

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Porovnání extrakčních postupů ze séra
pro HPLC stanovení liposolubilních
vitamínů**

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.
Školitel specialista: Doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.
Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 4.5. 2011

Podpis

Děkuji Doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D. za možnost vypracovat diplomovou práci na zajímavé téma v příjemném a vstřícném prostředí Výzkumné laboratoře Gerontologické a metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Dále děkuji Mgr. Markétě Kašparové za ochotu, pomoc a cenné rady k této práci. Také děkuji vedení Gerontologické a metabolické kliniky za možnost využít její laboratoř k experimentální práci.

1. Obsah

1. OBSAH.....	4
2. ÚVOD A CÍL PRÁCE	8
3. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
4. TEORETICKÁ ČÁST	11
4.1. VITAMINY SUBSTANCE NEZBYTNÉ PRO ŽIVOT	11
4.1.1. <i>Vitaminy a jejich dělení</i>	11
4.2. VITAMINY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH	11
4.2.1. <i>Vitamin A</i>	12
4.2.1.1. Význam vitamínu A a β -karotenu pro organismus	13
4.2.1.2. Komerčně dostupné metody stanovení	14
4.2.2. <i>Vitamin E</i>	15
4.2.2.1. Osud vitamínu E v organismu a jeho účinky	16
4.2.3. <i>Vitamin D</i>	16
4.2.3.1. Metabolismus vitamínu D v organismu	17
4.2.3.2. Účinky aktivních forem vitamínu D	18
4.2.3.3. Regulace sérových hladin	19
4.2.3.4. Komerčně dostupné metody stanovení vitamínu D ze séra.....	20
4.2.3.4.1. Metody kompetitivní vazby na proteiny CPBA („competitive protein-binding analysis“).....	20
4.2.3.4.2. Radioimunoanalýza (RIA).....	21
4.2.3.4.3. Chromatografické techniky	21
4.2.3.4.4. Současné trendy stanovení 25(OH)D ₂ , 25(OH)D ₃	22
4.3. METODY POUŽÍVANÉ V DIPLOMOVÉ PRÁCI.....	24
4.3.1. <i>Deproteinace</i>	24
4.3.2. <i>Centrifugace</i>	25
4.3.2.1. Preparativní centrifugace	26
4.3.2.1.1. Diferenciální centrifugace	26
4.3.2.1.2. Centrifugace v hustotním gradientu.....	27
4.3.2.2. Analytická (ultra)centrifugace	28
4.3.3. <i>Extrakce</i>	29
4.3.3.1. Liquid liquid extrakce (LLE) - extrakce z kapaliny do kapaliny	29
4.3.3.2. Solid phase extrakce (SPE) – extrakce z kapaliny na pevnou fázi.....	30
4.3.3.2.1. Instrumentce.....	30
4.3.3.2.2. Sorbenty	31
4.3.3.2.3. Selektivita SPE.....	34
4.3.3.2.4. Postup SPE.....	35
4.3.4. <i>Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	36
4.3.4.1. Principy chromatografické separace	37
4.3.4.2. Stacionární fáze v HPLC	37
4.3.4.2.1. Typy stacionárních fází pro HPLC.....	37
4.3.4.2.1.1. Stacionární fáze na bázi silikagelu	37
4.3.4.2.1.2. Hybridní stacionární fáze	38
4.3.4.2.1.3. HILIC (hydrophylic interaction liquid chromatography) stacionární fáze	38
4.3.4.2.1.4. Stacionární fáze založené na oxidech zirkonia, hliníku a titanu.....	39
4.3.4.2.1.5. Monolitické stacionární fáze	39
4.3.4.2.2. Mobilní fáze v HPLC	40
4.3.4.2.3. HPLC detektory.....	41
4.3.4.2.4. Vyhodnocení chromatogramů	42
4.3.4.2.4.1. Metoda vnějšího standardu.....	42
4.3.4.2.4.2. Metoda vnitřního standardu	43
4.3.4.2.4.3. Metoda standardního přídatku.....	43
4.3.4.2.4.4. Kvalitativní stanovení	43
4.3.4.2.5. Uspořádání HPLC	44
5. PRAKTICKÁ ČÁST.....	45
5.1. PŘÍSTROJE A POMŮCKY CHEMIKÁLIE, STANDARDY	45
5.2. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH A PRACOVNÍCH ROZTOKŮ	47
5.3. VÝCHOZÍ EXTRAKČNÍ POSTUP	49

5.3.1. Chromatografické podmínky analýzy.....	50
5.4. OPTIMALIZACE SPE POSTUPU	50
5.5. VÝVOJ A OPTIMALIZACE LLE POSTUPU	51
6. VÝSLEDKY A DISKUSE	52
6.1. OPTIMALIZACE SPE POSTUPU	52
6.1.1. <i>Optimalizace deproteinace</i>	52
6.1.1.1. Výběr vhodné teploty	52
6.1.1.1.1. Testování teploty (60°C)	52
6.1.1.1.2. Testování teploty (-28 °C).....	53
6.1.1.2. Výběr vhodného deproteinačního činidla	53
6.1.1.3. Optimalizace doby působení deproteinačního činidla.....	54
6.1.2. <i>Vliv množství vzorku na stanovení</i>	55
6.1.3. <i>Eluce</i>	56
6.1.3.1. Výběr vhodného elučního činidla	56
6.1.3.2. Odpařování eluátu.....	57
6.2. LIQUID LIQUID EXTRAKCE.....	58
6.2.1. <i>Zkoušení deproteinačního činidla</i>	58
6.2.1.1. Výběr nejvhodnějšího objemu deproteinačního činidla (DC).....	58
6.2.1.2. Výběr vhodného deproteinačního činidla	60
6.2.2. <i>Změna pH extrakční směsi</i>	62
6.2.2.1. Zvýšení pH - saponifikace	62
6.2.2.2. Snížení pH	63
6.2.2.2.1. Testování kyseliny trichloroctové.....	63
6.2.2.3. Ověření antioxidačního efektu používané kyseliny askorbové	65
6.2.2.4. Testování množství extrakčního činidla	65
6.2.2.5. Zvýšení polaritý extrakčního činidla	66
6.3. POROVNÁNÍ VÝCHOZÍHO POSTUPU A LLE.....	68
7. ZÁVĚR.....	72
8. POUŽITÁ LITERATURA	74

Abstrakt

V diplomové práci byly porovnány metody extrakce na pevnou fázi (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) použité pro separaci vitamínů rozpustných v tucích: A (retinol), E (α -tokoferol), D₂ (ergokalciferol), D₃ (cholecalciferol), 25-(OH)D₃ (kalcidiol) z lidského séra. Vitaminy byly následně stanoveny vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Jako výchozí metoda byl použit postup, který byl vyvinut a částečně zvalidován v rámci diplomové práce: Aplikace SPE a technologie monolitních kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek (Horčíčková 2009). Tento postup byl dále optimalizován za účelem navýšení výtěžnosti extrakce pro cílové analyty 25(OH)D₃, D₂ a D₃ a zkrácení preanalytické fáze. Byly testovány podmínky: objem vzorku, deproteinace séra (činidla, objem, teplota, čas), kondicionace SPE kolonek (promývání vodou, dávkování), různé SPE kolony, postup eluce (činidla, dávkování, použití vakua), vliv centrifugace na čistotu extraktu, využití Eppendorf a skleněných zkumavek, podmínky odpaření vzorku.

Na základě výsledků při optimalizaci SPE metody extrakce byla vyvinuta nová metoda s využitím LLE extrakce, která byla rovněž optimalizována s ohledem na deproteinační a extrakční prostředí, provedení extrakce a způsob odpaření vzorku.

Při porovnání obou extrakčních metod bylo zjištěno, že metoda s využitím LLE, poskytla vyšší výtěžnost extrakce pro cílové analyty D₂ (ergokalciferol), D₃ (cholecalciferol), 25-(OH)D₃ (kalcidiol), zároveň zkrátila čas potřebný pro přípravu vzorku k HPLC analýze a také snížila spotřebu rozpouštědel.

Abstract

In this thesis were compared extraction methods, solid phase extraction (SPE) and liquid liquid extraction (LLE) used for separation of human serum fat soluble vitamins: A (retinol), E (α -tocopherol), D₂ (ergocalciferol), D₃ (cholecalciferol), 25-(OH)D₃ (calcidiol). Vitamins were then determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

As a baseline method used the procedure that was developed and partially validated the thesis: Application of the SPE technology and monolithic columns in HPLC analysis of biologically active substances (Horčíčková 2009). This procedure was further optimized in order to increase the extraction of target analytes 25(OH)D₃, D₂ and D₃ and shortening the preanalytical phase. Conditions were tested: sample volume, deproteination of serum (reagents, volume, temperature, time), the conditioning of SPE columns (water washing, the dosage), various SPE columns, elution process (agent, the dosage, use of vacuum), the effect of centrifugation on the purity of the extract, using the Eppendorf and glass tubes, sample evaporation conditions.

Based on the results of the optimization of the SPE extraction methods have been developed a new method using LLE extraction, which has also been optimized with regard to the environment deproteination and extraction, construction and extraction method of sample evaporation.

When comparing the two extraction methods were found using the LLE method, gave higher yield of extraction of target analytes D₂ (ergocalciferol), D₃ (cholecalciferol), 25-(OH)D₃ (calcidiol), also reduced the time required for sample preparation for HPLC analysis and reduced solvent consumption.

2. Úvod a cíl práce

V této diplomové práci byly porovnány metody SPE (Solid Phase Extraction) a LLE (Liquid Liquid Extraction) a jejich vhodnost pro úpravu lidského séra za účelem stanovení vitamínů rozpustných v tucích A (retinol), E (α -tokoferol), D₂ (ergokalciferol), D₃ (cholecalciferol), 25-(OH)D₃ (kalcidiol) pomocí HPLC.

Jako výchozí metoda byla použita metoda SPE vyvinutá a částečně zvalidovaná v rámci diplomové práce: Aplikace SPE a technologie monolitních kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek (Horčíčková 2009).

Naším cílem bylo nejen porovnat obě separační metody a jejich vhodnost pro stanovení, ale i vyvinout nový extrakční postup z důvodu nízké výtěžnosti výše zmíněné extrakce pro cílové analyty (25(OH)D₃, D₂ a D₃). Dalším důvodem vývoje jiného postupu pro přípravu vzorku před HPLC analýzou byl celkový čas vyvinuté metody SPE (1,5 hod), který byl nevhodný pro rutinní zpracovávání velkých sérií vzorků ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

3. Seznam použitých zkratek

Å	fyzikální jednotka Ångström
AA	kyselina askorbová
AAS	atomová absorpční spektrometrie
ACN	acetonitril
AES	atomová emisní spektrometrie
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
c(A)org.	celková látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle
c(A)vod.	celková látková koncentrace složky ve vodě
CPBA	analýza kompetitivní vazby na proteiny
CT	kalcitonin
D	rozdělovací poměr
DAD	detektor diodového pole
DBP	vitamín D vázající protein
DC	deproteinační činidlo
DDD	doporučená denní dávka
ESM	metoda vnějšího standardu
EtOH	ethanol
FD	fluorescenční detektor
FTIR	infračervený spektrometr s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GLE	extrakce plynem z kapaliny
HCl	kyselina chlorovodíková
hex	hexan
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IR	infračervený
IS	interní standard
ISM	metoda vnitřního standardu
KOH	hydroxid draselný
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LDL	lipoprotein s nízkou densitou

LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PC	počítač
pH	kyselost, vodíkový exponent
prop	2-propanol
PTH	parathormon
Q	rychlost otáčení
r	poloměr otáčení
RIA	radioimunoanalýza
RCF	relativní centrifugační síla
SAM	metoda standardního přídatku
SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce pevnou fází
TCA	kyselina trichloroctová
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
VDRR	vitamin D resistantní křivice

4. Teoretická část

4.1. Vitaminy substance nezbytné pro život

Vitaminy jsou definovány jako chemicky nejednotná skupina nízkomolekulárních organických látek, které jsou nezbytné pro normální metabolismus živočichů. Jedná se o životně důležité substance, které organismus neumí syntetizovat buď vůbec, nebo jen v malém množství [1].

