaves lactose bonds and nanoparticles. Moreover, the theoretical part contains description of the method used for the separation and detection of carbohydrates - HPLC-ELSD. The experimental part consists of the method development and optimization of ELSD detector settings, lactose determination and assesment of operation stability of the enzyme lactase immobilized on chitosan microparticles with built-in magnetic core.

Keywords	carbohydrates, HPLC, ELSD, HILIC, nanoparticles, lactase
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Cíle práce	7
2. Úvod	8
3. Teoretická část.....	9
3. 1. Monosacharidy	9
3. 1. 1. Struktura monosacharidů	9
3. 1. 2. Reakce monosacharidů	10
3. 2. Oligosacharidy	11
3. 3. Polysacharidy	12
3. 4. β -D-galaktosidasa	13
3. 4. 1. Původ β -D-galaktosidasa	13
3. 4. 2. Vlastnosti β -D-galaktosidasa	14
3. 4. 3. Laktosová intolerance	14
3. 4. 4. Imobilizace β -D-galaktosidasy.....	15
3. 4. 4. 1. Fyzikální adsorpce	16
3. 4. 4. 2. Zachycení v gelu	16
3. 4. 4. 3. Imobilizace kovalentní vazbou.....	16
3. 5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	17
3. 6. Úvod do hydrofilní interakční chromatografie	19
3. 6. 1. Kolony s nemodifikovaným silikagelem	22
3. 6. 2. Amino-modifikované kolony	22
3. 6. 3. Amido-modifikované kolony	22
3. 6. 4. Podmínky pro HILIC separaci	23
3. 6. 5. Porovnání HILIC s NP-LC a RP-LC	23
3. 7. Detektor ELSD.....	24
3. 7. 1. Mechanismus ELSD.....	24
3. 7. 2. Srovnání ELSD s jinými detektory	27
3. 8. Nanočástice a mikročástice	27
3. 8. 1. Vlastnosti magnetických nanočástic.....	28
3. 8. 2. Příprava magnetických nanočástic.....	28
3. 8. 3. Využití nanočástic a mikročástic	29
4. Experimentální část.....	30
4. 1. Materiály a chemikálie	30
4. 2. Přístroje	30
4. 3. Metody.....	31

4. 3. 1. Příprava standardních roztoků sacharidů	31
4. 3. 2. Srážení tuků a proteinů z mléka.....	31
4. 3. 3. Vývoj HPLC-ELSD metody.....	31
4. 3. 4. Optimalizace odezvy detektoru	32
4. 3. 5. Určení analytických parametrů metody	32
4. 3. 6. Stanovení operační stability enzymu.....	32
4. 4. Výsledky a diskuze.....	33
4. 4. 1. Vývoj HPLC-ELSD metody analýzy jednoduché směsi sacharidů.....	33
4. 4. 2. Teplotní optimalizace ELS detektoru.....	35
4. 4. 3. Optimalizace průtoku plynu ELSD	36
4. 4. 4. Určení analytických parametrů metody	36
4. 4. 5. Stanovení množství laktosy v reálném vzorku mléka	37
4. 4. 6. HILIC separace substrátu a produktů enzymové reakce v reálném vzorku mléka	38
4. 4. 7. Porovnání obsahu laktosy v mléku o rozdílné koncentraci tuků.....	38
4. 4. 8. Stanovení operační stability enzymu.....	40
5. Závěr.....	41
6. Seznam použité literatury a elektronických odkazů	42
7. Seznam použitých zkratk	46

1. Cíle práce

- Provést literární rešerši na téma sacharidy, metody stanovení sacharidů, HPLC, ELSD a HILIC.
- Nalezení optimálních podmínek pro HPLC-ELSD detekci vybraných sacharidů.
- Stanovení laktosy v reálném vzorku mléka, který je vystaven působení enzymu laktasy.
- Stanovení operační stability laktasy (β -galaktosidasy) imobilizované na mikročasticích chitosanu se zabudovaným magnetitem při štěpení substrátu ve mléce.

2. Úvod

Sacharidy jsou využívány jako stavební materiál a zdroj energie. V poslední době získávají sacharidy větší pozornost vzhledem k jejich biologickým funkcím. K jejich stanovení se využívá řada analytických metod. Jejich analýza není jednoduchá, neboť sacharidy jsou značně polární molekuly a vyskytují se ve složitých matricích. Proto jsou vyvíjeny stále nové postupy a metody jejich analýzy (Fu *et al.*, 2010). Stanovení sacharidů je omezeno jejich vlastnostmi a strukturou. Navíc se v biologickém materiálu vyskytují ve složitých směsích společně s velkým počtem dalších nízko- i vysokomolekulárních látek. Proto jsou k jejich analýze vhodné separační metody, například kapalinová chromatografie. V poslední době se stále více k separaci sacharidů používá hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). Kapalinová chromatografie je nejčastěji kombinována refraktometrickým detektorem a s detektorem rozptylu záření (ELSD) (Yoshida, 2004). Předmětem mého zájmu nejsou pouze sacharidy, ale také enzymy, které umožňují jejich štěpení. Laktasa je jeden z velice významných enzymů, který hydrolyzuje glykosidové vazby v určitých disacharidech (Panesar, 2007). S aktivitou laktasy jsou spjaté problémy jako je laktosová intolerance. Laktosová intolerance zdravotní problém postihující většinu populace (Swallow, 2011). Enzym laktasa má využití i ve světě nanotechnologií, kde spolu s nanočásticemi nebo mikročásticemi hrají důležitou roli v průmyslových aplikacích (Lu *et al.*, 2007).

3. Teoretická část

3. 1. Monosacharidy

Nejjednoduššími sacharidovými jednotkami jsou monosacharidy, které se liší v počtu uhlíkových atomů a umístěním vodíkových a kyslíkových atomů, které jsou připojeny k uhlíkovým atomům. Některé monosacharidy se mohou spojovat a tvořit tím dlouhé řetězce. Tyto sloučeniny dělíme podle počtu monosacharidových jednotek na oligosacharidy a polysacharidy. Monosacharidy jsou jednoduché cukry, které definujeme jako aldehydové nebo ketonové deriváty polyhydroxy alkoholů, které obsahují více než tři uhlíkaté atomy (Voet *et al.*, 2005). Monosacharidy klasifikujeme podle druhu jejich karbonylové skupiny. V případě, že je karbonylová skupina sacharidu tvořena aldehydovou skupinou (CHO), tak řadíme tyto sacharidy mezi aldosity, zatímco sacharidy, které mají ketonovou skupinu, jsou označovány jako ketosy. Nejjednodušší aldosa je tříuhlíkatá sloučenina glycerinaldehydu, u ketos je to dihydroxyaceton (McKee & McKee, 1996). Další klasifikací, podle které jsou cukry rozdělovány, je počet atomů uhlíku, které obsahují ve své struktuře (Voet *et al.*, 2005). Nejmenší cukry jsou triosy, které obsahují tři atomy uhlíku. Cukry s větším počtem uhlíků, např. čtyři, pět a šest se nazývají tetrosy, pentosy a hexosy (McKee & McKee, 1996). Sacharidy ve své struktuře obsahují chirální asymetrický atom uhlíku, který je zdrojem optické izomerie (Campbell & Farrell, 2011). Například D-glukosa ($C_6H_{12}O_6$) obsahuje ve své struktuře dvě chirální centra na svých dvou ze šesti uhlíkových atomů. Jedná se uhlíkaté atomy C1 a C6. D-glukosa je jedním z možných 2^4 (16) možných stereoisomerů. Ketosy netvoří tolik stereoisomerů jako aldosity. Je to dáno jejich pozicí karbonylové skupiny, kdy ketohexosa má pouze 2^3 různých stereoisomerů (Voet *et al.*, 2005).

3. 1. 1. Struktura monosacharidů

K vyjádření struktury jednotlivých sacharidů se využívá různých projekcí. Fisherova slouží k pro vyjádření monosacharidové struktury (Vodrážka, 1996). Ve Fischerově projekci rozlišujeme konfiguraci podle umístění hydroxylové skupiny. V závislosti na umístění hydroxylové skupiny rozdělujeme monosacharidy ve Fisherově projekci na L a D řady. Označení řady L a D je ovlivněno stranou, na které

se nachází hydroxylová skupina na posledním chirálním uhlíku monosacharidu (Campbell & Farrell, 2011). D-cukry mají stejnou absolutní konfiguraci na asymetrických centrech, která jsou nejvzdálenější od jejich karbonylové skupiny jako D-glyceraldehydu. Příkladem je glukosa, která má – OH skupinu na C5 uhlíku, který je umístěn napravo ve Fischerově projekci. Naproti tomu L-cukry jsou zrcadlovými obrazy svých D-protějšků. L- forma sacharidů je méně častá, protože D- forma je častěji preferovaná. Vlivem adiční reakce se kyslíkový atom stává součástí cyklické struktury (Vodrážka, 1996). Ke znázornění cyklických forem monosacharidů slouží Haworthova projekce, ve které jsou jejich struktury převedeny do forem s pěti nebo šestičlenným kruhy. Pětičlenný kruh se nazývá furanosa podle její podobnosti s furanem (Campbell & Farrell, 2011). Je méně stálý a jeho pětičlenný kruh je tvořen tetrahydrofuranem (Vodrážka, 1996). Cyklická forma, obsahující šest uhlíků, se nazývá pyranosa. Název je odvozen od podobnosti s pyranem (Campbell & Farrell, 2011). Pyranosy jsou poloacetalové obsahující tetrahydropyranový kruh. Po uzavření kruhu dochází ke vzniku nového chirálního centra na anomerním uhlíku (Vodrážka, 1996). Anomerní uhlík se stává centrem chiralidy a umožňuje vznik dvou možných konfigurací. Jedná-li se o alfa anomer, tak jeho OH substituent na anomerním uhlíku je umístěn na opačné straně pyranosového nebo furanosového kruhu oproti CH_2OH skupině na chirálním centru. Druhá forma anomeru je označována jako beta anomer. Anomery mají částečně rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, mezi které patří odlišná optická otáčivost. Cyklické formy podléhají procesu zvaný mutarotace. Mutarotace je spontánní proces, kdy alfa a beta formy monosacharidů jsou rozpustné ve vodě a snadno konvertovatelné. Výsledkem mutarotace je rovnovážná směs alfa a beta forem furanos a pyranos v cyklických strukturách (McKee & McKee, 1996). Při ustanování rovnováhy mezi oběma anomerními formami se mění optická otáčivost roztoku rozpuštěných cukrů ve vodě (Vodrážka, 1996). Příkladem je glukosa, která existuje primárně jako směs alfa a beta pyranos. Mutarotace způsobuje, že otevřený řetězec, který se tvoří během tohoto procesu, se může účastnit oxidačně redukčních reakcí (McKee & McKee, 1996).

3. 1. 2. Reakce monosacharidů

Monosacharidy hrají důležitou roli v biochemii, neboť se účastní mnoha metabolických dějů a drah v lidském těle. Monosacharidy podléhají oxidačním a redukčním reakcím. Oxidací sacharidů získáváme energii, kterou organismus využívá pro plnění svých životních procesů. Jejich oxidací na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek dochází k nejvyšším výnosům energie. Na oxidaci sacharidů je založen

proces zvaný fotosyntéza (Campbell & Farrell, 2011). Sacharidy obsahují oxoskupinu, která je velice reaktivní. Typická reakce pro oxoskupinu je nukleofilní adice. Oxidací funkčních skupin monosacharidů vznikají různé deriváty. Oxidací aldehydové skupiny dochází k přeměně na skupinu karboxylovou. V této souvislosti mluvíme o karboxylových kyselinách monosacharidů. Podle funkční skupiny sacharidu, která se oxiduje, rozdělujeme dále sacharidy. Oxidací primární alkoholové skupiny nebo aldehydické získáváme různé druhy monosacharidických kyselin, které se liší svoji nomenklaturou např. -rová, -onová. Oxidací aldehydové skupiny na karboxylovou skupinu vznikají aldonové kyseliny, zatímco oxidací CH_2OH , tedy oxidací primární alkoholové skupiny vzniká uronová kyselina (Vodrážka, 1996). Při oxidaci primární aldehydové skupiny dochází ke vzniku aldarové kyseliny (McKee & McKee, 1996). Příkladem oxidace aldehydové skupiny na D-glukosu je vznik glukorové kyseliny (Vodrážka, 1996).