Uplatnění a mechanismus účinku vitaminů v organismu je různý. Nejvíce z nich se účastní na katalytických reakcích, kde jsou součástí molekul enzymů jako jejich kofaktory, nebo působí jako antioxidanty. Zdrojem příjmu vitaminů je především pestrá strava. Nedostatečné množství určitého vitaminu v organismu označujeme jako hypovitaminózu a úplné chybění jako avitaminózu. Tyto stavy mohou vzniknout například při dodržování nesprávné diety, u podvýživy nebo při nejrůznějších poruchách trávení. Nedostatek jednotlivých vitaminů se projevuje typickými příznaky viz. níže [1, 2, 3].

4.1.1. Vitaminy a jejich dělení

Vitaminy se dělí podle jejich rozpustnosti na dvě hlavní skupiny:

- vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K)
- vitaminy rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B a vitamín C)

4.2. Vitaminy rozpustné v tucích

Jedná se o molekuly mající lipofilní charakter a jak již bylo výše zmíněno patří do této skupiny vitaminy A, D, E a K. Lipofilita látek je schopnost procházet mezifázovým rozhraním, při čemž se v různém rozsahu uplatňují síly hydrofilních a hydrofobních interakcí. Lipofilitu látky lze kvantifikovat pomocí rozdělovacího koeficientu $P(\log P)$, který udává poměr rovnovážných koncentrací látky rozpuštěné mezi dvě vzájemně nemísitelná rozpouštědla dle rovnice [4].

$$P(\log P) = C(o)/C(w)$$

$P(\log P)$ rozdělovací koeficient

$C(o)$ rovnovážná koncentrace látky v organickém rozpouštědle

$C(w)$ rovnovážná koncentrace látky ve vodě

Čím vyšší je hodnota P, tím je látka lipofilnější a snadněji přechází přes buněčné membrány, jež mají také lipofilní charakter. Tyto látky se následně mohou při nadměrném příjmu v buňkách kumulovat, nejvíce v buňkách tukových a jaterních, a působit na organismus toxicky. Například pro léčiva platí, že aby bylo léčivo pro organismus bezpečné neměl by být rozdělovací koeficient log P vyšší než 5 (Lipinski's rule of five). Experimentální hodnoty některých zkoumaných vitaminů jsou uvedeny v tabulce (viz. Tab 1) [5].

V případě vitaminu A a D byla popsána hypervitaminóza nebo-li intoxikace. K hypervitaminóze a intoxikaci může dojít zejména při suplementaci vitaminy, kde hrozí předávkování s několikanásobným překročením doporučených denních dávek [1,2].

Tab 1: Některé parametry vitaminů rozpustných v tucích [1,6]

vitamin	DDD (mg)	koncentrace v séru (μmol/L)	experimentálně zjištěný log P
A	1-3	1,05-2,27	4,1
D	0,025	-	-
E	25-30	19-35	10
25(OH)D₃ *	-	0,037-0,200	6
25(OH)D₃ **	-	0,035-0,105	6

* koncentrace 25(OH)D₃ v plasmě během léta

** koncentrace 25(OH)D₃ v plasmě během zimy

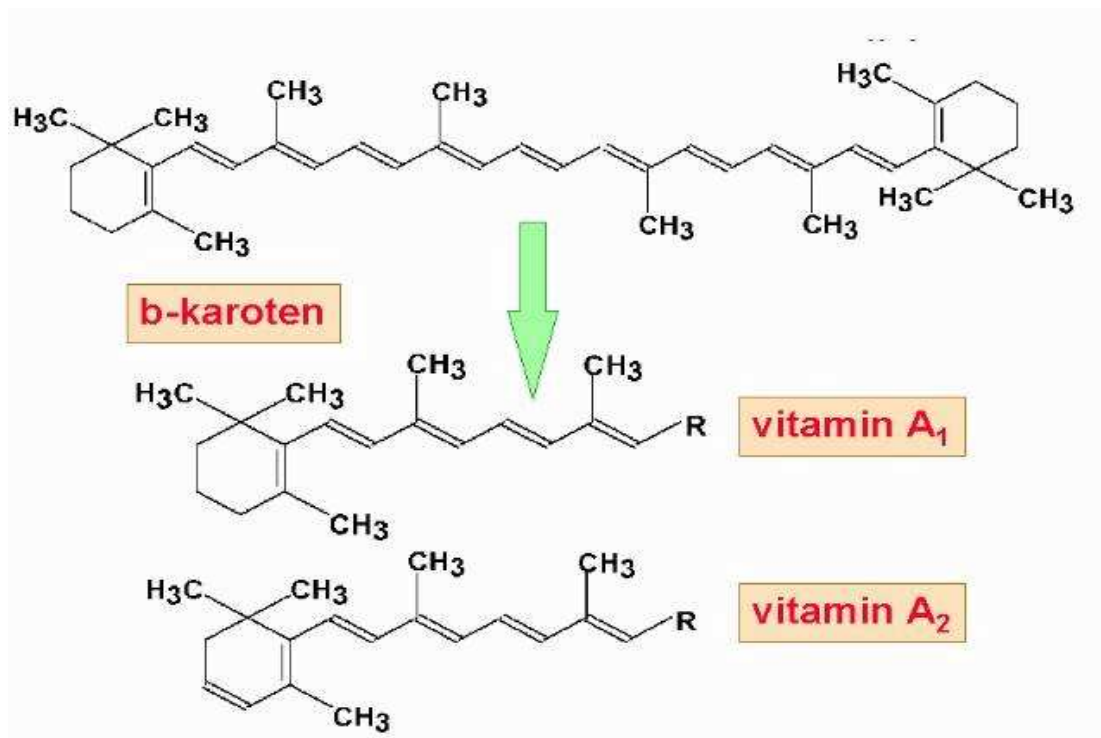
4.2.1. Vitamin A

Vitamin A, také zvaný retinol nebo axeroftol, je terpenovou látkou viz. (Obr 1). Vitamin A se do těla živočichů může dostávat také ve formě provitaminu (β-karoten). Zdrojem příjmu vitaminu A je např: rybí tuk, máslo, játra, vejce [2].

β-karoten je obsažený zejména v mrkvi a dalších druzích zeleniny, jedná se o nenasycený terpenický uhlovodík o 40 uhlících se dvěma β-iononovými kruhy. Hydrolýzou ve střevě poskytuje dvě molekuly retinolu, který se v přítomnosti žluči

vstřebává a ukládá v játrech. Ze střeva se vstřebává i samotný β -karoten. β -karoten na rozdíl od vitamínu A, není v nadbytečném množství příčinou hypervitaminózy a působí jako antioxidant, doporučená denní dávka jsou 2-3 mg [1,2].

Obr 1: Vzorec vitamínu A a jeho provitamínu β -karotenu [7]



4.2.1.1. Význam vitamínu A a β -karotenu pro organismus

Úkolem vitamínu A je zachování funkce a růstu hlavně epitelových buněk. Dále je důležitý pro proces vidění, kde je ve své aktivní formě (11-cis-retinalu) součástí očního purpuru. Vitamin A má mírné antioxidační účinky. Antioxidační účinek je mnohem výraznější u provitamínu (β -karotenu), který účinně likviduje volné radikály [3].

Nedostatek vitamínu A (hypovitaminóza až avitaminóza) se projevuje rohovatěním kůže, atrofií sliznic, vysycháním spojivkového vaku a šeroslepostí. Naopak hypervitaminóza způsobuje poškození jater, vypadávání vlasů, krvácení z nosu, atrofizaci sliznic, může docházet až k poruchám růstu a frakturám kostí a má teratogenní efekt [2].

Ideální koncentrace retinolu v séru by se měla u dospělých pohybovat v rozmezí: 1,05-2,27 $\mu\text{mol/L}$ [6].

4.2.1.2. Komerčně dostupné metody stanovení

Metodu na stanovení vitamínu A a E společně nabízí např: firma Chromsystems (Mnichov, Německo).

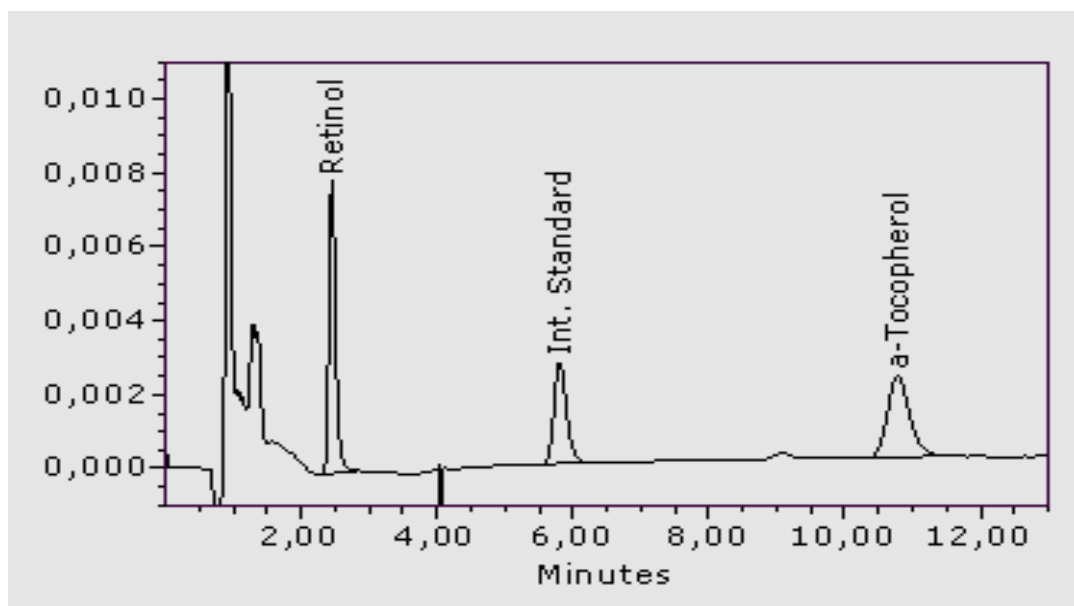
- **Vitaminy A a E v séru/plasmě**

Jedná se o HPLC metodu stanovení s UV detekcí. Před vlastní analýzou je nutná předpříprava vzorku zahrnující: aplikaci interního standardu k vzorku, vícenásobný precipitační krok s různými činidly, centrifugaci a dávkování supernatantu do HPLC systému. Příklad chromatogramu (viz. Obr 2).

Parametry HPLC metody:

Linearita	vitamin A	až do 2,25 mg/L (7,85 $\mu\text{mol/L}$)
	vitamin E	až do 45 mg/L (104,47 $\mu\text{mol/L}$)
Mez stanovitelnosti	vitamin A	0,02 mg/L (0,07 $\mu\text{mol/L}$)
	vitamin E	0,50 mg/L (1,16 $\mu\text{mol/L}$)
Přesnost		< 3 % (CV)
Recovery	vitamin A	104 %
	vitamin E	98 %
Vlnová délka		325 nm po 3,5min přepnutí na 295 nm
Čas analýzy		12 min
Isokratický systém HPLC s UV detektorem [8]		

Obr 2: Chromatogram stanovení vitamínu A a E [9]



Firma nabízí také HPLC metodu na stanovení β -karotenu

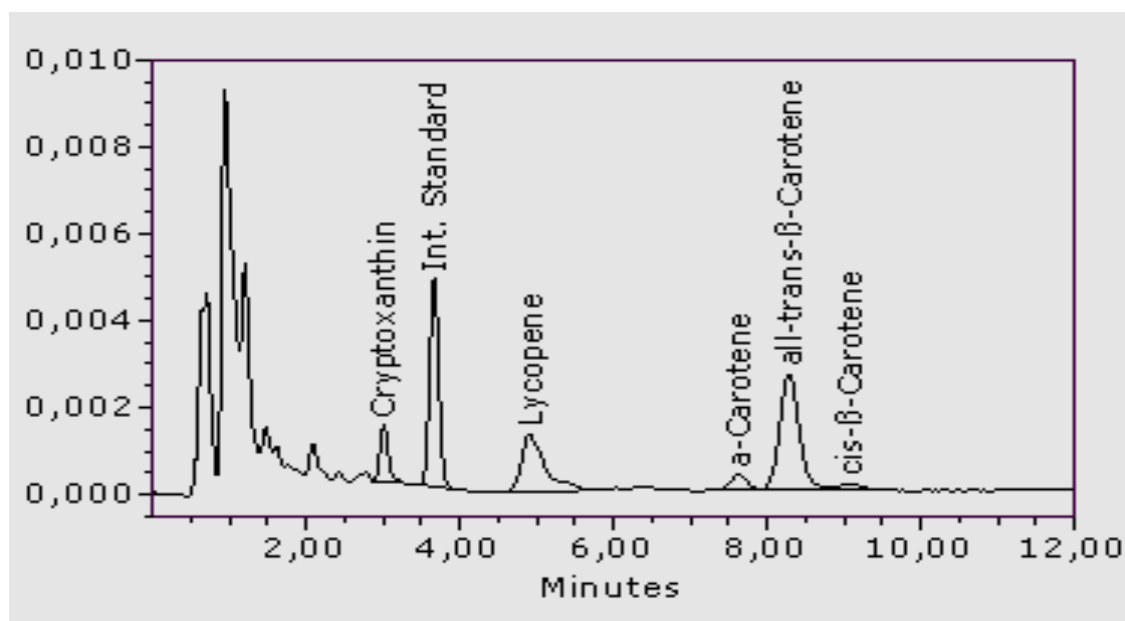
- **β -karoten v séru/plasmě**

Metoda zahrnuje předpřípravu vzorku opět aplikací interního standardu k séru/plasmě, precipitaci a extrakci s následnou centrifugací a dávkováním supernatantu do HPLC s následnou UV/VIS detekcí. Optimalizovaný systém reversní chromatografické fáze umožní oddělení α -, β -cis- a all- trans- β -karotenů, a dalších karotenoidů. Typický chromatogram viz. (Obr 3).

Parametry metody:

Linearita	až do 3000 ng/ml (5,59 μ mol/L)
Mez stanovitelnosti	10 ng/ml (0,019 μ mol/L)
Recovery	≥ 90 %
Přesnost	< 5 %
Čas analýzy	10 min [10]

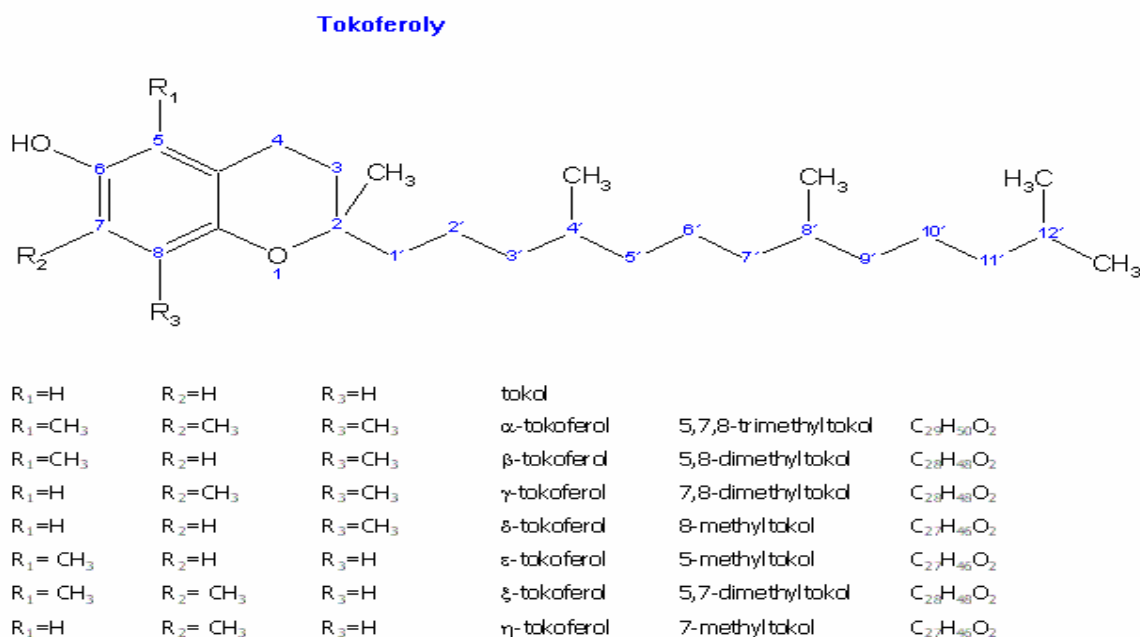
Obr 3: Chromatogram stanovení β -karotenu [11]



4.2.2. Vitamin E

Vitamin E patří do skupiny několika izomerů (viz: Obr 4). Z nichž α -tokoferol je nejúčinnější formou. Tokoferoly se získávají především z rostlinné potravy například z pšeničných klíčků, semen slunečnic, zeleniny a olivového oleje [2].

Obr 4: Tokoferoly [12]



4.2.2.1. Osud vitamínu E v organismu a jeho účinky

Tokoferol se vstřebává za přítomnosti tuku ve střevě, následně je transportován chylomikrony a zachycován v tukové tkáni. α-tokoferol likviduje volné radikály a má významné antioxidační účinky. Uplatňuje se v buněčných membránách, chrání LDL částice před oxidací a brzdí tak proces aterosklerózy. Působí protektivně také na autooxidaci vitamínu A a karotenu [2,3].

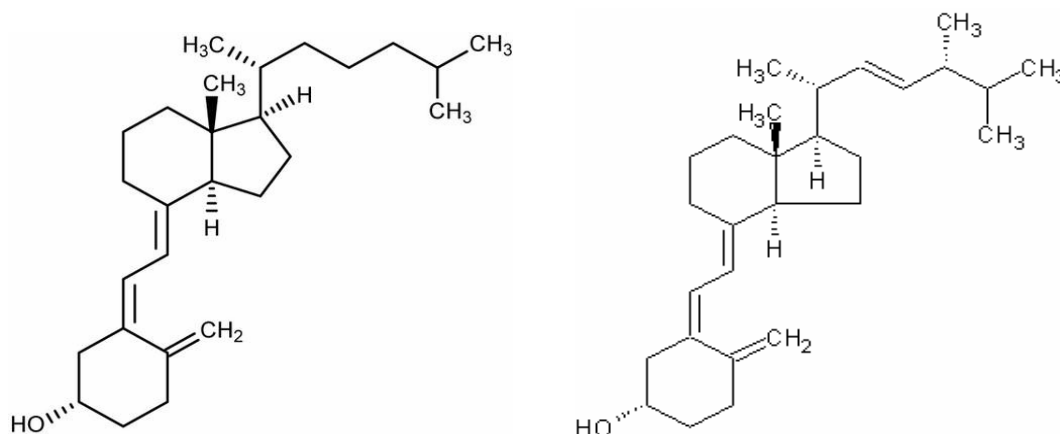
Nedostatek vitamínu E je doprovázen hemolytickou anemií a kreatinurií z poškození buněčných membrán; poruchami růstu, nervového systému a sterilitou. Koncentrace vitamínu E v séru by se měla ideálně u dospělých pohybovat v rozmezí 19–35 μmol/L [1,3,6].

4.2.3. Vitamin D

Pojem vitamin D (kalciferol) reprezentuje dvě chemické formy (viz. Obr 5). Uměle syntetizovaný nebo z rostlinné stravy získaný ergokalciferol (vitamin D₂) a cholekalciferol (vitamin D₃), který je možné získat ze stravy živočišné nebo vzniká v těle. Obě formy získané z potravy se vstřebávají v tenkém střevě při absorpci lipidů [3].

Důležitějším zdrojem vitamínu D₃ je jeho produkce v kůži. Působením UV záření o vlnové délce 290-313 nm je přítomný 7-dehydrocholesterol konvertován neenzymatickou fotolytickou reakcí na 7-dehydrocholekaciferol, ten se následně hromadí v kůži a jeho potřebná část je využívána pro tvorbu aktivní formy vitamínu D [13].

Obr 5: Vzorec cholekalciferolu D₃ a ergokalciferolu D₂ [14,15]



4.2.3.1. Metabolismus vitamínu D v organismu

Kalciferol jakéhokoliv původu je transportován krví do jater ve vazbě na specifický transportní protein (vit. D vázající protein-DBP). V jaterních buňkách dochází k první hydroxylaci v poloze 25 za vzniku kalcidiolů.

Hydroxylaci v poloze 25 provede enzym 25-hydroxyláza nacházející se v endoplazmatickém retikulu jaterní buňky za přítomnosti Mg²⁺, NADPH, O₂, necharakterizovaného cytoplasmatického faktoru a enzymů NADPH dependentní cytochrom P450 reduktasy a cytochromu C450 [16].

Ze 7-dehydrocholekalciferolu tak v játrech vzniká 25-hydroxycholekalciferol (25(OH)D₃), podobným způsobem je hydroxylován i ergokalciferol za vzniku 25-hydroxyergokalciferolu (25(OH)D₂). Játra mají velkou kapacitu pro tvorbu kalcidiolů, a ty jsou proto dobrým ukazatelem množství vitamínu D v organismu. Kalcidioly jsou v této fázi jen málo účinné, jejich poločas cirkulace v krvi je 2 až 3 týdny. Ideální koncentrace vitamínu 25(OH)D₃ v plazmě u dospělých se liší podle ročního období. Kdy v letním období by ideální koncentrace měla být v rozmezí 0,037-0,200 μmol/L a v zimním 0,035-0,105 μmol/L [6,13,17].

V případě potřeby se kalcidioly ($25(\text{OH})\text{D}_3$ i $25(\text{OH})\text{D}_2$) ve vazbě na DBP transportují do ledvin, kde jsou dále hydroxylovány specifickým enzymem 1α -hydroxylasou a to v mitochondriích proximálních tubulů za účasti Mg^{2+} , NADPH, O_2 a systému třech enzymů: flavoproteinu, ferredoxinu a cytochromu P450 [16].

Tímto vznikají vysoce aktivní formy kalcitrioly a to buď $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) nebo $1\alpha,25$ -dihydroxyergocalciferol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_2$). Koncentrace kalcitriolů v séru je v rozmezí 58-156 pmol/L [2,18].

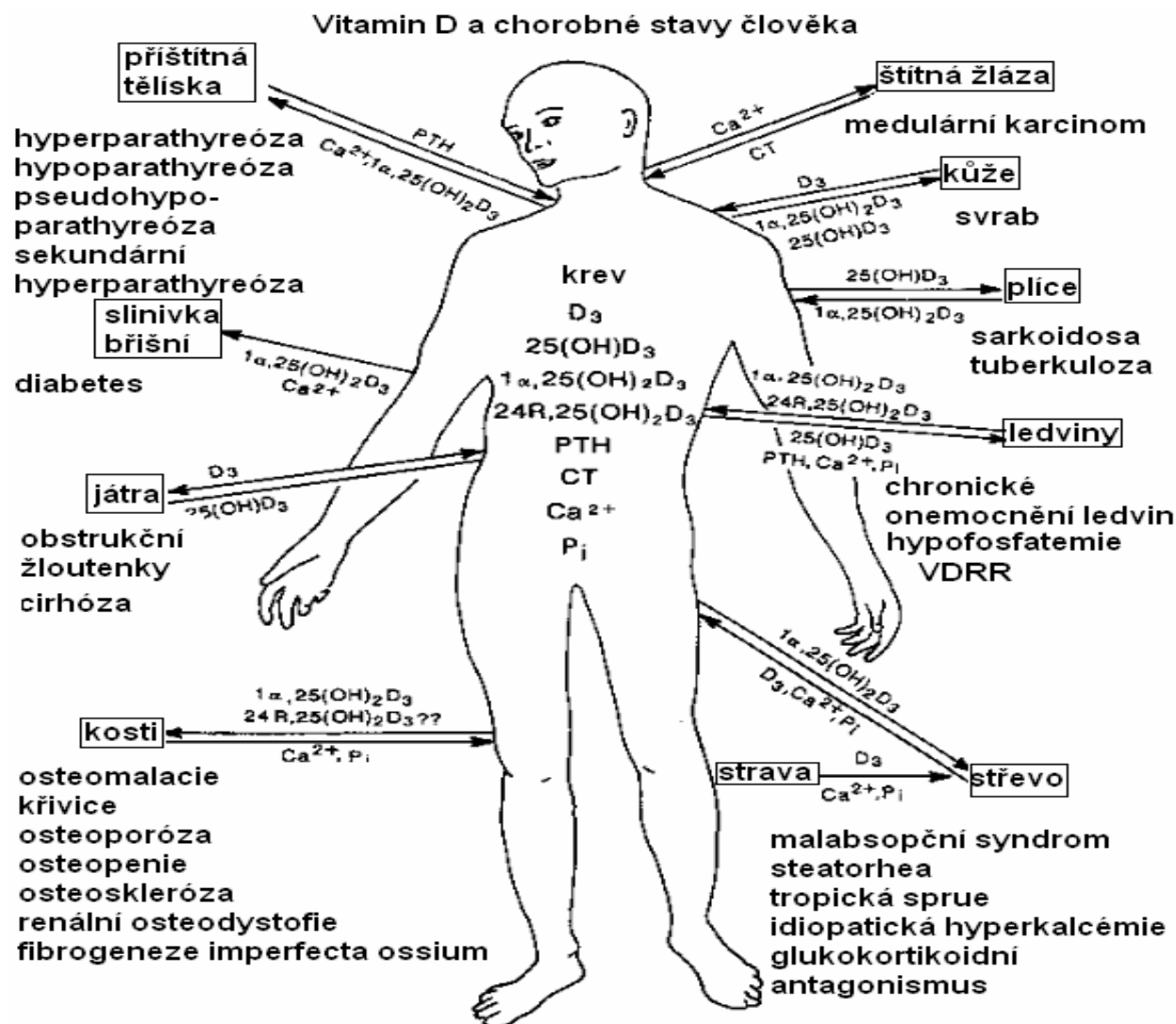
4.2.3.2. Účinky aktivních forem vitamínu D