3. 2. Oligosacharidy

Pojem oligosacharid se používá pro sacharidy, které obsahují ve své struktuře mezi dvěma až deseti monosacharidovými jednotkami (Campbell & Farrell, 2011). Oligosacharidy můžeme rozdělit na redukující a neredukující cukry. Redukující cukr vznikne jen tehdy, když jedna složka disacharidu vstoupí do O-glykosidové vazby hemiacetalového hydroxylu. Pokud se obě monosacharidové jednotky účastní tvorby O-glykosidové vazby hemiacetalovými hydroxylly vzniká neredukující sacharid. Mezi nejhojnější sacharidy patří sacharosa a laktosa. Sacharosa je disacharid tvořený monosacharidovými cukry β -D-galaktopyranosou a α -D-glukopyranosou. Využívá se v potravinářském průmyslu jako sladidlo nebo pro využití v řadě biotechnologií. Sacharosa patří mezi neredukující sacharidy. Důvodem je neschopnost otevření kruhů a neschopnost mutarotace. Neschopnost mutarotace je příčinou, že se nemůže vyskytovat v anomerních formách (Vodrážka, 1996). Dalším významným disacharidem je laktosa (mléčný cukr), která vzniká kondenzací hexos α -D-glukosy s D-galaktosou. Vyskytuje se v mléce v rozmezí koncentrací mezi 0-7 % v závislosti na původu a druhu mléka (Voet *et al.*, 2005). Na rozdíl od sacharosy patří laktosa mezi redukující cukry. Za schopnost redukce je odpovědná volná hemiacetalová hydroxylová skupina (Vodrážka, 1996).

3. 3. Polysacharidy

Polysacharidy jsou také označovány pod pojmem glykany. Jsou využívány organismy k ukládání energie nebo jako stavební materiál. Jedná se o vysokomolekulární látky skládající se z velkého počtu monosacharidových jednotek spojených glykosidickou vazbou (Campbell & Farrell, 2011). Takto spojených jednotek mohou být desítky až tisíce (Vodrážka, 1996). Na rozdíl od proteinů a nukleových kyselin mají polysacharidy jak lineární strukturu, tak rozvětvenou strukturu. Příkladem lineární struktury je celulóza a amyloza. Rozvětvená struktura je typická pro glykogen. Polysacharidy klasifikujeme jako homo-polysacharidy a heteropolysacharidy podle toho, zda ve své struktuře obsahují jeden nebo více monosacharidů (Voet *et al.*, 2005). Mezi homopolysacharidy patří glukany a fruktany (Vodrážka, 1996). Hetero-polysacharidy na rozdíl od homopolysacharidů obsahují dva nebo více různých druhů monosacharidů. Polysacharidy, které patří ke skupině homopolysacharidů, jsou zpravidla součástí buněčných struktur. Mezi homopolysacharidy patří škrob, glykogen a celulóza. Všechny tyto látky obsahují ve své struktuře D-glukosu. Struktura škrobu a glykogenu umožňuje skladování glukosy v rostlinách a živočišných buňkách. Celulóza je základní stavební složkou rostlinných buněk.

Škrob slouží jako zdroj energie rostlinných buněk a je také významným zdrojem sacharidů v lidské stravě (Campbell & Farrell, 2011). Není jednotnou látkou, ale skládá se ze dvou polysacharidů: amylosy a amylopektinu (Vodrážka, 1996). Amylosy je tvořena jednotkami D-glukosy, která je spojena alfa 1,4 glykosidickou vazbou. Druhou složkou je polymer (amylopektin) obsahující (1,4) a (1,6) glykosidické vazby (Campbell & Farrell, 2011). Na rozdíl od amylosy je ve vodě nerozpustný. V případě neúplné hydrolyzy škrobu vznikají produkty, které nazýváme dextriny (Vodrážka, 1996).

Glykogen a škrob patří mezi rezervní polysacharidy. V případě glykogenu se jedná o granule rozptýlené v cytoplazmě. (Campbell & Farrell, 2011). Nachází se především v játrech a svalových buňkách obratlovců. Jeho struktura je podobná amylopektinu, v buňkách je glykogen metabolicky degradován pomocí glykogenfosforylasy, která postupně štěpí vazbu α -(1,4) od neredukujících konců glykogenu. Má mnoho neredukujících konců, umožňuje rychlou mobilizaci glukosy v době, kdy ji organismus potřebuje (Voet *et al.*, 2005).

Heteropolysacharidy jsou polymery složené z více různých monosacharidů nebo jejich derivátů. Jsou součástí různých přírodních materiálů. Nejdůležitějším heteropolysacharidem je glykosoaminoglykan, který se nachází v živočišné tkáni.

Jeho struktura je tvořena dvěma složkami. První složkou jsou opakující se disacharidovými jednotkami glukosaminu, který je sulfonylován nebo acetylován v poloze 2. Jeho druhou složku tvoří uronová kyselina (Vodrážka, 1996).

3. 4. β -D-galaktosidasa

β -D-galaktosidasa (β -D-galaktosid galaktohydrolasa, EC 3.2.1.23) je především známa jako laktasa, kterou zařazujeme pod glykosidasy. Glykosidasy jsou enzymy patřící mezi hydrolázy (podpodtřída 3.2.1 podle mezinárodní nomenklatury enzymů), což jsou enzymy katalyzující štěpení glykosidických vazeb (O- a S- glykosidy) nebo biosyntézu homo- a heteroglykosidů (Kraml & Crkovská, 2010). Podle CAZy (aktivní sacharidové enzymy), což je specializovaná databáze, která se věnuje zobrazení, analýze genomu a biochemických informací o aktivních enzimech sacharidů, je laktasa zařazena pod GH 2 (Mahoney, 1997).

3. 4. 1. Původ β -D-galaktosidasa

Tento enzym, který se hojně vyskytuje v přírodě, může být izolován z různých přírodních zdrojů, mezi které patří různé druhy rostlin. Především se nachází v plodech ovoce (broskve, meruňky, jablka), zvířecích orgánech, kvasinkách, bakteriích a houbách (Richmond *et al.*, 1981). β -D-galaktosidasa není ve všech živých (mikro)organismech nebo rostlinách stejná. S jejím zdrojem se její vlastnosti mění. Její zdroj pro laboratorní nebo průmyslové aplikace je především mikrobiálního původu (Panesar *et al.*, 2007).

Mikroorganismy nabízí řadu výhod oproti jiným zdrojům. Především se jedná o velmi snadnou manipulaci, vysokou výtěžnost a snadnou dostupnost a kultivaci na poměrně levných médiích (Mahoney, 1997). S laktasou se setkáme v potravinářském průmyslu především při výrobě mléka a mléčných výrobků, kde zaujímá významnou roli při snížení koncentrace laktosy v mléku a mléčných výrobcích. Snížení koncentrace laktosy je velice důležité, neboť značná část lidské populace vykazuje nesnášenlivost vůči laktose a má problémy s její konzumací (Panesar, 2007). Významné aplikace pro využití v mlékárenském průmyslu byly poprvé navrženy v roce 1950 (Dam *et al.*, 1950).

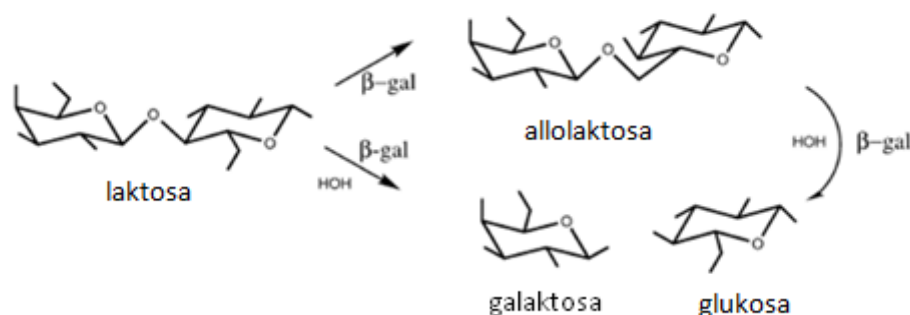
3. 4. 2. Vlastnosti β -D-galaktosidasa

Galaktosidasa jen enzym, který katalyzuje hydrolýzu β -galaktosidické vazby na příslušné monosacharidové jednotky (Voet *et al.*, 2005). Enzym hydrolyzuje nejen vazby v laktose, ale také (1-3)- β -(1-4) glykosidické vazby v příslušných oligo- a disacharidech. Disponuje také schopností katalyzovat reverzní reakci hydrolýzy z názvem transglykosylace. Pro hydrolýzu laktosy musí být splněno několik faktorů, mezi které patří koncentrace substrátu, pH, maximální teplota, enzymatická aktivita a čas, kdy je laktasa vystavena teplotě. Teplotní stabilita a pH optimum je do značné míry ovlivněno původem enzymu. Tento enzym se nachází v různé řadě mikroorganismů, ze kterých může být izolován. Imobilizovaná β -galaktosidasa se využívá v průmyslových aplikacích například při hydrolýze mléka, laktosy nebo i pro syntézu galaktooligosacharidů (Pan *et al.*, 2009). Primárním zdrojem enzymu pro průmyslové aplikace jsou kvasinky, houby a bakterie. Hlavní rozdíl mezi kvasinkovými a houbovými enzymy je optimum pH, které je potřebné pro hydrolýzu laktasy. Houbové enzymy mají pH v kyselé oblasti. Kyselé hodnoty pH jsou vhodné pro zpracování kyselé syrovátky (Panesar, 2007). Mají relativně vysoké teplotní optimum. Zatímco β -D-galaktosidasa izolovaná z kvasinek preferuje neutrální pH optimum. V západním světě nenachází využití laktasy pouze pro hydrolýzu mléka, ale především v mlékárenském průmyslu pro potraviny jako je zmrzlina, sýry, jogurt a ostatní produkty, kde enzymatická hydrolýza laktosy má značný potenciál použití. Vysoká koncentrace laktosy v syrovátce je jeden z hlavních environmentálních problémů, protože její únik do vody zvyšuje mnohonásobně biologickou spotřebu kyslíku. Hydrolýza syrovátky pomocí β -D-galaktosidasy patří k důležité aplikaci enzymu v průmyslu. V potravinářském průmyslu lze koncentrovanou hydrolyzovanou syrovátku použít jako sladidlo pro produkty, mezi které patří nealkoholické nápoje a sirupy z koncentrovaného ovoce (Vasiljevic & Jelen, 2002).

3. 4. 3. Laktosová intolerance

Špatné snášení laktosy se označuje jako laktosová intolerance. Laktosa je hydrolyzována enzymem β -D-galaktosidasou na její monosacharidové jednotky galaktosu a glukosu, které jsou v krevním řečišti lépe absorbovány. Galaktosa je enzymaticky přeměněna na glukosu. Většina dospělých savců má nízkou hladinu β -D-galaktosidasy. Nedostatek tohoto enzymu způsobí, že není dostatečné množství laktosy přeměněno na metabolicky přijatelné látky. Tato nemetabolizovaná laktosa se dostává přes trávicí trakt do tlustého střeva, kde je bakteriální mikroflórou fermentována na velké množství CO_2 , H_2 a řadu kyselin, které způsobí časté

zažívací problémy spojené s průjmy a nevolností známé jako laktosová intolerance. Je to tedy metabolické onemocnění postihující především dospělou populaci převážně Afrického a Asijského původu (Voet *et al.*, 2005). Přibližně 70 % světové populace trpí poruchou trávení laktosy nebo její intolerancí (Vasiljevic & Jelen, 2002). Někteří lidé jsou schopni trávit laktosu snadněji než ostatní. Nesnášenlivost ovlivňuje několik faktorů, z kterých jsou nejdůležitější nutriční a genetické faktory. Jedná se o geneticky podmíněné rysy, které se zřejmě objevily několikrát u člověka během evoluce, pravděpodobně v důsledku přirozeného výběru. Změna se týká genetické regulace laktasy, ale i jiných faktorů ovinujících schopnost trávit mléko (Swallow, 2011)



Obr. 1 Obecné schéma pro působení β -galaktosidasy na přírodní substrát laktosu. Enzym způsobí hydrolýzu (dolní dráha) za vzniku glukosy a galaktosy (Matthews, 2005).