Kalcitriol někdy také označován D-hormon má řadu účinků. Reguluje hladinu kalcia tím, že se váže na specifický receptor střevních epitelů, což indukuje tvorbu proteinu vázajícího kalcium ve střevě. Tento protein transportuje kalcium ze střeva do intersticia a dochází tak k navýšení jeho absorpce a nárůstu kalcémie. Kalcitriol se dále účastní na uvolňování kalcia a fosfátů z kostí aktivací osteoklastů což opět vede k navýšení kalcémie a také fosfatémie. Vysoce aktivní forma kalcitriol má vliv i na jiné orgány jako jsou např: ledviny, příštítná tělíska, pankreas atd. (viz Tab 2 a Obr 6.) [2,3,13,17,19].

Tab 2: Vliv D hormonu na některé orgány [20]

D hormon a cílové orgán	
Orgán	účinek D hormonu
střevo	absorpce kalcia a fosforu
ledviny	reabsorpce kalcia
kosti	resorpce kostí a novotvorba
příštítná tělíska	pokles tvorby PTH
pankreas	zvýšená sekrece inzulínu
imunitní systém	imunoregulace/imunomodulace
kardiovaskulární systém	inhibice sekrece reninu/stimulace myocytů
ostatní	antiproliferativní, prodiferenciační účinek

Obr 6: Vitamin D a chorobné stavy člověka [21]



4.2.3.3. Regulace sérových hladin

Je důležité, že kapacita ledvin pro tvorbu účinných forem calcitriolů je omezená a řízená. Například sérovými hladinami kalcia, kdy dochází k hydroxylaci v poloze 1 při hypokalcemii a při normálním nebo zvýšeném množství se rozbíhá alternativní metabolická cesta. V tomto případě se hydroxyluje 24. uhlík za vzniku 24,25,-dihydroxyderivátů vitamínu D. Syntéza calcitriolů se řídí i množstvím fosforu, přítomností řady hormonů např: PTH. Dále je také funkce aktivní formy regulována poločasem cirkulace v krvi, který je oproti neaktivní formě pouze 4 až 6 hodin. I přesto může výjimečně k hypervitaminóze D až intoxikaci dojít při nadměrné konzumaci uměle vytvořených doplňků stravy. Akutní hypervitaminóza D se projevuje trvalou žizní, svěděním kůže, průjmy a zvracením a vysokou hladinou vápníku v krvi [2,3,13,17].

Naopak nedostatek, tedy hypovitaminóza vitamínu D, může nastat u rostoucích dětí, novorozenců, kojenců, kojících matek a těhotných, u seniorů, postmenopauzálních žen, ale i u dospělých např: veganů a vegetariánů, u lidí s malabsorpcí, s defektem tvorby D-hormonu a jeho receptoru atd. Hypovitaminóza D je příčinou měknutí kostí (křivice, osteomalacie) a může se podílet na vzniku osteoporózy. Tyto poruchy vznikají z důvodů hypokalcemie v krvi, kompenzované zvýšeným odbouráváním kostí. Vliv vitamínu D je však sledován u mnoha dalších orgánů a nízká hladina je spojována s jejich nedostatečnou funkcí. Účinek D hormonu na některé orgány viz. Tab 2. Klasifikace stavů podle hladiny 25(OH) vit.D (viz. Tab 3) [2,22].

Tab 3: Klasifikace stavů vitamínu D v závislosti na hladině 25(OH) vitamínu D v plazmě [22]

Stav vitamínu D	Hladina 25(OH) vit D (nmol/L)
Těžký nedostatek	< 12,5
Nedostatek	< 37,5
Nedostatečnost	37,5-50,0
Dostatečnost	50-250
Nadbytek	>250
Intoxikace	>375

4.2.3.4. Komerčně dostupné metody stanovení vitamínu D ze séra

4.2.3.4.1. Metody kompetitivní vazby na proteiny CPBA („competitive protein-binding analysis“)

Historicky první metoda stanovení 25(OH)D byla založená na kompetitivním principu. Jako vazebný reagent používala specifické sérové proteiny a to pro 25(OH)D specifický vitamin D vázající protein (DBP). Výhodné bylo, že tento protein je schopný vázat stejně dobře obě formy 25(OH)D. Nevýhodné naopak, že ze séra vyvazuje i jiné metabolity vitamínu D a dochází tak k nadhodnocení hladiny 25(OH)D přibližně o 10-20 % [17,23].

4.2.3.4.2. Radioimunoanalýza (RIA)

RIA patří mezi radioizotopové imunochemické metody. Jedná se o modifikaci využívající na pevný sorbent navázanou specifickou protilátku proti stanovovanému antigenu. Antigenem jsou v tomto případě $25(\text{OH})\text{D}_2$, $25(\text{OH})\text{D}_3$, které soutěží o vazebné místo na protilátce se známým množstvím antigenu značeným vhodným radioaktivním izotopem. Po inkubaci se odmyje vzorek i značený antigen a zůstanou pouze imunokomplexy vzniklé vazbou antigenu z roztoku se specifickou protilátkou vázanou na pevném nosiči. Čím větší množství stanovovaného antigenu je přítomno, tím méně vznikne imunokomplexů značených. Radioaktivita po reakci je tedy nepřímo úměrná množství stanovovaného antigenu [24].

Hlavní nevýhodou RIA metody je použití radioaktivních izotopů, díky čemuž se od této metody upouští. Další nevýhodou je, že protilátka může vázat nejen $25(\text{OH})\text{D}$, ale stejně jako již zmíněná metoda CPBA, váže i další metabolity vitamínu D. Tyto metabolity lze odstranit např. pomocí TLC nebo použitím SPE kolonek. Lze pak dosáhnout 100 % specifity pro $25(\text{OH})\text{D}_3$ a 75% pro $25(\text{OH})\text{D}_2$ [17].

4.2.3.4.3. Chromatografické techniky

Chromatografické techniky jsou oproti předchozím metodám stanovení založeny na principu separace analytu mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Chromatografické techniky mají mnoho modifikací.

Pro separaci vitaminů rozpustných v tucích je nejvhodnější použití kapalinové chromatografie. K stanovení obsahu $25(\text{OH})\text{D}_2$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ byla jako první využita HPLC metoda za využití detektoru s diodovým polem. Podrobnější popis viz kapitola HPLC.

Další modifikací HPLC pro stanovení $25(\text{OH})\text{D}_2$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ je vývojově mladší UHPLC. Proces separace probíhá za vysokých tlaků asi 100 MPa na sorbetech vynikajících mechanickou pevností a lepší separační účinností. UHPLC umožňuje kratší dobu analýzy díky vyšší průchodnosti analytů sorbentem, menší spotřebu rozpouštědel a zvýšení separační účinnosti [25].

4.2.3.4.4. Současné trendy stanovení 25(OH)D₂, 25(OH)D₃

Nejvyšší citlivosti a přesnosti stanovení 25(OH)D₂, 25(OH)D₃ se dnes dosahuje kombinací chromatografických technik s hmotovou spektrometrií. Hmotová spektrometrie je metoda pro separaci látek podle rozdílů hmoty (**m**) a náboje (**z**) s využitím elektrického a magnetického pole. Z podílu hmoty a náboje (**m/z**), při znalosti náboje, lze určit molekulovou hmotnost a totožnost látky. Má mnoho modifikací podle svého účelu, jedná se o velmi citlivou a přesnou metodu [17,26].

Tuto kombinaci nabízí například firma Chromsystems:

- **MassChrom® 25-OH-Vitamin D₃/D₂ v séru/plasmě (LC-MS/MS)**

Příprava vzorku: Napipetovat vzorek (100 µl sérum/plasma) do reakční vialky. Přidat precipitační reagensii (25 µl), vnitřní standard (200 µl), promíchat (vortex cca. 20 s). Inkubace (10 min,+4 °C), centrifugace (5 min, 15 000 x g), napipetovat (200 µl supernatantu) do vialky autosampleru. Celkový čas přípravy vzorku cca 25 min, spotřeba reagensií 225 µl.

Parametry metody LC/MS/MS:

Mez stanovitelnosti 25(OH)D ₃	3,6 µg/L (8,99 µmol/L)
25(OH)D ₂	2,4 µg/L (5,82 µmol/L)
Přesnost	< 5 % (CV)
Recovery:	25(OH)D ₃ 91 %
	25(OH)D ₂ 95-98 %
Linearita	až do 250 µg/L
Čas analýzy	5 minut
Ionizace	APCI
Hmoty přechodu analytů D ₃	383->211
D ₂	395->269
vnitřní standard	389->211 [27]

Pro porovnání s výše zmíněnou metodou firma nabízí i HPLC metodu stanovení s UV detekcí:

- **25-OH-Vitaminu D₃/D₂ v séru/plasmě s HPLC**

Metoda má složitější a delší přípravu vzorku před analýzou.

Příprava vzorku: Smíchat (100 µl sérum/plasma) s vnitřním standardem (50 µl) ve zkumavce chráněné proti světlu, přidat precipitační reagensii (500 µl), promíchat (vortex cca. 20 s). Inkubace (10 min,+4 °C), centrifugace (5 min,

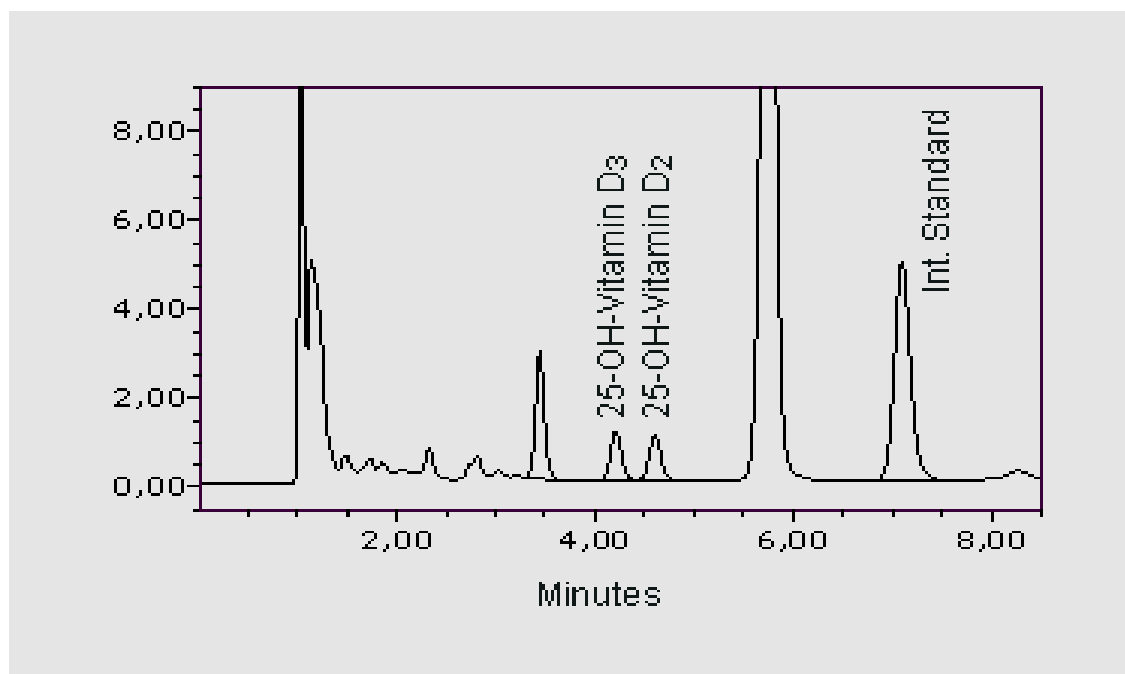
13 000 x g), SPE (nanést supernatant), sušení kolonky odstředěním, promytí pufovacím roztokem (2x1 ml), vysušení kolonky odstředěním, promytí 2 pufovacím roztokem (75 µl), vysušení odstředěním. Eluce analytů elučním puforem (200 µl) zředěným destilovanou vodou (20µl). Nastříknutí eluátu (25 µl) do HPLC. Celkový čas přípravy vzorku je cca. 40 min. Spotřeba reagentů 2 795 µl. Metoda má také delší čas analýzy a nižší recovery. Chromatogram viz. Obr 7.