3. 4. 4. Imobilizace β -D-galaktosidasy

Využití volného enzymu je poměrně drahé. Naopak imobilizace na vhodné matrici umožňuje jeho opakované využití, což vede k snížení nákladů (Panesar, 2007). Existuje hned několik dalších důvodů pro použití enzymu v imobilizované formě. Imobilizace poskytuje nejen pohodlnější manipulaci s enzymem, ale i povrchové oddělení od produktu, což vede k minimalizaci jeho kontaminace a odstranění bílkovin. Poměrně častá výhoda imobilizace je zvýšení teplotní stability enzymů (Cabral & Kennedy, 1993). Imobilizace je výhodná, ale zahrnuje nespočet efektů, které vedou ke zhoršení účinnosti enzymů. Ve srovnání s volným enzymem se snižuje aktivita a zvyšuje se Michaelisova konstanta. Tyto změny vyplývají ze strukturních změn enzymu, které se uplatňují během imobilizační procedury a z

tvorby mikroprostředí ve kterém enzym funguje (Krajewska, 2004). Galaktosidasu lze stejně jako celou řadu enzymů imobilizovat pomocí různých metod, mezi které patří například fyzikální adsorpce, kovalentní vazba nebo speciální gely pro zachycení (Shukla & Wierzbicki, 1975).

3. 4. 4. 1. Fyzikální adsorpce

Fyzikální adsorpce je nejjednodušší a nejstarší metoda používaná pro imobilizaci enzymů. Jedná se o imobilizaci enzymu na nosiči ve vodě nerozpustném. Při fyzikální adsorpci jsou biokatalyzátory drženy na povrchu nosičů pomocí slabých vazebných interakcí, mezi které patří Van der Waalsovi síly a doprovázeny jsou i jinými silami nebo interakcemi mezi nosičem a biokatalyzátorem. Jedná se především o hydrofobní interakce, vodíkové můstky a heteropolární (iontové) vazby (Panesar *et al.*, 2006). Výhoda fyzikální adsorpce spočívá v jednoduchosti provedení, které má malý vliv na konformaci biokatalyzátoru. Nevýhodou této techniky je relativní slabost vazebných sil, které se při adsorpci uplatňují. Příkladem imobilizace β -D-galaktosidasy pomocí adsorpce je imobilizace na hydrofobní bavlněné tkanině (Sharma & Yamazaki, 1984).

3. 4. 4. 2. Zachycení v gelu

Tato technika zachycení je velmi populární pro imobilizaci celých buněk. Hlavní výhodou této techniky je její jednoduchost, se kterou lze získat kulové částice při odkopávání suspenze polymeru do média, které obsahuje kladně nabitě ionty nebo prostřednictvím tepelné polymerace. Limitace této techniky pro imobilizaci je možný únik molekul při častém používání. Únik je způsobem malou velikostí molekul vzhledem k velikosti buněk (Panesar *et al.*, 2006).

3. 4. 4. 3. Imobilizace kovalentní vazbou

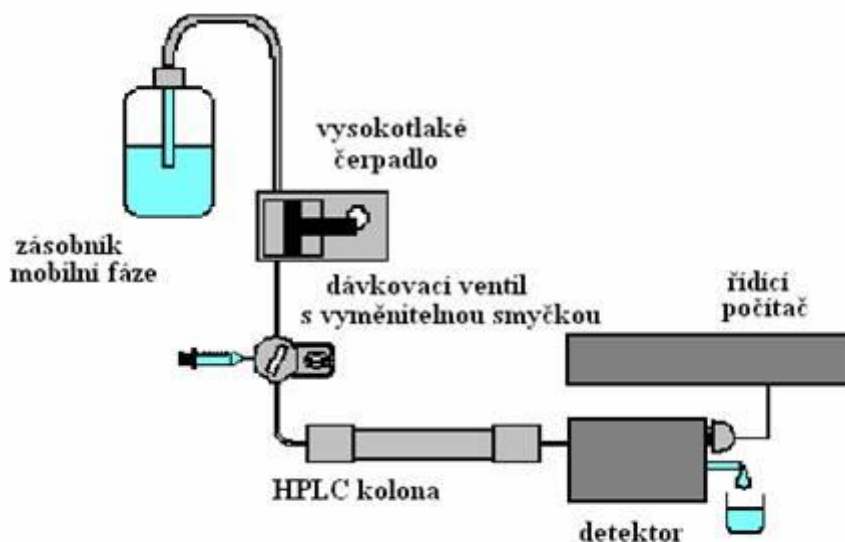
Kovalentní vazba je jedna z dalších technik používaných pro imobilizaci enzymu. Jedná se o často používanou techniku. Avšak není vhodná pro imobilizaci buněk. Princip této metody spočívá ve spojení enzymů kovalentní vazbou přes funkční skupiny v enzymech, které nejsou nezbytné pro katalytickou činnost. Kovalentní vazba je vhodnější, protože je pevnější a odolnější ke změnám podmínek jako jsou teplota, pH, iontová síla (Siso & Doval, 1994). Často je vhodné provést imobilizaci v přítomnosti substrátu nebo vhodného kompetitivního inhibitoru tak, aby bylo ochráněno aktivní místo. Nevýhodou kovalentní imobilizace je vystavení enzymu přílišnému stresu, kdy může dojít ke změně konformační flexibility vedoucí ke ztrátě

aktivity enzymu (Panesar *et al.*, 2006). Nicméně tuto techniku lze využít pro změnu provozních vlastností enzymu. Pro kovalentní imobilizaci β -D-galaktosidasy se využívají různé matrice a techniky (Siso & Doval, 1994).

3. 5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je separační metoda sloužící k analytické nebo preparativní separaci nízko- ale i vysokomolekulárních látek. Během posledního desetiletí se HPLC stala analytickou metodou, která je vhodná nejen pro analytickou separaci látek, ale i pro čištění (preparativní účel). Uplatňuje se ve farmaceutickém průmyslu, biotechnologiích, při monitorování složek životního prostředí a v aplikovaném výzkumu. Rozvoj a dostupnost HPLC kolon různých rozměrů, druhů stacionárních fází je doprovázen vývojem robustního a spolehlivého vybavení HPLC. Separační mechanismy v HPLC jsou založeny na fyzikálně chemických vlastnostech látek. Jinými slovy, látky je od sebe možné oddělit jen tehdy, pokud se svými vlastnostmi od sebe liší. Rozdíl fyzikálně chemické vlastností látek je dán rozdílnou schopností interakce s mobilní a stacionární fází. Hlavními chromatografickými principy dělení jsou: adsorpce, chemisorpce, rozdělení mezi dvě kapalnou fáze a síťový efekt, hydrofilní či hydrofobní interakce, iontová výměna atd. (Churáček & Jandera, 1985).

Chromatografický systém (chromatograf) se skládá z čerpadla, nádrže pro rozpouštědla, dávkovacího zařízení, kolony a detektoru. Princip operace je jednoduchý. Pumpy tlačí eluent kolonou při určitém průtoku. Při aplikaci vzorku dávkovačem prochází eluent skrz dávkovač a tlačí vzorek do kolony. V koloně jsou složky vzorku separovány. U většiny přístrojů je možnost volit a ovládat teplotu eluentu v koloně pomocí termostatu (Kellner *et al.*, 2004).



Obr. 2 Schéma chromatografického systému pro HPLC

(http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm)

HPLC pumpy (čerpadla) jsou zařízení, pracující za vysokých tlaků. Čerpadlo musí být schopno reprodukovatelně pumpovat rozpouštědlo při zpětných tlacích až 400 barů (40 MPa) s velkým rozsahem možných průtoků mobilní fáze (0,05-10 ml.min⁻¹). Vnitřní objem čerpadla musí být dostatečně malý, aby bylo umožněno rychlých změn poměru složení eluentu. Nejčastěji používané jsou pumpy pístové, které se skládají ze dvou pístů pohybujících se v protifázi (Kellner *et al.*, 2004). Materiál, ze kterého je pumpa vyrobena, musí být značně odolný vůči složkám mobilní fáze (Klouda, 2005).

Směšovací zařízení slouží k míšení jednotlivých složek mobilní fáze. Složení mobilní fáze může být stejné (izokratická eluce) nebo se v průběhu analýzy měnit (gradientová eluce). U gradientové eluce se změnou složení mobilní fáze dochází i ke změně tlaku (v důsledky změn viskozity mobilní fáze).

Dávkovací zařízení umožňuje dávkovat objemy v rozmezí od 0,5 do 500 µl u mikro-HPLC jsou tyto objemy mnohem nižší, rovněž systém dávkování je odlišný. Při vstřikování je potřeba, aby byl zachován konstantní tlak v systému. Vzorek je vstřikován do smyčky pomocí mikrolitrové stříkačky. Zatímco je smyčka plněna, eluent proudí přímo do kolony. Po injekci se ventil přepne do původní polohy (Kellner *et al.*, 2004).

Chromatografické kolony pro HPLC jsou vyrobeny z chemicky inertního obalového materiálu. Nejčastěji používaný materiál je z nerezové oceli. Používané kolony dosahují délek od 10 mm do 300 mm, přičemž jejich vnitřní průměr se pohybuje v rozmezí 1,0-7,6 mm. LC kolony jsou vybaveny pevným materiálem s částicemi o velikosti 2,6-10 µm. Standardní kolony jsou dlouhé 250 mm s vnitřním průměrem 4,6 mm a jsou plněny částicemi o velikosti 5 µm (Kellner *et al.*, 2004). Pro

požadavek snížení množství rozpouštědel, která musí být velice čistá, bez chemických a mechanických nečistot, se používají kolony s vnitřním průměrem menším jak 1 mm a délkou 30-75 mm. Kolony s menším vnitřním průměrem a délek disponují vysokou účinností a nízkou spotřebou rozpouštědla (Klouda, 2005). Tvar, pórovitost, velikost částic a distribuce jsou jednou z nejdůležitějších vlastností materiálu použitého pro stacionární fázi kolony (Kellner *et al.*, 2004). Nejčastěji používané stacionární fáze jsou silikagel nebo oxid hlinitý a různé druhy gelů. Jedná se o fáze, které jsou vázané silikagelem nebo oxidem hlinitým, nebo materiály s póry o kontrolované velikosti (Holzbecher & Churáček, 1987)

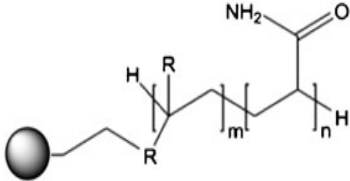
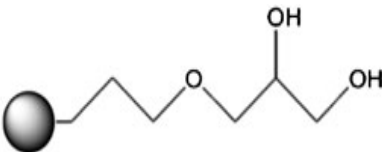
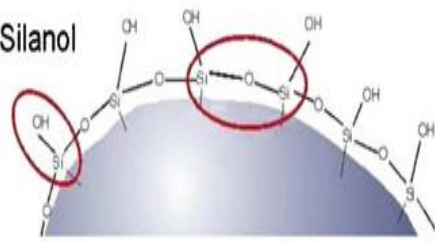
3. 6. Úvod do hydrofilní interakční chromatografie

V minulosti byly k analýze sacharidů používány různé analytické metody. Například HPLC v kombinaci s diferenčním refraktometrem (Charlesworth, 1978). V posledních letech se k analýze sacharidů používá hydrofilní interakční chromatografie. Poskytuje oproti dříve využívané chromatografii v systému reverzních fází (RP-LC) lepší selektivitu, neboť dříve používaná RP byla limitována nedostatečnou retencí polárních molekul. HILIC je chromatografie podobná chromatografii v systému normálních fází (NP-LC), avšak s poměrně vysokým obsahem vody, zajišťujícím určité výhody zvláště u látek ve vodě rozpustných (Yoshida, 2004). HILIC selektivně udrží sacharidy a cukerné alkoholy, zatímco většina látek s nízkou polaritou je eluována v blízkosti mrtvého objemu kolony (Linden & Lawhead 1975). Vyznačuje se použitím hydrofilní stacionární fáze a hydrofobní organické fáze. HILIC byla původně popsána v 70. letech 20. století. Na rozdíl od RP jsou hydrofilní látky zadržovány déle. Z tohoto hlediska se zdá být stejná jako NP. Nicméně zkratka HILIC napovídá, že je zde určitý rozdíl oproti NP. NP chromatografie využívá nevodných nebo s vodou nemísitelných roztoků pufrů. Zatímco HILIC se provádí s vodou mísitelnými rozpouštědly a eluce je umožněna gradientem vody (Boersema, 2008). Slouží k separaci malých polárních sloučenin na polární stacionární fázi. Účinnost separace HILIC lze ovlivnit v některých případech volbou mobilní fáze o určitém složení látek, iontovou silou nebo pH přítomného pufru (Linden & Lawhead 1975).

Zvýšením koncentrace vody v mobilní fázi dochází ke snížení vodné retence. Naopak při zvýšení koncentrace organické složky v částečně vodné mobilní fázi se sníží relativní permitivita smíšené mobilní fáze. Retence se mění v závislosti na použitém rozpouštědle. Rozpouštědla pro mobilní fázi můžeme sumarizovat podle jejich eluční síly v následujícím pořadí: aceton < isopropanol = propanol < acetonitrilu

< ethanol < dioxan < DMF = methanol < voda (Buszewski & Noga, 2012). Kde nejmenší eluční schopnost má aceton, naopak voda disponuje největší eluční silou (Alpert, 1990). Mechanismus HILIC separace je založen na rozdílném rozdělení molekul rozpuštěné látky (analytu) mezi mobilní fázi, která je bohatá na organickou složku a polární stacionární fázi. V případě, že se jedná o sacharidy, je zde nepoužívanějším rozpouštědlem mobilní fáze acetonitril. Molekuly analytu jsou adsorbovány hydrofilní stacionární fází. Se zvyšující koncentrací acetonitrilu nebo jiného organického rozpouštědla voda mnohem silněji interaguje s povrchem polární stacionární fáze, což vede ke snížení koncentrace vody v mobilní fázi a tím i ztrátě její eluční síly. Mobilní fáze HILIC hrají důležitou roli pro separaci látek a pH mobilních složek je obecně řízeno tlumivými roztoky o určitých koncentracích. Nejčastěji se používají roztoky pufrů s koncentrací 5-20 mM solí (Kawachi *et al.*, 2011)

Téměř každý polární povrch může být použit jako stacionární fáze pro HILIC pro HILIC chromatografii. Mezi typické HILIC stacionární fáze patří silikagel nebo jeho modifikace. Jedná se o Diol, aminové, amidové či jiné lepené fáze. Jsou obvykle připraveny chemickou úpravou silikagelového povrchu, který je obohacen o ligandy různých skupin -NH₂, -CN, které jsou vhodné nejen pro analýzu sacharidů (Buszewski & Noga, 2012). Jedna z prvních HILIC separací sacharidů byla provedena prostřednictvím amino-křemičité fáze Bondapak (Waters, Milford, MA, USA) ve směsi acetonitril a vody (75:25 v/v) (Linden & Lawhead 1975). Pro další generaci stacionárních fází pro analýzu cukrů byla použita DIOL a amido-oxid křemičitá fáze, které prokazuje lepší výsledky než předchozí první generace HILIC fází (Regnier & Noel, 1976).

Kyano	
Amido	
Amino	
DIOL	
Nemodifikovaná silika	Siloksan 

Obr. 3. Stacionární fáze používané pro HILIC separaci sacharidů (Buszewski & Noga, 2012).

3. 6. 1. Kolony s nemodifikovaným silikagelem

Čistý nemodifikovaný silikagel (oxid křemičitý) je běžně používanou stacionární fází v NPLC a HILIC. Obzvláště je využíván v kombinaci HILIC-MS. Mobilní fázi zde tvoří převážně směs acetonitrilu a vodného pufru, který kompatibilní s ionizací elektrosprejem (Naidong, 2003). Máme dva typy gelů, které se liší svojí přípravou. Typ A se připravuje srážením roztoku křemičitanů, které jsou kyselé. Kyselost je způsobena znečištěním povrchu určitými kovy, které aktivují povrchové skupiny. Aktivace povrchových skupin vede k tvorbě komplexů s některými chelatačními roztoky, což způsobuje silnou retenci nebo asymetrické píky. Typ B silikagelů obsahuje velmi nízké množství kovů a jsou stabilnější při vyšších hodnotách pH (více jak 9 pH). Obecně typ B poskytuje lepší separaci u základních vzorků, které jsou vysoce čisté (McCalley, 2007). Nemodifikovaný silikagel je využíván pro separaci malých polárních molekul. Převážně je využíván farmaceutika nebo pro separaci cukrů, peptidů a proteinů. Avšak i tyto separace mají svá omezení (Ikegami *et al.*, 2008).

3. 6. 2. Amino-modifikované kolony

Vázané amino-silikagelové kolony se velmi často používají v HILIC režimu. Základní analyty jsou všeobecně silně vázány k silikagelu pomocí vodíkových vazeb a interakcí způsobující iontovou výměnu se silanolovými skupinami. U kyselých složek byla pozorována vyšší afinita vůči amino-silikagelovým kolonám, kdy za určitých podmínek může dojít k nevratné adsorpci. Mnoho amino-silikagelových kolon je využíváno nejen pro HILIC, ale také pro NPLC (Ikegami *et al.*, 2008). Příkladem kolon užívaných pro HILIC jsou Bondapak AX (Waters), Bondapak Carbohydrate (Waters), Spherisorb NH₂ (Waters), které slouží především pro separaci sacharidů (Risley, 2006).

3. 6. 3. Amido-modifikované kolony

Dalším druhem kolony typu HILIC je silikagel obsahující amidové funkční skupiny. Kolony TSKgel Amide-80 (Tosoh, Japonsko) jsou široce používané kolony pro separaci sacharidů (Risley, 2006). Tento druh kolony nebyl vždy uspokojivý vzhledem k jeho chemické a fyzikální stabilitě. Stacionární fáze TSKgel Amidu 80 se skládá z neiontových karbamoylových skupin, které jsou vázané na částice silikagelu. TSKgel poskytuje výbornou chemickou stabilitu. H-atom skupiny N-NH stacionární fáze může tvořit vazbu s atomy kyslíku v hydroxylových nebo karbonylových skupin,

ale také značně zadržují vodu. Dochází ke vzniku fáze bohaté na vodu, ve směsi vody a ve vodě, rozpustném rozpouštědle, které udrží sacharidy a jiné polyoly (Tosoh Bioscience).

Amido-silikagelové kolony nejsou omezeny na výběr analytu, neboť poskytují dobrou retenci pro velké spektrum látek. Klasické HILIC kolony jsou omezeny výběrem analytů vzhledem působení silných adsorpčních sil sloučenin se specifickými funkčními skupinami (Ikegami *et al.*, 2008). Vzhledem k odlišné retenční síle na stacionární fázi by se kolony mohli dělit do dvou skupin: silné a slabé stacionární fáze. Retenční faktor se zde liší podle použití dané kolony a zkoumaného analytu. Slabé retenční stacionární fáze všeobecně vykazují nižší selektivitu s částečnými strukturálními rozdíly (Kawachi *et al.*, 2011).

4. 6. 4. Podmínky pro HILIC separaci

Pro HILIC sacharidů je vhodná mobilní fáze acetonitril/voda. Pro separaci sacharidů není potřeba přidávat další aditiva nebo jakkoliv upravovat pH nebo ho držet na určité hodnotě přidávkem pufru k mobilní fázi. HILIC separace se provádí, buď v režimu izokratické eluce s vysokým podílem organického rozpouštědla nebo gradientová eluce, která pracuje na začátku analýzy s vysokým procentem organického rozpouštědla a končí s vysokým podílem vodného rozpouštědla (Buszewski & Noga, 2012). Při vysoké koncentraci organického rozpouštědla (acetonitrilu) molekuly vody více interagují s povrchem stacionární fáze např. nemodifikovanou stacionární fází tvořenou pouze silikagelem (SiO_2). V tomto případě nedochází k téměř žádným interakcím mezi acetonitrem s volným povrchem stacionární fáze, a tak jsou na tento volný povrch adsorbovány molekuly vody (Alpert, 1990).

3. 6. 5. Porovnání HILIC s NP-LC a RP-LC

V porovnání s jinými druhy kapalinových chromatografií HILIC disponuje řadou výhod. Jednou z nich je dobrá rozpustnost polárních vzorků ve vodné složce mobilní fáze. V dnešní době HILIC separace je užitečná pro analýzu obtížně oddělitelných složek jako jsou malé organické kyseliny nebo léky. HILIC je úspěšně používána pro analýzu sacharidů, peptidů nebo polárních léků. HILIC separace sacharidů lze velmi snadno kombinovat s detekční technikou například index lomu (RI), odpařovací rozptyl světla (Boersema *et al.*, 2008)

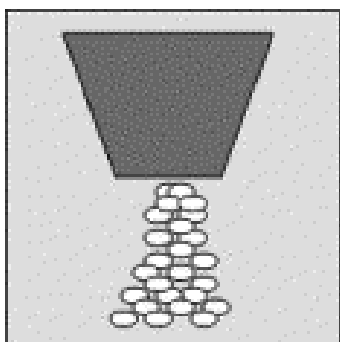
3. 7. Detektor ELSD

Odpařovací detektor pracující na principu rozptylu světla (ELSD) je široce využíván jako univerzální přístroj pro detekci látek separovaných HPLC (Young & Dolan, 2003). Tato technika detekce je plně kompatibilní s kontinuálním průtokem. ELSD nabízí jednoduchý a spolehlivý systém pro získávání kvalitativních informací. Jedná se o moderní metodu detekce, ačkoli ELSD detektory byly vyvinuty už v 1966 v Austrálii v Union Carbide, ale nebyly běžně používány. ELSD byl původně vyvinut jako alternativní detektor pro chromatografii, která v druhé polovině 20. století spoléhala na fotometrické (UV-VIS) detektory nebo index lomu (RI). I přes jeho vysoký potenciál začal být široce používán až koncem 70. let (Charlesworth, 1978). Rozvoj nastal během posledních 20 let, kdy se ELS detektory dostaly do popředí zájmu, zejména jako preferovaný detektor v oblasti kapalinové chromatografie pro analýzu sacharidů, lipidů nebo polymerů (Young & Dolan, 2003). ELSD měří množství světla rozptýleného částicemi analytu. Poskytuje signál pro všechny sloučeniny, které se nevypaří nebo nerozloží během odpařování mobilní fáze (Parriot, 1993). Při analýze pomocí HPLC-ELSD záleží na volbě mobilní fáze, druhu zvolené eluce a mnoha dalších podmínkách, které ovlivňují retenční časy, stabilitu základní linie, poměr signálu/šum. Izokratická eluce je pro ELSD využívána nečastěji, neboť vykazuje lepší reprodukovatelnost retenčních časů. Retenční časy jsou určující faktor pro identifikaci látek (Lapkin *et al.*, 2009).

3. 7. 1. Mechanismus ELSD

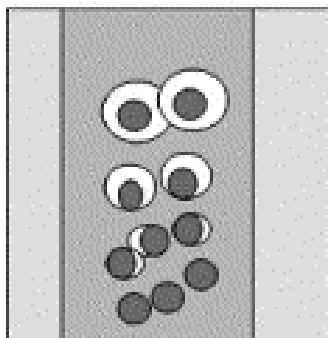
Mechanismus je společný pro všechny ELS detektory a skládá se ze tří fází. V podstatě se jedná o tři po sobě jdoucí přesně definované kroky, které na sebe plynule navazují. Jedná se o zmlžování (nebulizace), odpařování a detekce. Ve zmlžovacím kroku dochází k smíchání plynu o určitém průtoku s mobilní fází za vzniku aerosolových kapiček. Použitým plynem bývá dusík nebo vzduch (Young & Dolan, 2003). Průtok plynu ovlivňuje do určité míry velikost kapiček vytvořených během procesu zmlžování (nebulizace). Vyšší průtok plynu umožní produkci menších kapiček, které se vypařují snadněji než větší kapky. Menší kapky jsou ale méně účinné při rozptylu světla, a proto poskytují menší signál, než kapky větších rozměrů (Beilmann *et al.*, 2006). Kapičky ve formě aerosolu jsou pak řízeny proudem plynu do odpařovací komory, kde dojde k vypaření rozpouštědla nebo mobilní fáze, naopak částice analytu jsou zde zachovány. Pro stanovení musíme volit vhodnou teplotu, aby nedocházelo k zbytečným ztrátám nebo k samotnému vypaření analytu.