Parametry HPLC s UV detekcí.

Mez stanovitelnosti	25(OH)D ₃	1,4 µg/L (3,49 µmol/L)
	25(OH)D ₂	1,1 µg/L (2,66 µmol/L)
Přesnost		0,8-3,0 % (CV)
Recovery:	25(OH)D ₃	86 %,
	25(OH)D ₂	87 %
Linearita		až do 250 µg/L
Vlnová délka		265 nm
Čas analýzy		12 min

Isokratický systém HPLC s UV detektorem [28]

Obr 7: Chromatogram stanovení 25-OH-Vitaminu D3/D2 [29]



- **ARCHITECT 25-OH firmy Abbot**

Novinkou v diagnostice hladiny vitamínu D je také metoda od firmy Abbot (Praha, Česká republika). Jedná se o zpožděnou jedнокrokovou kompetitivní chemiluminiscenční imunoanalytickou metodu na mikročásticích. Analyzuje oba metabolity 25-OH-Vitamínu D₃/D₂. Provádí se ze séra/plasmy. Před imunoanalýzou je nutná před úprava vzorku za účelem rozvolnění komplexu vitamínu D s vazebným proteinem (DBP). Metoda je plně automatizovaná.

Přesnost metody 2,6-4,6 % (CV)

Čas analýzy 36 minut [30]

4.3. Metody používané v diplomové práci

4.3.1. Deproteinace

Deproteinace nebo-li cílené odstranění proteinů z biologického materiálu. Využívá se při izolaci nízkomolekulárních látek, které se mohou vázat nebo jinak interferovat s proteiny, což by snižovalo výtěžnost dalších analytických postupů. Proteiny mohou také zapříčinit zničení analytických přístrojů [31].

Postupy deproteinace:

- 1) fyzikální např: ultrafiltrace, adsorpce, tepelná denaturace (vždy možnost určité frakcionace)
- 2) chemický např: použití organických rozpouštědel (aceton, ethanol, chloroformová extrakce), aniontové precipitační látky (k. trichloroctová, k. sulfosalicylová, k. chloristá, k. wolframová), kationtové precipitační látky (soli Zn²⁺, Hg²⁺, Fe³⁺, Pb²⁺), nejpoužívanější je ZnSO₄
- 3) denaturace pomocí enzymů (papain, trypsin)

Pro správně provedenou deproteinaci je nutné provést kompletní odstranění proteinů i o malé molekulové hmotnosti, sledované látky nesmí ulpívat na precipitátu a musí přecházet do roztoku, deproteinační činidlo také nesmí reagovat se sledovanými látkami a ovlivnit další postup ani interferovat při detekci a jinak ovlivňovat analytickou výtěžnost [31,32].

4.3.2. Centrifugace

Metoda centrifugace se řadí mezi separační metody, slouží k urychlení sedimentace pevných částic v kapalném prostředí. Přičemž sedimentace částic při odstředování je ovlivňována vlastnostmi částice (velikost, tvar, hustota atd.) a prostředí (hustota, viskozita, velikost odstředivé síly) [31,33].

Proces centrifugace probíhá v zařízení k tomu uzpůsobeném zvaném centrifuga. Centrifuga se skládá z několika hlavních částí jako jsou rotorový prostor, který může být chlazený nebo termostatovaný s pancéřováním, dále z prostoru elektromotoru a ovládacího panelu s elektronikou [31].

Centrifugy lze dělit např. podle relativní centrifugační síly (RCF) na centrifugy:

- nízkoobrátkové max. RCF 8 000
- vysokoobrátkové max.RCF 60 000
- ultracentrifugy max. RCF 70 0000
- speciální typy mikrocentrifug max. RCF 14 000 [34]

Přičemž relativní centrifugační síla se vypočítá podle vztahu.

$$RCF=11,18 \times r \times (Q/1000)$$

RCF...relativní centrifugační síla

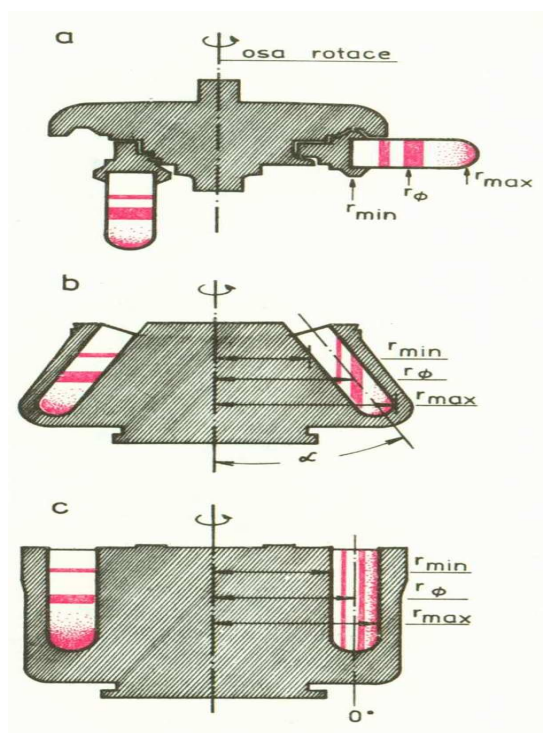
r...poloměr otáčení (cm)

Q...rychlost otáčení (r.p.m.)

Dále lze centrifugy rozdělit dle typu rotoru na centrifugy s rotorem:

- Výkyvným
- Úhlovým
- Vertikálním
- Zonálním
- Speciálním (elutriátor, reograd) [31,34]

Obr 8: Rotory: a) výkyvný b) úhlový c) vertikální [35]



Rotory se nejčastěji vyrábí hliníkové, titanové, nebo z karbonového vlákna. Materiál a typ rotoru jsou voleny dle účelu použití [34].

Typy centrifugace se rozdělují na dvě hlavní skupiny. A to na centrifugaci preparativní, umožňující získání specifických částic a centrifugaci analytickou, sloužící k měření fyzikálních vlastností sedimentujících částic, jako je sedimentační rychlost částic, nebo sedimentační rovnováha [31,34].

4.3.2.1. Preparativní centrifugace

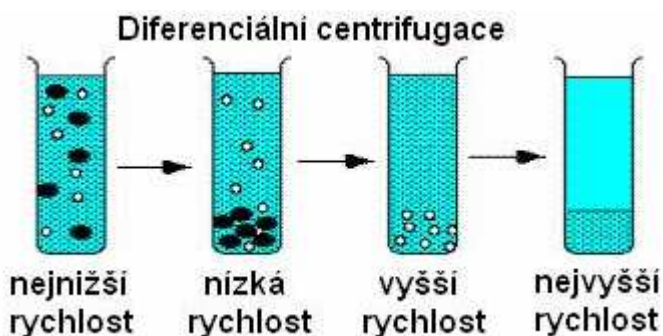
Preparativní centrifugace slouží k izolaci specifických částic. Je prováděna dvěma odlišnými způsoby, diferenciální centrifugací a centrifugací v hustotním gradientu.

4.3.2.1.1. Diferenciální centrifugace

Diferenciální centrifugace nebo-li peletting – centrifugace v prostředí s homogenní hustotou. Částice sedimentují na základě svých sedimentačních koeficientů (viz. Obr 9).

Sedimentační koeficient závisí na hmotnosti, densitě částice a její interakci s kapalinou. Po centrifugaci se získá sediment (peletka) a supernatant [31,34,36].

Obr 9: Diferenciální centrifugace [36]



4.3.2.1.2. Centrifugace v hustotním gradientu

Při centrifugaci v hustotním gradientu je vzorek nanášen do zkumavky s hustotním gradientem, po centrifugaci jsou získány jednotlivé frakce vzorku. Rozlišuje se centrifugace v hustotním gradientu izopyknická a zónální.

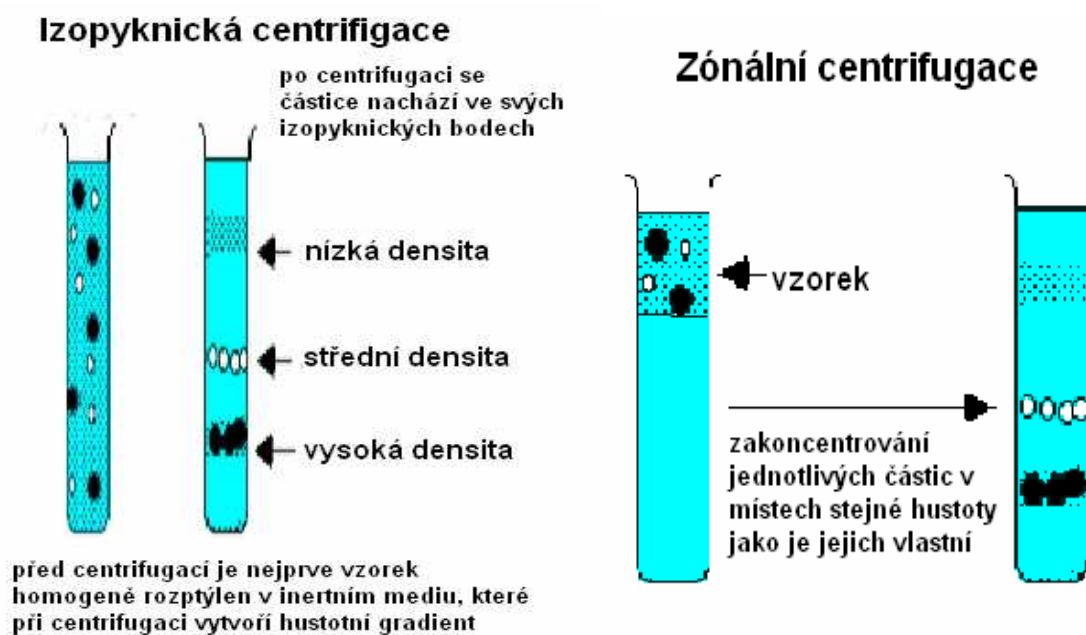
Centrifugace izopyknická se zakládá na principu rozdílu hustoty částic. Využíván je gradient v rozsahu hustot ležících v oblasti očekávaných hustot dělených částic, kde hustota u dna kyvety musí být větší než hustota kterékoliv složky směsi. Během centrifugace sedimentuje částice jen potud, než se dostane do oblasti, v níž se její hustota shoduje s hustotou média (izopyknický bod). Vzorek se homogenně mísí s roztokem inertní látky, která vytvoří gradient během centrifugace a umožní tak separaci (viz. Obr 10).

Zónální centrifugace separuje částice v prostředí kapaliny, jejíž hustota roste směrem ke dnu kyvety. Vzorek je nanášen jako tenká zóna na hotový hustotní gradient v centrifugační zkumavce (viz. Obr 10). Hustotní gradient u zónální centrifugace se dále dělí na spojitý, kde se gradient ve zkumavce mění plynule, nebo nespojitý, kde se mění skokově.

Spojitého gradientu se docílí centrifugací vhodného roztoku za vysokých otáček. Následně je nanášen vzorek do horní části zkumavky. Dělení vzorku probíhá za nižších otáček než ustalování gradientu, částice se zakoncertují v místech stejné hustoty jako je jejich vlastní.