Nastavení rozprašovače má značný vliv na flexibilitu ELSD (Young & Dolan, 2003). V současné době jsou k dispozici přístroje, které pracují nezávisle na teplotě podle volitelného režimu, který nastavíme pro odpařování zónu tak pro nebulizační komory. Teplota v odpařovací zóně dosahuje hodnoty až 120° C v nebulizačních komorách je teplota nižší (menší jak 70° C). Selektivita teploty umožňuje zvýšenou návratnost těkavých složek beze změny jejich základní linie. Tato konfigurace je velmi užitečná pro kombinaci chromatografie s ELSD detektorem (HPLC-ELSD), protože odtlakování vede k ochlazení proudu plynu, který může být pro některé aplikace škodlivý (Lucena *et al.*, 2007). Pro ELS detektory se využívají dvě různé konfigurace odpařovací komory (typy A a B). Detektory mající odpařovací komory typu A fungují bez rozdělení aerosolu. Celý aerosol prochází skrz “drift tube” do optické cely, která je průtočná. Zde dochází k detekci. V konfiguracích typu B na rozdíl od typu A dochází k rozdělení kapek aerosolu. Nerozdělený aerosol prochází přes zakřivenou komoru, kde větší kapky interagují se stěnami trubice a jsou odesílány do odpadu, zatímco ty menší jsou vedeny do stočené “drift tube” k odpařování. Správné nastavení teploty pro odpaření závisí na těkavosti eluentu, rychlosti průtoku mobilní fáze, rychlostí průtoku nebulizovaného plynu a těkavosti analytu (Beilmann *et al.*, 2006). Detektory typu A vyžadují vyšší teploty, které mohou způsobit, částečné odpaření některých analytů odpařující se společně s rozpouštědlem. Na druhou stranu jsou citlivější, neboť všechny sloučeniny mohou dosáhnout optické cely. Detektory typu B jsou výhodnější pro práci při vysoké rychlosti průtoku mobilní fáze nebo pokud mobilní fáze má vysoký obsah vody, což zajišťuje odpovídající odpařování a stabilitu základní linie.



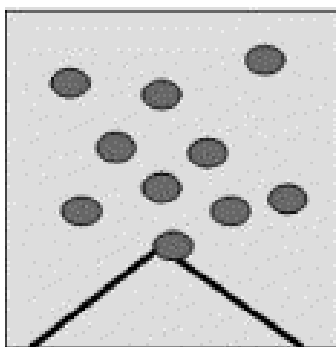
Obr č. 4: Nebulizace:

Uvnitř nebulizátoru je eluent z kolony veden skrz jehlu, kde dojde k smíšení s dusíkem a tvorbě kapiček (Beilmann *et al.*, 2006).



Obr. č. 5: Vypařování mobilní fáze:

Kapičky prochází vyhřátou drift tube, kde dochází k odpaření mobilní fáze a zachování částic vzorku (Beilmann *et al.*, 2006).



Obr. č. 6: Detekce:

Částice vzorku prochází detekční celou, kde jsou zasaženy laserovým paprskem. Množství světla rozptýleného částicemi vzorku je zjištěno pomocí generovaného elektrického signálu (Beilmann *et al.*, 2006).

Rozpuštěné částice vstupují do optické cely, kde prochází skrz paprsek světla. Množství světla, které je rozptýleno částicemi, je měřeno fotonásobičem nebo fotodiodou. Světelný paprsek vstupuje do optické cely přes kolimační čočky, které usměrňují světelnou energii do centra cely a tím maximalizují odezvu detektoru. Světelný paprsek je produkován buď z polychromatického zdroje ve viditelné části spektra jako je halogenová lampa nebo laser-emitující diodou s monochromatickým zdrojem. Existují tři typy rozptylu světla, které mohou nastat při kontaktu světla s částicemi. Jedná se na Rayleigho rozptyl, Mieho rozptyl a lom vlnění. Rayleighův rozptyl nastává, pokud poměr nejmenší částice o průměru D a dopadajícího světlo o vlnové délce λ je menší než 0,1. Jestliže je mezi $0,1 < D/\lambda < 1$ dochází k Mieho rozptylu. Poslední ze tří jmenovaných nastane při hodnotách $D/\lambda > 1$ (Dreux *et al.*, Richard Scientific).

3. 7. 2. Srovnání ELSD s jinými detektory

Použití ELS detektorů je převážně zaměřeno na analýzu sloučenin, které jsou netěkavé a nejsou schopny absorbovat nad 200 nm (např. nasycené uhlovodíky, steroidy, tenzidy, cukry). Na rozdíl od optických absorpčních detektorů je citlivost detekce v ELSD nezávislá na spektrálních vlastnostech látek (Man *et al.*, 2010). U ELSD vycházíme z absolutního množství látky. Ve srovnání s tradičními RI (index lomu) detektory ELSD poskytují mnoho výhod. Jednou z výhod je, že vlivem gradientu rozpouštědla nedochází k ovlivnění ELSD signálu (Lucena *et al.*, 2007). S ohledem na optické vlastnosti není potřeba, aby analyzované sloučeniny obsahovaly chromofory v jejich molekulární struktuře. Naopak chromofory jsou nezbytnou podmínkou pro fotometrickou a fluorimetrickou detekci (Man *et al.*, 2010). ELSD je kompatibilní s mnohem širším rozsahem rozpouštědel a modifikátorů, protože produkuje stabilní základní linii v gradientové eluční chromatografii. Z těchto důvodů jsou ELSD navrženy jako screeningové detektory v kapalinové chromatografii, protože kombinace chromatografie a MS je příliš drahá a vyhrazena pouze pro určité analýzy (Meehan *et al.*, 2003). Na straně druhé, mají ELS detektory obecně nižší citlivost a menší lineární dynamický rozsah.

3. 8. Nanočástice a mikročástice

Oblast nanotechnologií, nanočástic, mikročástic, nanomateriálů aj. je poměrně mladá oblast poskytující řadu možností. Objev nanočástic se datuje mezi 50-60. léty 20. století. V tomto období Paul Ehrich pracoval na konceptu doručení příslušných látek do cílových oblastí, které by značně zlepšily látkovou terapii. Tato myšlenka vedla ke zrození nanočástic, jako možných nosičů. Koncem 60. let 20. století byly vynalezeny první nanočástice sloužící pro podávání léků a očkovacích látek (Kreuter, 1997). Nanočástice jsou pevné částice, které dosahují rozměrů od 10 nm do 1000 nm (1 μ m). Skládají se z makromolekulárních látek, v nichž je účinná složka (lék/léčivo nebo biologicky aktivní látka) rozpuštěna, uchycena nebo zapouzdřena. Tento druh částic se používá jako nosič léčiv, do kterého mohou být léky nebo antigeny začleněny ve formě tuhých roztoků nebo ve formě pevných disperzí. Mohou se vázat na různé materiály pomocí absorpce, kdy je aktivní složka absorbována nebo se k nim chemicky vázat pomocí vazebních sil (Kreuter, 1996). Nanočástice jsou součástí nanotechnologií. Pojem nanotechnologie označuje technologii, která se zabývá nanoobjekty, materiály, zařízeními a procesy s nimi spjaté, které probíhají v rozsahu nanometrů. Nanomateriály jsou takové materiály, jejich fyzikální vlastnosti jsou dány nanoobjekty, které obsahují. Nanomateriály jsou raženy do kompaktních

materiálů a nanodisperzí (Gubin *et al.*, 2005). Nanočástice mají vysoký potenciál nejen kvůli své velikosti, ale také díky jejich tvaru, který má značné výhody např. velká plocha, ultra-jemný povrch. Jsou rozsáhle využívány jako klíčové složky v oblasti elektroniky, optických výrobků, barev, laků, supravodičů, polovodičů aj. (Hota *et al.*, 2004). Mezi magnetické nanočástice a mikročástice patří magnetit, Fe_3O_4 a maghemit, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Jedná se o oxidy železa, které lze využít pro různé biochemické a biotechnologické aplikace (Pečová *et al.*, 2011).

3. 8. 1. Vlastnosti magnetických nanočástic

Magnetické vlastnosti nanočástic jsou určeny mnoha faktory, mezi které patří chemické složení, typ krystalové mřížky, velikostí a tvarem částic, morfologie, interakcí s okolní hmotou a sousedními částicemi. Změnou těchto faktorů dochází do určité míry k ovlivnění magnetických vlastností materiálů (Gubin *et al.*, 2005). Velikost povrchu je jedna z klíčových vlastností nanočástic, která umožňuje navázání specifických ligandů. Povrch nanočástic dosahuje řádově hodnot $100 \text{ m}^2/\text{g}$. Efektivnímu navázání ligandů usnadňuje nanočásticím jejich přenos. Nanočástice slouží jako jejich nosiče. Ty jsou využity nejen pro účinné a rychlé imobilizace biologicky aktivních látek, ale také pro jejich separaci (Pečová *et al.*, 2010). Nelze docílit, že tyto faktory budou zachovány během syntézy nanočástic. Často vznikají nanočástice odlišných rozměrů a chemického složení, proto vlastnosti stejného druhu nanočástic se do určité míry mohou jevit odlišné (Gubin *et al.*, 2005). Magnetické částice jsou snadno manipulovatelné účinkem vnějšího magnetického pole. Magnetické vlastnosti nanočástic umožňují navázat velké množství specifických ligandů na svůj povrch. Povrch nanočástic dosahuje řádově hodnot $100 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$. Efektivnímu navázání umožní nanočásticím přenášet tyto specifické ligandy ve formě nosičů. Ty jsou využity nejen pro účinné a rychlé imobilizace biologicky aktivních látek, ale také pro jejich separaci (Pečová *et al.*, 2010).

3. 8. 2. Příprava magnetických nanočástic

Existuje řada metod, které slouží k přípravě magnetických nanočástic nebo mikročástic. Jejich syntéza zahrnuje řadu chemických reakcí, ve kterých je železo zastoupeno ve formě solí nebo prekurzorů např. srážecí reakce solí, termický rozklad použitých prekurzorů, mikroemulzní techniky. Často používaná a účinná metoda přípravy nanočástic je mikroemulzní technika. Její princip je založen na tvorbě micel, které jsou obklopeny magnetickými nanočásticemi. Micely vznikají z termodynamicky stálé disperze dvou nemísitelných fází. Velikost vzniklých micel má vliv na velikost

nanočástic. Nitra micel lze kontrolovat a tím měnit i velikost nanočástic. Další metodou je příprava nanočástic oxidů železa pomocí rozkladu železa za zvýšené teploty nebo působením ultrazvuku (Pečová *et al.*, 2011)

3. 8. 3. Využití nanočástic a mikročástic

S rozvojem nanotechnologií se magnetické nanočástice a mikročástice dostaly do popředí zájmu. Jsou vhodné pro imobilizaci enzymů, protože poskytují velkou plochu a jednoduché odstranění z reakční směsi pomocí magnetického pole. Magnetické nanočástice byly použity k imobilizaci mnoha enzymů jako lipasa, proteasa, glukoamylasa atd. Rozhodující vlastností magnetických nanočástic je tendence se shlukovat. Shlukované magnetické Fe_3O_4 nanočástice tvoří silnou magnetickou interakci dipól-dipól mezi částicemi (Pan *et al.*, 2009). Vzhledem ke svým vlastnostem představují nanočástice slibné nosiče léčiv. Mají potenciál přenášet antivirové látky do HIV infikovaných a neinfikovaných makrofágů (Kumar, 2000).

4. Experimentální část

5. 1. Materiál a chemikálie

- α -laktosa monohydrát (Sigma Aldrich, USA)
- α -D-glukosa (Sigma Aldrich, USA)
- α -D-galaktosa (Sigma Aldrich, USA)
- Laktozyme (Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid hořečnatý (Lachema Brno, Česká Republika)
- Kyselina trifluoroctová (Sigma Aldrich, USA)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Merck, Německo)
- Trihydrát hexakynoželeznatého draselného (Sigma Aldrich, USA)
- Heptahydrát síranu zinečnatého (Sigma Aldrich, USA)
- NaOH (Lachema Brno, Česká Republika)
- Trvanlivé mléko plnotučné (0,5%), UHT (Pilos, Česká republika)
- Trvanlivé mléko plnotučné (1,5%), UHT (Pilos, Česká republika)
- Trvanlivé mléko plnotučné (3,5%), UHT (Pilos, Česká republika)
- Magnetické mikročástice (Fe_3O_4) obalené chitosanem (Ivo Šafařík, České Budějovice)

4. 2. Přístroje

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Pipety 1 μl – 5 ml (Eppendorf, Německo)
- Digitální předvážky (Kern, Německo)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo)
- HPLC vialky (National Scientific, Velká Británie)
- Rotátor PRS- 26 (Biosan, Německo)

Chromatografický systém:

- HPLC (KNAUER Smartline Praha, Německo)
- Termostat kolony CROCO-CIL (Ercatech AG, Bern, Švýcarsko)
- PDA detektor Smartline 2800 (Knauer, Německo)
- Dávkovací ventil (dávkovací smyčka o objemu 100 μl)
- Chromatografická kolona - Zorbax NH_2 (250 $\times$ 4,6 mm; 5 μm , Waters, USA)

- Chromatografická kolona – Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 µm, Phenomex, USA)
- Detektor ELSD 3300 (Alltech, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem Clarity (DATA APEX, Česká Republika)

4. 3. Metody

4. 3. 1. Příprava standardních roztoků sacharidů

Základní roztoky sacharidů o koncentraci 1mg/ml byly připraveny rozpuštěním pevných sacharidů (laktosy, glukosy, galaktosy) v destilované vodě.

4. 3. 2. Srážení tuků a proteinů z mléka

Bylo odebráno 0,5 ml mléka (3,5% obsahu tuku) a přeneseno do odměrné baňky o objemu 25 ml. K mléku bylo přidáno 10 ml destilované vody, aby se zabránilo rozkladu mléka. Po přidavku vody a promíchání baňky byla do roztoku pipetována srážecí činidla pro vysrážení proteinů a tuků. Jako srážecí činidlo byl použit Carrezův roztok I ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$) o koncentraci $3,6 \cdot 10^{-3}$ mol/l a roztok II ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$), který měl koncentraci 0,01 mol/l. Srážecí činidla se postupně pipetovala po kapkách pomocí dvou pipet, neboť při sebemenším kontaktu těchto dvou činidel dochází k okamžitému srážení. Po přidavku 1 ml Carrezova roztoku I a II byl roztok promíchán krouživým pohybem baňky a nechán 10 minut sedimentovat. Po 10 minutách bylo odebráno množství 6 ml vysráženého mléka a přeneseno do tří centrifugačních zkumavek (ependorfky) o objemu 2 ml. Centrifugační zkumavky obsahující roztok mléka zbaveného proteinů a tuků byly přeneseny do centrifugy a centrifugovány při 5°C po dobu 5 minut při 13600 rfc. Po centrifugaci byly vzorky pipetovány do nových centrifugačních zkumavek s mikrospiny a znovu centrifugovány za stejných podmínek jako při první centrifugaci. Purifikovaný vzorek zbavený mechanických nečistot o objemu 2 ml byl pipetován do HPLC vialek a použit pro HPLC-ELSD analýzu.

4. 3. 3. Vývoj HPLC-ELSD metody

Separace na koloně Zorbax NH_2 a koloně Luně Silice. Pro separace směsi sacharidů (laktosy, glukosy a galaktosy) na koloně Zorbax NH_2 (250 × 4,6 mm; 5 µm, Waters, USA) byla připravena mobilní fáze A a B o složení acetonitril/voda (80:20, v/v) s měnícím se gradientem v 15 minutě (70:30, v/v). Každá analýza trvala 26 minut. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a objem nástřiku 20 µl.

Pro separaci směsi sacharidů (laktosy, glukosy a galaktosy) na koloně Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm, Phenomenex, USA) byla připravena mobilní fáze A a B o složení acetonitril/voda (95:5, v/v). Každá probíhající analýza trvala 12 minut. Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min a objem nástřiku 2 μl.

4. 3. 4. Optimalizace odezvy detektoru

Pro dosažení nejlepších výsledků bylo potřeba optimalizovat parametry detektoru. Jednalo se o teplotu detektoru a průtok plynu (dusíku).

Pro optimalizaci teploty detektoru byla použita laktosa (1mg/ml) a kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm, Phenomenex, USA), kterou protékala mobilní fáze ACN/voda (95:5, v/v) o průtoku 0,2 ml/min a objem nástřiku 2 μl. Detektor byl equilibrován na startovací teplotu 35°C. Pro každou další analýzu byla teplota zvýšena o 10°C než předešlá (35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C). Tímto způsobem byla teplota postupně zvyšována až po teplotu 75 °C.

Optimalizace průtoku plynu v detektoru byla provedena se stejnou kolonou a podmínkami jako u teplotní optimalizace detektoru. Pro optimalizaci byla zvolena teplota 35°C. Po ustálení rovnováhy a podmínek vhodných pro separaci byla provedena analýza plynu o různém průtoku (1 l.min⁻¹, 1,2 l.min⁻¹, 2 l.min⁻¹, 3 l.min⁻¹).

4. 3. 5. Určení analytických parametrů metody

Mezi stanovené analytické parametry metody patřil limit detekce a lineární dynamický rozsah. Pro stanovení LOD a lineárního dynamického rozsahu bylo potřeba sestavit kalibrační řadu roztoků laktosy o různých koncentracích (0,01 mg.ml⁻¹, 0,02 mg.ml⁻¹, 0,05 mg.ml⁻¹, 0,1 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹, 10 mg.ml⁻¹, 12,5 mg.ml⁻¹, 25 mg.ml⁻¹, 50 mg.ml⁻¹, 100 mg.ml⁻¹). Měření probíhalo od nejnižší koncentrace roztoku laktosy po nejvyšší koncentraci. Analýza proběhla na optimalizovaném HPLC-ELSD. Použita byla kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm) při průtoku MF ACN/voda (95:5 v/v). Objem nástřiku byl 2 μl a doba analýzy 12 minut.

4. 3. 6. Stanovení operační stability enzymu

100 mg magnetického nosiče s imobilizovaným enzymem bylo přidáno do 10 ml mléka obohaceného o 5 mM MgCl₂ ve zkumavce. Následně byl umístěn na rotátor a 20 minut protřepáván při 20 rpm. Po protřepání byl vzorek opakovaně použit. Mezi jednotlivými reakcemi byl 2 krát promyt puřrem. Z reakční směsi bylo odebíráno

množství 500 μ l v určitých časových intervalech (10 minut, 20 minut, 30 minut). Po odebrání se do vzorku pipetovalo 10krát zředěná TFA (5 μ l). Po přidání TFA byl roztok neutralizován 1M NaOH (6,5 μ l). Takto upravený vzorek byl připraven k srážení Carrezovými roztoky. Po vysrážení a centrifugaci byl připraven pro HPLC analýzu.

4. 4. Výsledky a diskuze

4. 4. 1. Vývoj HPLC-ELSD metody analýzy jednoduché směsi sacharidů

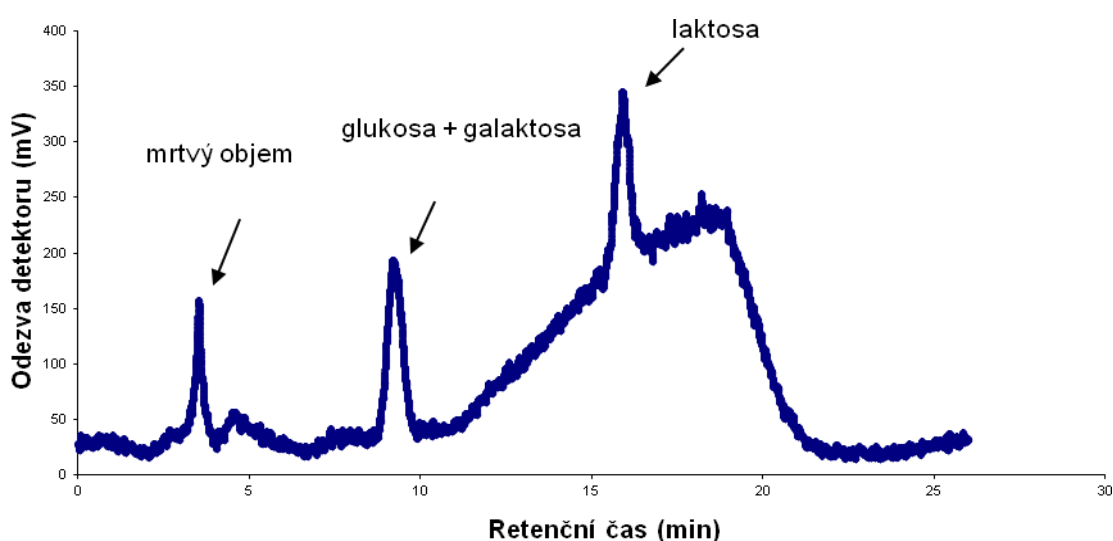
Dříve používaná metoda stanovení aktivity laktasy byla založena na fotometrickém měření produktu vzniklého přes několik spřažených enzymových reakcí. Tato metoda byla nepřesná a časově náročná. Dílčím úkolem v této bakalářské práci byl vývoj přímé HPLC-ELSD metody. Pro úspěšnou separaci sacharidů je zapotřebí nejprve nalézt vhodný chromatografický systém. Pro HILIC byla použita kolona Zorbax NH₂ a Luna Silica a mobilní fáze acetonitril/voda. Obě kolony separovaly za určitých podmínek substrát a produkty (teplota kolony, složení a průtok MF).

Pro kolonu Zorbax NH₂ se ukázala vhodná gradientová eluce s vyšším obsahem vody (20-30%) obr. 7., protože při izokratické eluci nedocházelo k separaci píků sacharidů, nestálosti základní linie a velké časové prodlevě mezi jednotlivými píky směsi sacharidů. Vzhledem k jejímu většímu vnitřnímu průměru (4,6 mm) byl zvolen průtok 1 ml/min.

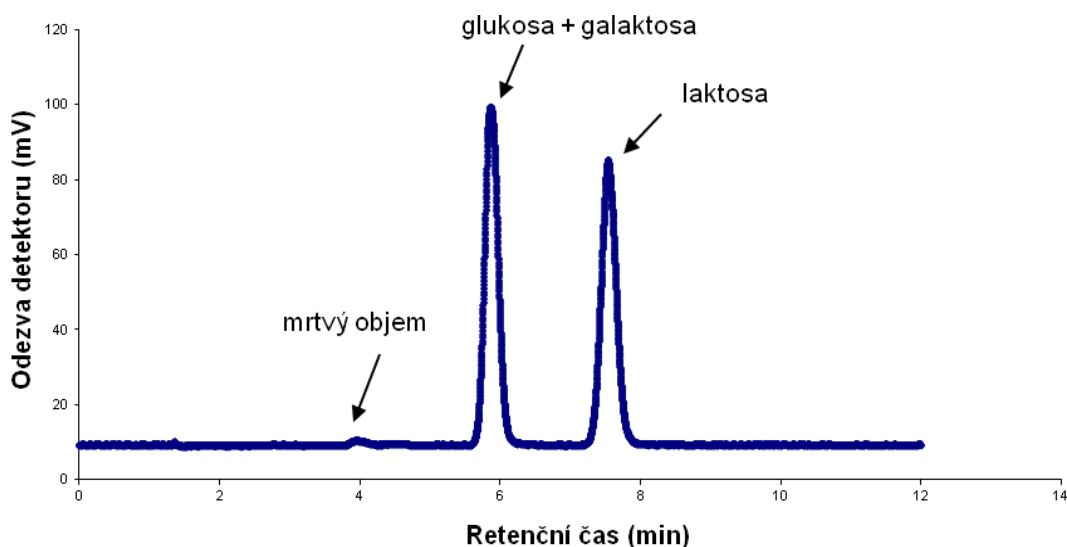
Kolona Luna Silica (250 $\times$ 2,0 mm; 5 μ m, Phenomenex, USA) rovněž separovala směs testovaných sacharidů obr. 8. a to při složení mobilní fáze acetonitril/voda (95:5 v/v) a průtoku MF (0,2 ml/min). Z chromatogramu je patrné, že hodnoty šumu jsou minimální a dosahují hodnot koem 0,4 mV. Nevýhodou Luny Silica je čas (několik hodin-den) potřebný pro její ekvilibraci. Při příliš krátké ekvilibraci poskytovala nereprodukovatelné výsledky.

Zorbax NH₂ (amino-modifikovaná kolona) a Luna Silica (nemodifikovaný silikagel) byly použity pro porovnání výsledků, obě kolony mají odlišné stacionární fáze, a proto nebyly předpokládány podobné výsledky a stejná úspěšnost separace směsi sacharidů. Obě analýzy byly provedeny za optimalizovaných podmínek pro příslušné kolony. Na obr. 7 pozorujeme stabilní základní linii s minimálními hodnotami šumu (0,2-0,4 mV). Na rozdíl od obr. 8, kde velikost šumu je znatelnější a dosahujících

hodnot 10 mV s měnícím poměrem acetonitril/voda a tlakem. Rozdílná velikost píků je způsobena množstvím nástřiku. U Zorbax NH₂ byl injektován objem 20 µl, zatímco pro separaci na Luně Silica pouze objem 2 µl. U Luny bylo dosaženo chromatografie bez pozadí, na rozdíl od kolony Zorbax NH₂. Použití Luny Silica vedlo k podstatnému zkrácení analýzy z doby 26 minut na 12 minut.



Obr. 7: Chromatogram HILIC separace směsi sacharidů za optimalizovaných podmínek ELSD detektoru. Mobilní fáze (ACN/voda (80:20 v/v)), kolona Zorbax NH₂ (250 × 4,6 mm; 5 µm). Směs laktosy, glukosy a galaktosy (1 mg/ml).