Nespojitého gradientu se dosáhne navrstvením roztoků o rozdílných hustotách. Poslední vrstvou ve zkumavce je vzorek. Dělení probíhá tak, že částice putuje do místa, kde se nachází v rozhraní roztoku o vyšší a nižší hustotě než je její vlastní hustota [31,33,34,35,36].

Obr 10: Izopyknická centrifugace a zonální centrifugace [31]



4.3.2.2. Analytická (ultra)centrifugace

Analytická ultracentrifugace slouží k určování fyzikálních vlastností částic. Využívá se speciálních přístrojů ultracentrifug, které kombinují vlastnosti centrifugy a spektrofotometru nebo difraktometru. Částice jsou tak během ultracentrifugace sledovány optickým systémem (měření absorpance nebo zákalu) a data shromažďována a vyhodnocována pomocí PC. Při ultracentrifugaci je vždy vzorek porovnáván s referenčním roztokem. Ultracentrifuga provádí dva typy měření a to měření sedimentační rychlosti což zahrnuje hydrodynamické vlastnosti částic. Zjišťuje se např. sedimentační koeficient, frikční koeficient, difúzní koeficient, odhad tvaru molekuly, molekulové hmotnosti, informace o počtu komponent ve vzorku, nebo koncentrační závislost sedimentačního koeficientu. A druhý typ měření sedimentační rovnováhy, zahrnující vlastnosti termodynamické. Použití pro určení molekulové hmotnosti a analýzu směsi interagujících látek [31,37].

4.3.3. Extrakce

Extrakční krok bývá obvykle první a velmi významnou fází analýzy. Metoda extrakce je založena na rozdílech v rovnovážné distribuci složek směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze [32,38,39].

Fázová rovnováha se může v případě extrakce ustalovat mezi fázemi:

- kapalina – plyn (GLE)
- kapalina – kapalina (LLE)
- kapalina – pevná látka (SPE)

Extrakci lze dále dělit podle způsobu provedení na :

- 1) jednostupňovou extrakci – nastává zde ustavení jediné rovnováhy mezi fázemi. (např: roztřepání v dělicí nálevce)
- 2) mnohastupňovou extrakci - zde dochází k opakovanému ustavení rovnováhy v oddělených krocích. Jedná se tedy o opakovanou jednostupňovou extrakci (např. několikanásobné roztřepání v dělicí nálevce).
- 3) kontinuální extrakci – ustavuje se zde mnoho rovnováh při protiproudém pohybu obou nemísitelných fází, které jsou neustále ve styku (např. extrakce v Soxlethově extraktoru) [32,38].

Účinnost extrakce je závislá na celé řadě faktorů: polarita rozpouštědel, pH, vzájemný poměr fází, způsob a doba extrakce [32].

Všechny podmínky a typ extrakce jsou voleny tak, aby bylo dosaženo co největšího výtěžku analytu bez nežádoucích kontaminantů.

Použití extrakce:

- 1) čištění látky – odstranění rušivých složek matrice,
- 2) zakoncentrování vzorku z velkých objemů,
- 3) změna rozpouštědla vzorku (např: vodného za organické a naopak).

4.3.3.1. Liquid liquid extrakce (LLE) - extrakce z kapaliny do kapaliny

Žádaný analyt se převádí z vodného roztoku do organického rozpouštědla. Podmínkou LLE je ustavení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Dále je nutné zachovat extrahovanou látku v neionizované formě. Přejít do málo polárního rozpouštědla není jinak možný [38].

Pro hodnocení extrakčního dělení v systému kapalina-kapalina se využívá rozdělovací poměr D , což je poměr celkové koncentrace dané látky rozdělené mezi obě fáze (vodnou a organickou). Rozdělovací poměr D se vypočítá dle vzorce [40].

$$D = c(A)_{\text{org}} / c(A)_{\text{vod.}}$$

D ...rozdělovací poměr

$c(A)_{\text{org}}$...celková látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle

$c(A)_{\text{vod}}$... celková látková koncentrace složky ve vodě

Pro praxi mají význam zejména hodnoty $D \gg 1$, které umožňují extrahovat a zkoncentrovat látku z většího objemu vodného roztoku do malého objemu organické fáze [40].

4.3.3.2. Solid phase extrakce (SPE) – extrakce z kapaliny na pevnou fázi

Extrakce pevnou fází slouží k selektivnímu zachytu molekul z roztoku vzorku na pevný sorbent, s možností jejich opětovného uvolnění pro další analýzu. Děj je umožněn mezimolekulárními interakcemi mezi sorbetem a protékající kapalinou.

Metodu lze využít pro derivatizaci analytů (analyt je zachycován na sorbent, převeden na derivát a následně eluován). SPE lze snadno automatizovat a spojit s dalšími instrumentálními metodami [32].

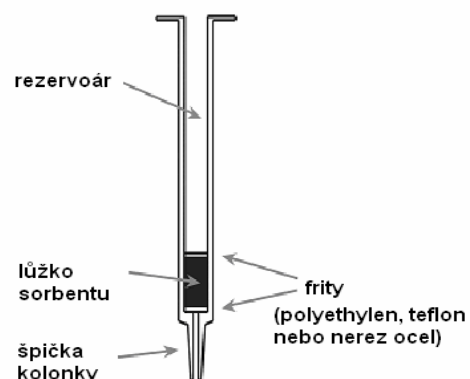
4.3.3.2.1. Instrumentace

Základem SPE je extrakční kolonka (viz. Obr.11,12), obsahující různé sorbenty, které se volí dle vhodnosti pro separaci vzorku. Volitelný je nejen sorbent ale i provedení kolonky (tvar, velikosti, materiál stěn).

Obr 11: Extrakční kolonky [41]



Obr 12: SPE kolonka popis částí [42]



Sorbenty jsou tvořeny částicemi o různé velikosti. Od 50 do 250 μm v případě kolonek založených na silikagelu s póry do 70 Å. A póry 35 až 120 Å u kolonek založených na polymerech [41].

Sorbenty kladou odpor protékající kapalině. V kolonce jsou uzavřeny fritami z polyethylenu, případně oceli, teflonu nebo polytetrafluorethylenu. Průtok kapaliny přes kolonku může být urychlován třemi metodami:

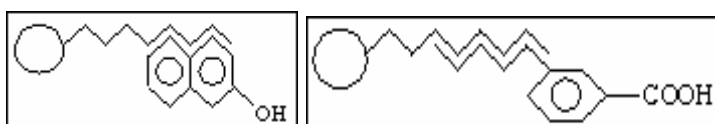
- vakuem na výstupu z kolonky
- tlakem na vstupu kolonky
- centrifugací [38]

4.3.3.2.2. Sorbenty

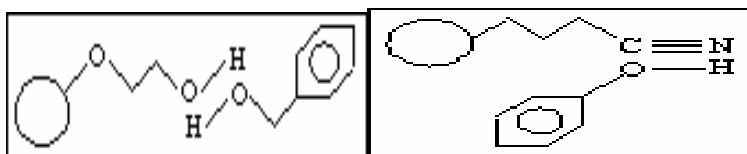
Sorbenty jsou založeny nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu, ale mohou být založeny i na bázi polymeru a dalších látek. V případě silikagelu se na silanolové skupiny chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu a interakcích mezi analytem a sorbentem [38].

Mezi běžně využívané interakce mezi analytem a sorbentem patří nepolární (viz. Obr 13), polární (viz. Obr 14) a kation-aniontové interakce (viz. Obr 15).

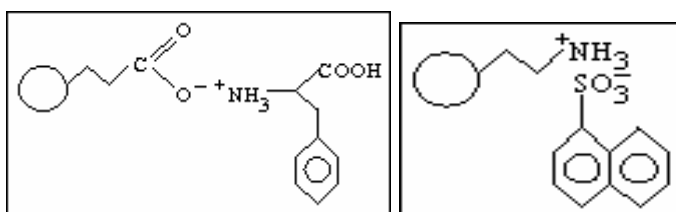
Obr 13: Van der Waalsovy síly („nepolární“ interakce) [43]



Obr 14: Vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce („polární“ interakce) [43]



Obr 15: Kation-aniontové interakce (elektrostatické přitažlivé síly mezi opačně nabitými ionty) [43]



Při volbě vhodného sorbentu se zvažuje podstata analytu, vyžadovaný stupeň jeho čistoty, vlastnosti matrice vzorku a hlavních kontaminantů vzorku a finální analytický postup [38].

Nepolární sorbenty s hydrofóbními vlastnostmi jsou využívány pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin viz . Tab 4.

Tab 4: Nepolární sorbenty [38,41]

označení	funkční skupin	-R
C18	oktadecyl	-C ₁₈ H ₃₇
C8	oktyl	-C ₈ H ₁₇
C2	ethyl	-C ₂ H ₅
CH	cyklohexyl	
PH	fenyl	
CNe	kyanopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CN
C4	butyl	-C ₄ H ₉
C1	metyl	-CH ₃

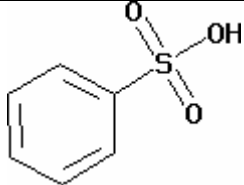
Polární sorbenty jsou selektivní pro polární sloučeniny viz. Tab 5.

Tab 5: Polární sorbenty [38,41]

označení	funkční skupina	-R
Si	silika gel	-OH
NH ₂	aminopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
DIO	3-(2,3-dihydroxy-propoxy)propyl	-(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)
CN	kyanopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CN
ALA, ALN, ALB	Alumina (kyselá, neutrální, bazická)	Al ₂ O ₃
FLO	Florisil®	MgSiO ₃

Iontově-výměnné vázané fáze slouží k extrakci na základě elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty. Používají se tzv. katexy a anexy (viz. Tab 6). Pro provedení extrakce je nutné, aby sloučeniny byly v disociované podobě, což je umožněno zvoleným pH při němž se extrakce provádí [44].

Tab 6: Iontově-výměnné sorbenty [38,41]

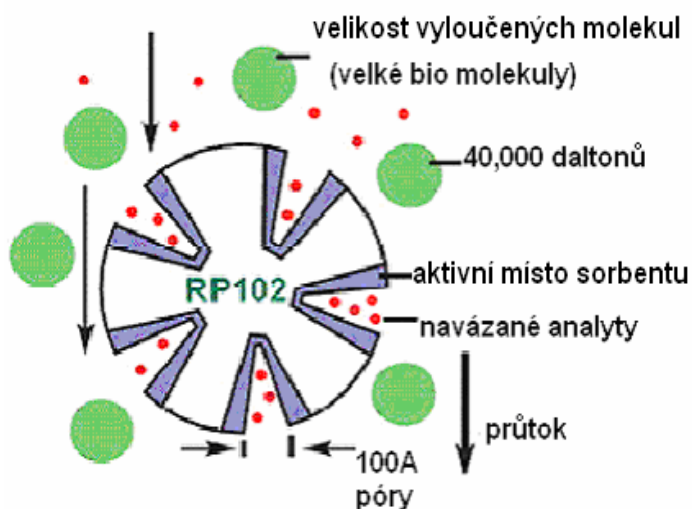
označení	funkční skupina	-R
NH ₂	aminopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
N ⁺	trimethylamoniumpropyl (kvarterní amin)	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻
CBA	karboxypropyl	-(CH ₂) ₃ COOH
SCX	benzensulfonová kyselina (4-sulfofenyl)	
PRS	propansulfonová kyselina (3-sulfopropyl)	-(CH ₂) ₃ SO ₃ H

Kromě sorbentů založených na silikagelu jsou využívány i jiné sorbenty, např. na bázi aluminy (oxid hlinitý). Při extrakci látek na alumině se může uplatnit hliníkový atom jako centrální atom vznikajícího komplexu, může vzniknout vodíková

vazba s hydroxylovou skupinou (díky vlhkosti jsou na povrchu částic aluminy hydroxylové skupiny) nebo nastává iontově-výměnná reakce. Povrch tohoto sorbentu je předem upravován kyselými, neutrálními nebo zásaditými roztoky. Jiným příkladem odlišného sorbentu je gel oxidu hořečnatého a křemičitého (Florisil®) [38].

Dalším typem speciálních sorbentů mohou být polymerní media (viz. Obr 16). Reversní fáze pryskyřic, tvořící porézní sférické „korálky“, obsahující vysokou povrchovou plochu, přičemž jsou chemicky stabilní, což vede k maximalizaci extrakční účinnosti. Primárně se využívají k extrakci nepolárních, hydrofobních složek z vodných nebo polárních roztoků [41].