Obr. 8: Chromatogram HILIC separace směsi sacharidů za optimalizovaných podmínek ELSD detektoru. Mobilní fáze (ACN/voda (95:5 v/v)), kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm). Směs laktosy, glukosy a galaktosy (1 mg/ml).

4. 4. 2. Teplotní optimalizace ELS detektoru

Jedním z cílů bakalářské práce bylo najít vhodné podmínky pro HPLC-ELSD detekci. Pro teplotní optimalizaci byla použita kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm) o rozměrech, která byla temperována na 35 °C. Kolonou protékala mobilní fáze ACN/vody (95:5 % V/V) o průtoku 0,2 ml/min. Vzhledem k vysokému obsahu ACN byla použita použitá izokratická eluce o délce 12 minut. Měřili jsme v teplotním rozsahu 35-75°C. Výsledné hodnoty integrovaných ploch chromatografických píků byly zaneseny do tabulky č. 1. Z tabulky je patrný trend poklesu hodnot ploch se zvyšující se teplotou. Pro všechny testované teploty se hodnota šumu prakticky neměnila a nabývala hodnot 0,4 mV. Teplota 35°C se ukázala jako nejvhodnější pro měření. Poměr signál/šum dosahoval nejvyšších hodnot právě při této teplotě.

Tab. 1: Teplotní optimalizace ELSD

Teplota (°C)	Plocha (mV.s)
35	3 643,77
45	2 952,17
55	2 795,84
65	2 762,37
75	2 701,34

4. 4. 3. Optimalizace průtoku plynu ELSD

Pro optimalizaci průtoku plynu v ELSD byla zvolena teplota 35°C, která se ukázala jako nejvhodnější v předchozím experimentu. Optimalizace probíhala na koloně Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 µm) a za stejných podmínek nastavení, které byly použity u teplotní optimalizace. Byl testován plyn (dusík) o průtoku (1 l.min⁻¹, 1,2 l.min⁻¹, 2 l.min⁻¹, 3 l.min⁻¹). Při průtoku 1 l.min⁻¹ a teplotě 35°C nebylo možné dosáhnout měřitelných výsledků. Naměřené hodnoty jsou zdokumentovány v tabulce č. 2. Do tabulky byly kromě hodnoty ploch zahrnuty výška signálu, šum a jejich poměr. Velikost plochy píků a výška signálu dosahovaly nejvyšších hodnot (3598,14 mV.s, 224,5 mV) pro průtoku 2 ml.min⁻¹, ale poměr signál/šum byl menší. Poměr signál/šum dosahoval nejvyšších hodnot u průtoku 3 ml.min⁻¹. Na základě dosažených výsledků byl průtok 2 ml.min⁻¹ zvolen jako nejvhodnější, neboť rozdíly mezi poměrem signál/šum jsou minimální mezi 2 a 3 ml.min⁻¹, ale rozdíl velikosti plochy chromatografických píků je významný.

Tab. 2: Optimalizace nastavení průtoku plynu detektoru

Průtok (ml.min ⁻¹)	Plocha (mV.s)	Výška signálu (mV)	Šum (mV)	Poměr S/N
1,0	–	–	–	–
1,2	3 715,96	219,3	1,5	146,2
2,0	3 598,14	224,5	0,4	561,3
3,0	2 688,83	177,5	0,3	591,7

4. 4. 4. Určení analytických parametrů metody

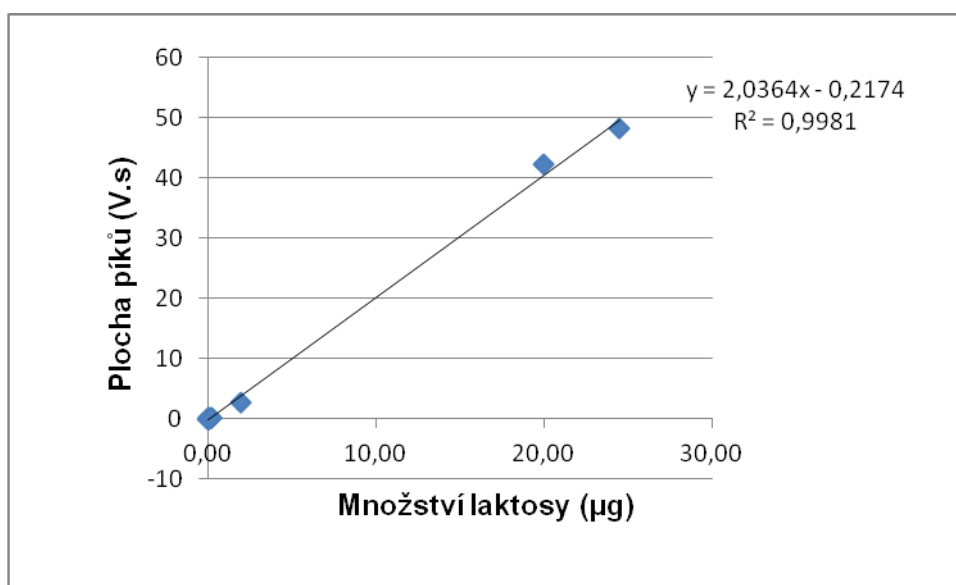
Určení lineárního dynamického rozsahu a limity detekce (LOD). Pro určení lineárního dynamického rozsahu sloužila kalibrační řada roztoku laktosy (obr. 9) o koncentracích (0,01 mg.ml⁻¹, 0,02 mg.ml⁻¹; 0,05 mg.ml⁻¹, 0,1 mg.ml⁻¹; 1 mg.ml⁻¹; 10

mg.ml⁻¹, 12,5 mg.ml⁻¹, 25 mg.ml⁻¹, 50 mg.ml⁻¹, 100 mg.ml⁻¹). Na chromatografickou kolonu byly dákovány 2 µl. Nejnižší měřitelná koncentrace byla 0,01 mg.ml⁻¹ a nejvyšší 12,5 mg.ml⁻¹ (obr. 9.), při které nedocházelo k saturaci signálu ELS detektoru. Lineární dynamický rozsah je tedy větší než 3 řády.

LOD byl určen jako poměr signál:šum=3:1 pro koncentraci laktosy o 0,01 mg.ml⁻¹. Pro tuto koncentraci dosahoval hodnotu poměru signál:šum = 3,67. Množství laktosy v tomto nástřiku bylo stanoveno pomocí obr. 9. a odpovídalo hodnotě 0,02 µg laktosy (dávkovaný objem 2 µl).

4. 4. 5. Stanovení množství laktosy v reálném vzorku mléka

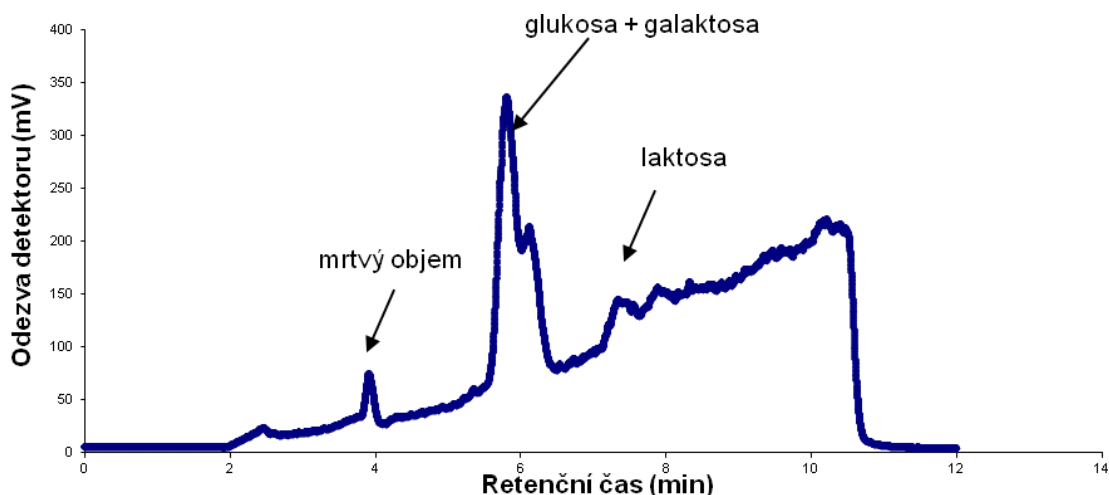
Pro určení obsahu laktosy v reálném vzorku mléka byla sestavena kalibrační řada roztoků o různých koncentracích (0,01 mg.ml⁻¹, 0,02 mg.ml⁻¹; 0,05 mg.ml⁻¹, 0,1 mg.ml⁻¹; 1 mg.ml⁻¹; 10 mg.ml⁻¹, 12,5 mg.ml⁻¹). Dávkovány byly 2 µl. Ze získaných hodnot ploch píků (tab. 3) byla získána rovnice přímky (graf č. 1), ze které bylo vypočítáno množství disacharidu. Obsah laktosy v mléku byl stanoven na 31,66 g v 1 litru mléka. Toto množství laktosy bylo porovnáno s údaji, které byly uvedeny v odborné literatuře. Obsah laktosy v trvanlivém mléku je v rozmezí 3,7-5,1%. Průměrná hodnota laktosy odpovídá 48 g.l⁻¹ (Scrimshaw & Murray, 1988).



Obr. 9. Graf zobrazující kalibrační řadu roztoků laktosy o různých koncentracích. Mobilní fáze (ACN/voda (95:5 v/v)), kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 µm). Laktosa (0,01 mg.ml⁻¹, 0,02 mg.ml⁻¹; 0,05 mg.ml⁻¹, 0,1 mg.ml⁻¹; 1 mg.ml⁻¹; 10 mg.ml⁻¹, 12,5 mg.ml⁻¹); objem nástřiku 2 µl.

4. 4. 6. HILIC separace substrátu a produktů enzymové reakce v reálném vzorku mléka

Sacharidy v mléce ošetřeném enzymem byly měřeny za optimalizovaných podmínek, ke kterým jsem dospěl při optimalizaci nastavení HPLC a detektoru ELSD. Pro separaci byla použita kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm). Substrát - laktosa - byl vystaven 2 dennímu působení enzymu laktasy. Po zastavení enzymové reakce byly vysráženy proteiny a tuky a vzorek analyzován HPLC. Z chromatogramu (obr. 10) je viditelný rozklad laktosy na své monosacharidové složky (glukosu a galaktosu). Rozklad laktosy byl pozorovatelný pouze tehdy, pokud byl k vzorku mléku přidán 2-5 mM roztok $MgCl_2$. Bez jeho přítomnosti nedocházelo k rozkladu substrátu na jednotlivé produkty enzymatické reakce.

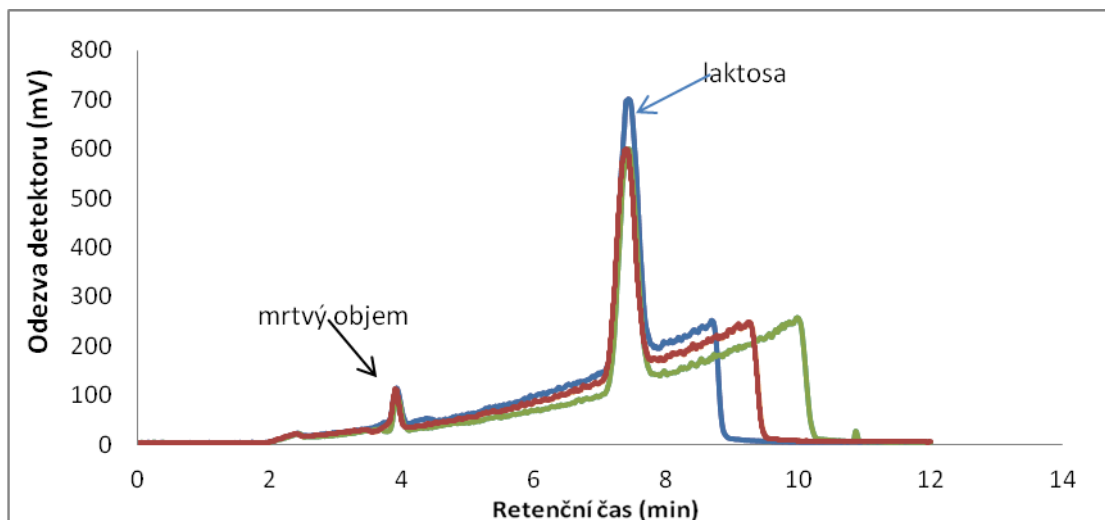


Obr. 10. HILIC separace substrátu a produktů enzymové reakce. Mobilní fáze (ACN/voda (95:5 v/v)), kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm). Chromatogram po 2 dnech působení enzymu na substrát - laktosu - za vzniku glukosy a galaktosy.