Obr 16: Polymerní sorbent [41]



4.3.3.2.3. Selektivita SPE

Selektivita SPE neboli stupeň oddělení analytu od ostatních příměsí vzorku. Je dán dvěma hlavními faktory.

Výběrem vhodného sorbentu jsou umožněny jedinečné a charakteristické retenční vlastnosti dané primárními a sekundárními interakcemi, které odpovídají vlastnostem analytu.

Využití pevného sorbentu umožňuje velké množství kombinací sorbent-rozpouštědlo a umožňuje tak vysoce selektivní extrakci [38].

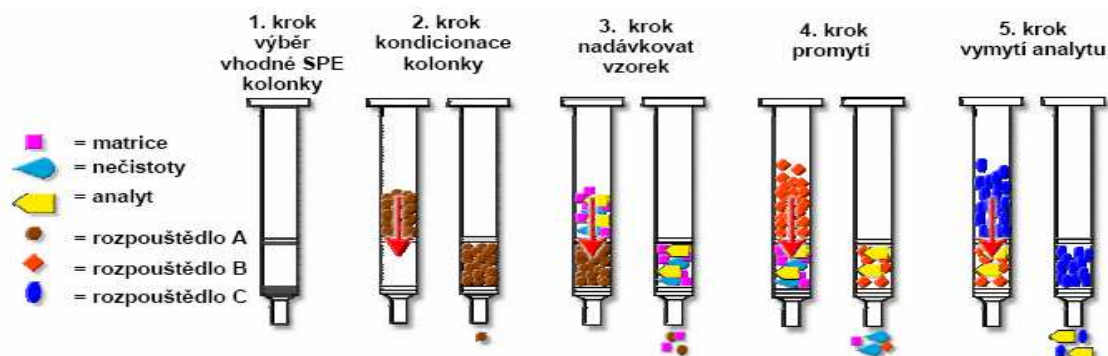
4.3.3.2.4. Postup SPE

Před samotnou SPE se musí nejprve zajistit aby byl vzorek v tekutém stavu. Cílem je získání co nejvhodnějších fyzikálních a chemických vlastností jež podpoří zadržení analytu v extrakční kolonce. Například pevné látky musí být rozpuštěny. Tuhé nečistoty je nutné nejprve odfiltrovat z roztoku vzorku. Případně analyty naadsorbované na částičky látky se musí nejprve resorbovat z jejich povrchu. Podobně je nutné rozrušit chemické vazby mezi analytem a velkými molekulami pro dosažení účinné extrakce analytu [38,41].

Až po zajištění, že kolonka nebude znehodnocena a účinnost záchytu analytu z roztoku bude co největší se dávkuje vzorek na kolonku. Obvyklé provedení extrakce pevnou fází se skládá z pěti kroků (viz. Obr 17):

- předúprava kolonky
- dávkování vzorku
- promývání kolonky
- sušení
- eluce analytu z kolonky

Obr 17: Postup SPE [45]



Předúprava kolonky zahrnuje solvataci pevné fáze kolonky, která umožní záchyt analytu. Kolonka se promyje vhodným rozpouštědlem (methanolem, acetonitrilem, nebo jiným organickým rozpouštědlem). Dochází k aktivaci nutné pro molekulové interakce. Následně je kolonka promyta rozpouštědlem co nejvíce podobným vzorku, což podporuje retenci analytu na kolonce.

Dávkování vzorku musí probíhat dostatečně dlouhou dobu, aby mohlo dojít k uskutečnění specifických reakcí mezi analytem a aktivovanou tuhou fází. Je

snaha docílit toho, aby se žádaný analyt selektivně zadržel na kolonce a nežádoucí složky procházely volně kolonkou do odpadu.

Promývání kolonky probíhá vhodným rozpouštědlem a slouží k odstranění zbytkové nežádoucí matrice, přičemž nedochází k vymývání analytu. Analyt zůstává nadále zadržen na kolonce.

Sušení kolonky se využívá v případě, že se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku. Sušení se provádí inertním plynem, nejčastěji dusíkem nebo za využití vakua či centrifugace.

Eluce analytu z kolonky je závěrečným krokem kde dochází k promývání kolonky rozpouštědlem, které umožňuje vymytí žádaného analytu z kolonky ve formě eluátu. Získaný eluát je dále upravován tak, aby měl vhodné vlastnosti pro zvolenou analýzu [32,38].

4.3.4. Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysoce účinná kapalinová chromatografie se řadí mezi chromatografické separační metody. Chromatografické separační metody se zakládají na principu vnášení vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, kde jedna z fází je nazývána stacionární, tedy nepohyblivou, a druhá fáze mobilní, tedy pohyblivá [32,38,40].

V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina a stacionární fáze je zakotvena na pevném povrchu. Vzorek je unášen přes stacionární fázi pomocí fáze mobilní. Při tomto procesu dochází k interakcím složek vzorku s mobilní i stacionární fází a podle svých vlastností jsou součásti vzorku rozseparovány. Podle uspořádání stacionární fáze se rozlišuje kapalinová chromatografie na papírovou, tenkovrstvou a kolonovou [32,38,40].

Vysoce účinná kapalinová chromatografie využívá kolonového uspořádání. Stacionární fáze je umístěna v koloně, která je naplněna vhodným sorbentem sloužícím k záchytu složek vzorku. Účinné separace je zde dosaženo malou velikostí „zrníček“ sorbentu. Malé částičky poskytují větší plochu pro separaci a zvyšují tak účinnost procesu. Částičky také kladou větší odpor protékající kapalině, a proto je nutné v systému použít vysokého tlaku (do 40 MPa), aby byl umožněn průtok mobilní fáze. Sorbent i mobilní fázi se volí podle fyzikálně chemických vlastností analytu a rozlišuje se tak chromatografie na několik typů podle povahy děje, který se účastní na separaci [38].

4.3.4.1. Principy chromatografické separace

- 1) adsorpční chromatografie – využívá různé schopnosti složek adsorbovat na pevnou fázi
- 2) rozdělovací chromatografie - využívá různé rozpustnosti složek v mobilní a stacionární fázi
- 3) chromatografie na molekulových sítích – separace probíhá na základě velikosti molekul
- 4) afinitní chromatografie – stacionární fáze váže pouze složky, ke kterým má afinitu
- 5) iontově-výměnná chromatografie – složky se separují na základě elektrostatických přitažlivých sil
- 6) chirální chromatografie – separace optických izomerů [46]

4.3.4.2. Stacionární fáze v HPLC

Stacionární fáze pro HPLC jsou náplní analytických kolon o délce od 10 do 250 mm a šířce 1 až 5 mm. Velikost částic se pohybuje od 1 do 10 μm . Při HPLC analýze je zapotřebí aby kolona splňovala určité požadavky jako je např: selektivita stacionární fáze kolony, co nejdelší životnost, účinnost a citlivost pro analýzu, rychlost analýzy, mechanická, termická a chemická stabilita kolon a kompatibilita s použitým detektorem. Těchto vlastností se docílí pečlivým výběrem vhodné kolony a to její délky, šířky, velikosti částic a volbou sorbentu [38,47,48].

4.3.4.2.1. Typy stacionárních fází pro HPLC

4.3.4.2.1.1 Stacionární fáze na bázi silikagelu

Silikagel je nejpoužívanější polární sorbent. Aktivními centry silikagelu jsou silanolové skupiny Si-OH, které dávají silikagelu slabě kyselé vlastnosti a umožňují navázání nejrůznějších ligandů a vytvoření mnoha modifikací [49].

Využití nachází silikagel v adsorpční chromatografii pro nízko a středně polární látky o molekulové hmotnosti do 1000 Da, a rozdělovací chromatografii pro polární ale i nepolární látky [38].

Rozdělovací chromatografie využívá již výše zmíněné rozdílné rozpustnosti analytu ve vzájemně nemísitelné mobilní a stacionární fázi, kde platí, že polární

analyty se rozpouští v polárních rozpouštědlech a nepolární v nepolárních rozpouštědlech. Dochází tedy k tomu, že nejsilněji je zadržován a tedy vychází z kolony poslední analyt, který nejlépe reaguje se stacionární fází a nejméně s mobilní.

Existují dvě varianty rozdělovací chromatografie, které se nazývají: chromatografie na normálních fázích, kde stacionární fáze (např. voda na silikagelu) je polární a zadržuje tedy polární látky s využitím nepolární mobilní fáze a chromatografie na reverzních fázích, kde stacionární fáze je nepolární (např. uhlovodíky C6, C18 vázané na silikagel) a slouží k dělení nepolárních analytů s využitím polární mobilní fáze. Změnami polarity mobilní fáze se ovlivňuje vymývání a separace složek. U metody reversních fází jsou časté modifikace zlepšující stabilitu stacionární fáze a snižující nežádoucí interakce analytů s volnými silanolovými skupinami silikagelu [38,49].

4.3.4.2.1.2 Hybridní stacionární fáze

Hybridní stacionární fáze jsou anorganicko-organické sorbenty vznikající reakcí anorganického alkoxy-silanu s organickým alkoxy-silanem. Což umožňuje uplatnění vhodných vlastností silikagelu, jako je vysoká účinnost a vysoká mechanická stabilita v kombinaci s pozitivy polymerů což je jejich pH stabilita a snížený počet volných silanolů. Uplatnění nacházejí v chromatografii na reversních fázích [48].

4.3.4.2.1.3 HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) stacionární fáze

HILIC stacionární fáze jsou vhodné pro separaci polárních, hydrofilních látek. Stacionární fází je v tomto případě aminopropyl vázaný na silikagel. Nevýhodou je, že aminové skupiny vázané na silikagel jsou příčinou vzniku alkalického prostředí v pórech silikagelu. Alkalické pH v pórech zapříčiní rozpouštění silikagelu a hydrolyzu chemicky vázané fáze. Alternativou je proto silikagel pokrytý nebo zesítěný polyaminy chemicky vázanými na silikagel, které jsou hydrolyticky stabilnější. Lze používat i samotný silikagel, kde volné silanolové skupiny hrají roli středního iontoměniče. Další fáze mohou být chemicky vázané fáze na silikagel jako diol (glycidylpropyl) nebo acetamidopropylová fáze. Pro HILIC je možné použít i neutrální hydrofilní polymerové fáze [50].

4.3.4.2.1.4 **Stacionární fáze založené na oxidech zirkonia, hliníku a titanu**

Oxidy hliníku, zirkonia a titanu mají oproti silikagelu vyšší chemickou stálost a nedochází k jejich rozpouštění při alkalickém pH, odolávají vyšším teplotám, a také byla prokázána velmi dobrá mechanická odolnost všech oxidů vůči tlaku srovnatelná se silikagelem. Nejlepší vlastnosti byly objeveny u oxidů zirkonia, ty lze použít v rozsahu pH 1-14 a teploty až 200 °C. Oxidy hliníku mají menší odolnost v kyselém prostředí (HCl), oxidy titanu vykazují v celém rozsahu pH podobné vlastnosti jako oxidy zirkonia, ale byly méně zkoumané. Nevýhodou oxidů je složitá chemie jejich povrchu oproti silikagelu. Nemodifikovaný silikagel je měničem kationů, zatímco oxidy kovů mají amfoterní charakter a uplatňují se dle zvoleného pH na výměně kationů nebo aniontů. Dále mají na svém povrchu oxidy těchto kovů místa s vlastnostmi Lewisovy kyseliny a umožňují tím ligandové výměny. Proto lze těžko předpokládat interakce probíhající na povrchu sorbentů. Oxidy kovů mají uplatnění v systému chromatografie na reversních fázích, kde jsou jejich povrchy pokrývány hydrofóbními vrstvami (např: polybutadienem, polystyrenem), které odstíní oxidy kovů a zprostředkují selektivní separaci neionizovaných látek [48].

4.3.4.2.1.5 **Monolitické stacionární fáze**

Monolitické stacionární fáze jsou oproti výše zmíněným částicovým tvořeny jediným kusem pórovitého materiálu. Výhodou monolitů je přítomnost pórů dvojí velikosti a to makropórů o velikosti cca 2 μm a mezopórů cca 13 nm. Makropóry monolitů umožňují použití vyšších průtoků na koloně aniž by docházelo k negativnímu nárůstu tlaku, zatímco mezopóry zvyšují separační účinnost kolony, jelikož poskytují velký separační povrch. Monolitické sorbenty tak umožňují rychlejší analýzu aniž by se snížila separační účinnost. Monolitické fáze jsou vhodné pro separaci biopolymerů, ale i malých a středně velkých molekul [47,48,51].