4. 4. 7. Porovnání obsahu laktosy v mléku o rozdílné koncentraci tuků

Byly analyzovány 3 druhy mléka (Pilos, Česká Republika obr. 12) o rozdílných koncentracích tuků (0,5 %, 1,5 %, 3,5 %). Z chromatogramu (obr. 11) je patrné, že mléko 0,5 % (modrá barva) obsahuje více laktosy ($62,6 \text{ g.l}^{-1}$) než mléka o obsahu tuku 1,5 % a 3,5 % (56 g.l^{-1} a 54 g.l^{-1}), což zhruba odpovídá literárním údajům

(Scrimshaw & Murray, 1988). Dále je z chromatogramu zřejmé, že použitá metoda srážení tuků a proteinů pravděpodobně vyžaduje optimalizaci. S rostoucím obsahem tuku totiž roste úroveň základní linie příslušných chromatogramů.



Obr. 11. Chromatogram HILIC porovnání množství laktosy v mléku o odlišných koncentracích tuku. Mobilní fáze (ACN/voda (95:5 v/v)), kolona Luna Silica (250 × 2,0 mm; 5 µm). Laktosa s rozdílným pozadím podle množství tuku obsaženého v mléku.



Obr. 12: Použité druhy trvanlivého mléka o rozdílných koncentracích tuků. Trvanlivé mléko UHT (Pilos, Česká Republika).

4. 4. 8. Operační stability enzymu

Ke stanovení operační stability laktasy imobilizované na chitosanových částicích s magnetitovým jádrem byla použita HPLC-ELSD metoda. Nejprve byl sledován úbytek obsahu laktosy v čase v prostředí pufru (100 mM K-Pi pH 7 s přídavkem 5 mM MgCl_2). Roztok substrátu byl vystaven působení imobilizovaného enzymu po dobu 30 minut. Jak vyplývá z hodnot shrnutých v tabulce 3, po 20 minutách působení enzymu, kdy došlo k téměř 50% úbytku laktosy.

Tab. 3: Úbytek obsahu substrátu v čase

Čas (min)	Plocha píku (mV.s)	Obsah laktosy[%]
0	66 672	100
10	45 742	69
20	33 906	51
30	27 787	42

Tab. 4: Operační stabilita enzymu

Číslo cyklu	Plocha píku (mV.s)	Zbytková aktivita[%]
1. cyklus	33 906	100
2. cyklus	34 730	102
3. cyklus	33 598	100
4. cyklus	32 132	95
5. cyklus	33 906	100
6. cyklus	30 966	91

Pro stanovení operační stability bylo tedy určeno, že 1 cyklus představuje dvacetiminutové působení enzymu na substrát v reálném vzorku. Částice s enzymem byly po každém cyklu promyty a znovu použity. Procentová změna aktivity laktasy byla zaznamenána v tabulce č. 4., ze které je patrná vysoká operační stabilita. Během 6 cyklů došlo pouze k 9 % poklesu aktivity laktasy. Tyto výsledky umožňují opakované použití enzymu a tím snižují náklady pro použité reakce.

5. Závěr

- Byla provedena literární rešerše na téma sacharidy, metody stanovení sacharidů, HPLC, ELSD, HILIC a nanočástic. Informace byly roztrženy a zpracovány v teoretické části předkládané práce.
- Byly nalezeny optimální podmínky pro HPLC-ELSD detekci vybraných sacharidů za použití nemodifikované silikagelové kolony Luny Silica (250 × 2,0 mm; 5 μm), která se ukázala jako nejvhodnější pro separaci dané směsi sacharidů. Byl nalezen vhodný průtok plynu detektoru o rychlosti 2 ml/min a teplota detektoru 35°C. HPLC-ELSD nahradila dříve využívanou fotometrickou metodu stanovení aktivity laktasy. Je dostatečně rychlá, selektivní a výhodná zejména díky možnosti stanovení aktivity enzymu v mléce. Citlivost ELSD detekce byla upravena metodou přípravy vzorku tak, aby byl poměr signál:šum > 10.
- Byl stanoven obsah laktosy v reálném vzorku mléka a porovnán s množstvím uváděným v odborné literatuře. Kromě absolutní hodnoty obsahu laktosy byla testována robustnost metody ve vztahu k obsahu tuku v mléce. Z výsledků vyplývá, že použitý postup srážení proteinů a tuků vyžaduje další optimalizaci – úroveň základní linie chromatogramu je příliš vysoká. Substrát laktosa byl vystaven působení enzymu za vzniku příslušných monosacharidů glukosy a galaktosy. Bez přídavku 5 mM MgCl₂ enzymatická reakce neprobíhala.
- U imobilizované laktasy (β-galaktosidasy), u které byla testována operační stabilita, bylo zjištěno, že opakovatelné použití je možné. Po 6 cyklech došlo pouze k 9 % poklesu operační stability enzymu.

6. Seznam elektronických odkazů a použité literatury

Dreux M., Lafosse M., Morin-Allory L., Richard Scientific:

<http://www.richardscientific.com/pdffiles/WhatisELSD.pdf> (3. 5. 2012)

Kraml J., Crkovská J. (2010):

http://che1.lf1.cuni.cz/html/enzymy_navod_A.pdf (2. 5. 2012)

Obr. 2:

http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm (28.4 2012)

Tosoh Bioscience:

http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/D55C29AB-62C1-4157-972F-14B2A766D531/0/SR055_Amide80.pdf (28. 4. 2012)

Young C. S., Dolan J. W. (2003):

<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/082003/47198/article.pdf> (28. 4. 2012)

Alpert A. J. (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A.* **499**: 177–196.

Banerjee M., Chakravarty A., Majumdar S. K. (1984) Characteristics of yeast β -galactosidase immobilized on calcium alginate gels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:271–274.

Beilmann B., Langguth P., Hausler H., Grass P. (2006) High-performance liquid chromatography of lactose with evaporative light scattering detection, applied to determine fine particle dose of carrier in dry powder inhalation products. *J. Chromatogr. A.* **1107**: 204–207.

Boersema P. J., Mohammed S., Heck, A. J. R. (2008) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**: 151–159.

Buszewski B., Noga S., (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**:231–247.

Cabral J. M. S., Kennedy J. F. (1993) Thermostability of Enzymes. pp 163– 179, Springer Verlag, Berlin, Německo.

Campbell M. K., Farrell S. O. (2011) Biochemistry pp. 451-465, Cole Cengage Learning, Sout Melbourne, Austrálie.

Charlesworth J. M. (1978) Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatogramy. *Anal. Chem.* **50**: 1414–1420.

Churáček J., Jandera P. (1985) Úvod do vysokuúčinné kapalinové chromatografie, pp. 29-33. SNTL, Praha, Česká Republika.

- Dam B. V., Revallier-Warffemius J. G. R., Dam-Schermerhorn L. C. V. (1950) Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilit*. *Neth. Milk. Dairy. J.* **4**: 96–114.
- Fu Q., Liang T., Zhang X., Du Y., Guo Z., Liang X. (200) Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. *Carbohydr. Res.* **345**: 2690-2697.
- Gekas V. Lopez-Leiva M. (1985) Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process. Biochem.* **20**: 2–12.
- Gubin S. P., Koksharov Y. A., Khomutov G. B., Yurkov G. Y. (2005) Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russ. Chem. Rev.* **74**: 489 – 520.
- Holzbecher Z., Churáček J. a kol.(1987) Analytická chemie, pp. 20-47 vyd. Praha: SNTL, Česká Republika.
- Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N. (2011) Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effect, structural selectivity and separation efficiency. *J. Chromatogr. A* **1218**: 5903-5919.
- Kellner R., Mermet J. M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H. M. (2004) Analytical Chemistry, pp. 563-570, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Německo.
- Klouda P. (2003) Moderní analytické metody. pp. 25-26, vyd. Pavel Klouda, Česká Republika.
- Krajewska B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 126–139.
- Kratz E., Eksteen R., Schoenmakers P., Miller N. (1998) Handbook of HPLC, pp. 1-5, Vol. 78, Marcel Dekker 270 Madison Avenue, New York, USA.
- Kreuter J. (2007) Nanoparticles-a historical perspective. *Int. J. Pharm.* **331**: 1-10.
- Kumar M. N. V. R. (2000) Nano and Microparticles as Controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2**: 234-258.
- Lapkin A. A., Walker A., Sullivan N., Khambay B., Mlambo B., Chemat S. (2009) Development of HPLC analytical protocols for quantification of artemisinin in biomass and extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 908–915.
- Linden J. C., Lawhead C. L. (1975) Liquid chromatography of saccharides *J Chromatogr A.* **105**: 125–133.
- Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M. (2007) Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**:1663-1672.

- Maksimainem M., Hakulinen N., Kallio J. M., Timoharju T., Turunen O., Rouvinen J. (2010) Crystal structures of *Trichoderma reesei* β -galactosidase reveal conformational changes in the active site. *J. Struct. Biol.* **174**: 156-163.
- Matthews B. W. (2005) The structure of *E. coli* β -galactosidase. *C. R. Biologies* **328**: 549–556.
- Man S., Gao W., Zhang Y., Wang J., Zhao W., Huang L., Liu C. (2010) Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* **29**: 2943–2948.
- Mahoney R. R. (1997) Lactose: enzymatic modification. In *Advanced Dairy Chemistry*, Vol 3, ed by Fox P.F. pp. 77–125, Chapman & Hall, London, Velká Británie.
- McCalley D. V. (2007) Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A* **1171**: 46–55.
- McKee T., McKee J. R. (1996) Biochemistry. pp. 149-161, Wm. C. Brown Publishers, Dobuque, USA.
- Naidong W. (2003) Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *J. Chromatogr. B* **796**: 209-224.
- Pan C., Hu B., Li W., Sun Y., Ye H., Zeng X. (2009) Enzymatic Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe_3O_4 – chitosan nanoparticles. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **61**: 208–215.
- Panesar R., Panesar P. S., Singh R. S., Kennedy J. F., Bera M. B. (2007) Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. *Food. Chem.* **101**: 786-790.
- Panesar P. S. (2007) Kinetic Analysis of Lactose Hydrolysis in Milk Using *Kluyveromyces marxianus* Cells Immobilized by Alginate and Agar Gel Entrapment. *International. J. Dairy Sci.* **2**: 138-144.
- Panesar P. S., Panesar R., Singh R. S., Kennedy J. F. and Kumar H. (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**: 530–543.
- Parriot D. (1993) A Practical Guide to HPLC Detection , pp. 256–261, Academic Press, San Diego, California, USA.
- Pečová M., Zajoncová L., Poláková K., Čuda J., Šafaříková M., Šebela M., Šafařík I. (2011) Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologiích. *Chem. Listy* **105**: 524-530.

- Regnier F. E., Noel R. (1976) Glycerolpropylsilane Bonded Phases in the Steric Exclusion Chromatography of Biological Macromolecules. *J. Chromatogr. Sci.* **14**: 316–320.
- Richmond M. L., Gray J. I., Stine C. M. (1981) Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilization. *J. Dairy Sci.* **64**: 1759–1771.
- Risley D.S., Yang W.Q., Peterson J.A. (2006) Analysis of mannitol in pharmaceutical formulations using hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Sep. Sci.* **29**: 256-264.
- Sharma S., Yamazaki H. (1984) Preparation of hydrophobic cotton cloth. *Biotechnol. Lett.* **6**: 301–306.
- Scrimshaw N. S., Murray E. B. (1988) The Acceptability of Milk and Milk Products in Populations with a High Prevalence of Lactose Intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**: 1080-1159.
- Siso M. I. G., Doval S. S. (1994) Kluyveromyces lactis immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 303–310.
- Swallow D. M. (2011) Encyclopedia of Dairy Sciences, pp. 236-240, Univerzity College London, Velká Británie.
- Vasiljevic T., Jelen P. (2002) Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**: 175–184.
- Vondrážka Z. (1996) Biochemie, pp. 39-50, Academia, Česká republika.
- Yoshida T. (2004) Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* **60**: 265–280.

7. Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
DMF	dimetylformamid
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
GH	glykosid hydrolysa
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limita (mez) detekce
NL	chromatografie v systému normálních fází
NP-LC	kapalinová chromatografie v systému normálních fází
RI	index lomu
RP-LC	kapalinová chromatografie v systému reverzních fází
RP	chromatografie v systému reverzních fází