4.3.4.2.2. Mobilní fáze v HPLC

Mobilní fáze pro HPLC je vždy kapalina, nachází se v zásobních lahvích, musí být velmi čistá (HPLC grade) a před vstupem na kolonu zbavena rozpuštěných plynů. Toho lze dosáhnout např.: využitím degasseru, probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. Mobilní fáze musí dále být inertní k analytům a kompatibilní s kolonou a detektorem. Měla by být netěkavá a netoxická. Požadované složení mobilní fáze připraví vysokotlaké čerpadlo a směšovač [32,46].

Jsou využívány dva módy:

- 1) isokratický režim - využívá se jediná mobilní fáze, jejíž složení je konstantní
- 2) gradientový režim – v průběhu analýzy vzniká plynulý koncentrační gradient. Dochází k změně složení původní mobilní fáze přimícháváním určitého množství druhé mobilní fáze, za účelem rychlejšího vymytí analytů. Obdobně lze použít i pro gradient pH [33].

Vzorek je dávkován do mobilní fáze. Dávkování přesně definovaného množství vzorku může být ruční, pomocí injekční mikrostříkačky a dávkovacího kohoutu avšak dnes spíše automatické za využití tzv. autosampleru. Směs vzorku a mobilní fáze pokračuje na kolonu, kde podle elučních vlastností mobilní fáze, charakteru vzorku a stacionární fáze dochází k postupnému vymývání jednotlivých složek z kolony. Podle charakteru vzorku se může zlepšit separace (zvýšit specifita) např.: okyselením, zalkalizováním mobilní fáze, nebo přidáním pufru [32,40].

Velkým množstvím možností jak zvolit separační i detekční podmínky je umožněno široké využití HPLC. HPLC lze uplatnit i pro analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů. Umožňuje dělení směsí organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách či organických rozpouštědlech. Volba HPLC detektoru umožňuje rozseparované složky identifikovat a určit jejich množství [40].

4.3.4.2.3. HPLC detektory

Na detektory v HPLC jsou kladeny nemalé požadavky:

- selektivita pro analyty
- vysoká citlivost – detekce μg až ng množství analytu na 1 ml mobilní fáze
- rychlý sběr dat
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- odolnost na tlak, složení a teplotu mobilní fáze

Detektor je propojen s kolonou pomocí kapiláry (nejčastěji ocelová o průměru 0,5 mm). Odezva detektoru je vyhodnocována a zaznamenávána pomocí počítače což vede k vytvoření výsledného záznamu - chromatogramu. Příklady detektorů (viz. Tab 7) [40]

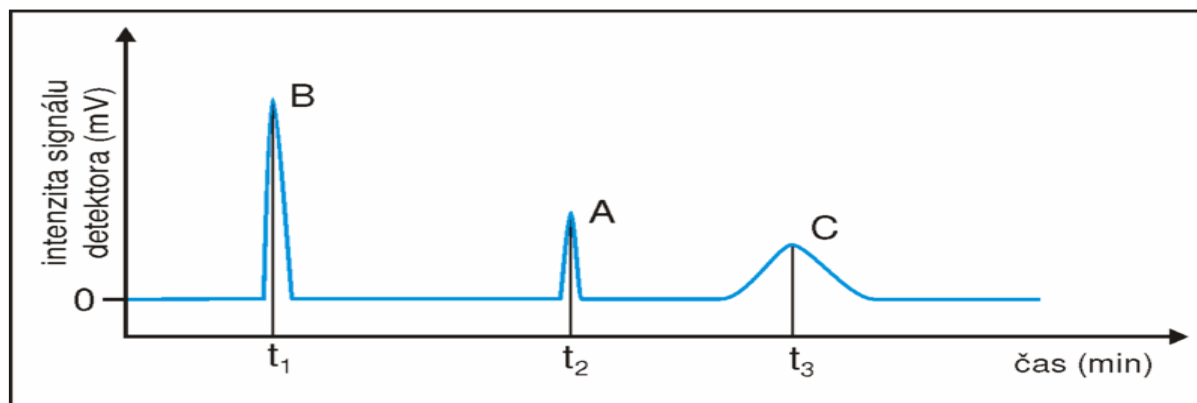
Tab 7: Typy detektorů [38,46]

typy detektorů
Fotometrické detektory (UV-VIS, DAD)
Refraktometrické detektory
Fluorescenční detektory (FD, LIF)
Elektrochemické detektory (vodivostní, voltametrické)
Hmotnostně spektrometrické detektory (MS)
Infračervené detektory (IR)
Infračervené detektory s Fourierovou transformací (FTIR)
Detektory s nukleární magnetickou rezonancí (NMR)
Radiochemické detektory
Polarimetrické detektory
Atomové absorpční/emisní spektrometry (AAS/AES)

Chromatogram je záznam signálu detektoru v závislosti na čase v němž detektor zaznamenával eluované látky. Chromatogram je následně vyhodnocen pomocí softwaru počítače, který umožňuje porovnávat buď plochy pod píkem nebo jejich výšku (viz. Obr 18) [32].

Podle typu odezvy jsou rozlišovány různé typy detektorů, kde každý je vhodný pro jiný typ analytu avšak mezi nejpoužívanější patří fotometrický, refraktometrický a fluorescenční detektor [38].

Obr 18: Chromatogram [52]



4.3.4.2.4. Vyhodnocení chromatogramů

Metody vyhodnocování chromatogramů umožňují kvantitativní (metoda vnějšího a vnitřního standardu, metoda standardního přídatku) i kvalitativní stanovení.

4.3.4.2.4.1 Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu (ESM) porovnává plochu píku stanovované látky a plochu píku standardu (stejná látka) o známé koncentraci. Měření obou musí probíhat za stejných podmínek v jiném čase. Je nezbytné dávkovat na kolonu přesně známý objem vzorku.

$$c_i = A_i / A_s * c_s$$

A_iplocha píku stanovované složky

A_splocha píku standardu

c_ikoncentrace složky ve vzorku

c_skoncentrace standardu

Využívá se metoda kalibrační křivky kdy se proměří řada standardů o různých koncentracích, sestaví se kalibrační křivka závislosti výšky (plochy) píku na koncentraci. A z vzniklého grafu se odečte koncentraci vzorku [38].

4.3.4.2.4.2 Metoda vnitřního standardu

U metody vnitřního standardu (ISM) se přidává přesně známe množství tzv. vnitřního standardu přímo do analyzované směsi před stanovením. Není třeba znát přesný objem nástřiku. Standard i vzorek jsou vystaveny stejným vlivům. Eliminují se chyby pracovního procesu [40].

Požadavky na vlastnosti vnitřního standardu:

- nesní být přítomen v původním vzorku
- nesmí reagovat s žádnou ze složek vzorku
- musí být dobře oddělen od ostatních složek
- musí eluovat v blízkosti stanovované složky [53]

4.3.4.2.4.3 Metoda standardního přídávku

U metody standardního přídávku (SAM) se provádí měření nejprve vzorku samotného a následně vzorku se známým množstvím přidaného standardního přídávku, který je stejnou látkou jako samotný vzorek. Nárůst plochy píku stanovované látky pak odpovídá přidanému množství a lze dopočítat původní koncentraci porovnáním dvou měření. Pro výpočet koncentrace musí být známy objemy nástřiků, a objem míšeného vzorku a standardního přídávku [32].

4.3.4.2.4.4 Kvalitativní stanovení

Kvalitativní analýza slouží k identifikaci látky. Identifikace látky pomocí HPLC není tak častá jako stanovení kvantity. Závisí na elučních parametrech, které jsou pro každou látku specifické. Důležitý je také vliv použitého systému a materiálu. Většinou se provádí identifikace očekávaného analytu porovnáním se standardy měřenými stejným systémem, za totožných podmínek.

Eluční parametry:

- retenční nebo eluční čas, t_{R} - čas od vstupu látky na kolonu po dobu, kdy se projeví jako průmět maxima píku na osu x chromatogramu
- retenční nebo eluční objem V_{R} - objem mobilní fáze, který kolonou proteče při konstantním průtoku za dobu retenčního času látky, objem potřebný k eluci látky

$$V_{R} = t_{R} \cdot F_{m}$$

F_mobjemový průtok kolonou

- retenční faktor R - vyjadřuje relativní zadržení složky na koloně a vypočítá se podle vzorce:

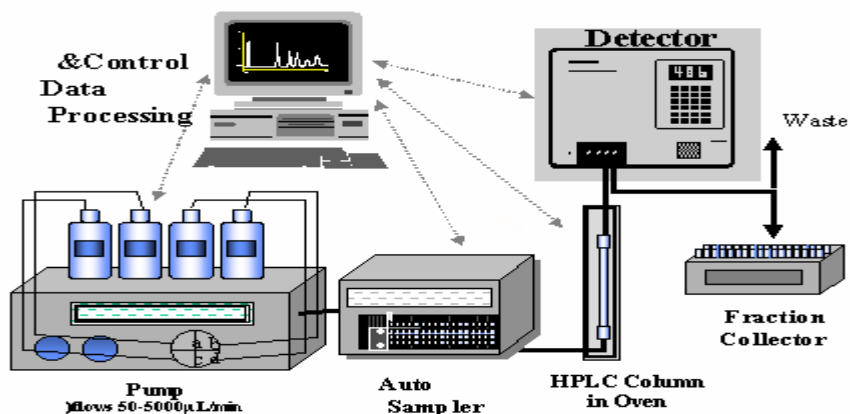
$$R = t_M / t_R$$

mrtvý retenční čas, t_M - čas kdy vystupuje z kolony inertní mobilní fáze [38,40]

4.3.4.2.5. Uspořádání HPLC

HPLC systém se běžně skládá ze zásobníků mobilní fáze, odplyňovacího zařízení (degasser), čerpadla mobilní fáze (pumpa), injektoru (autosampler), chromatografické kolony, detektoru, PC, odpadu nebo sběrače frakcí (viz. Obr 19).

Obr 19: Schéma HPLC uspořádání [54]



5. Praktická část

5.1. Přístroje a pomůcky chemikálie, standardy

Přístroje a pomůcky:

- Laboratorní třepačka LT-1 Kavalier (Sázava, Česká republika)
- Extrakční manifold VisiprepTM SPE Vacuum Manifold DL (disposable Liner), 12-port model, Sigma-Aldrich, SUPELCO (Praha, Česká republika)
- Příslušenství VisidryTM Drying Attachment for use with Visiprep 12-port model, Sigma-Aldrich, SUPELCO (Praha, Česká republika)
- Vakuová pumpa VACC-SPACE 50 Chromservis (Praha, Česká republika)
- SPE kolonka Speed C18/C18 (500 mg / 3 ml / 40 μ m/ 60Å), Applied Separations (Allentown, USA)
- SPE kolonka Speed C18/C18 (200 mg / 3 ml / 40 μ m/ 60Å), Applied Separations (Allentown, USA)
- pH metr Sentron Argus, sonda ISFET Sentron, Sentron; (AC Rodhen, Nizozemí)
- Elektrický vibrační strojek LAB DANCER, IKA WERKE (Staufen, Německo)
- Chlazená centrifuga HERAEUS 400R (Hanau, Německo)
- Koncentrátor AD 5301 Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Termostat PST-60HL PLUS (Boeco; Hamburg, Německo)
- Chlazená centrifuga Eppendorf Centrifuge Model 5810 / Refrigerated Model 5810 R (Praha, Česká republika)
- rotor: Eppendorf Swing-bucket Rotor A-4-62 pro Centrifugu 5810 / 5810 R, (Praha, Česká republika)
- Minicentrifuga Eppendorf MiniSpin[®] and MiniSpin plus Personal Microcentrifuges (Praha Česká republika)
- HPLC systém SHIMADZU LC-20A Prominence (Kyoto, Japonsko)
 - LC-20AB HPLC pumpa
 - Rack changer (pracovní teplota 4-40 °C)

- CTO-20AC termostat kolon
- SPD-M20A diode array detektor
- DGU-20A3 trojkanálový on-line degaser
- Autosampler SIL-20AC
- CBM-20A komunikační jednotka
- software (s operační pamětí) LC Solution multi
- HPLC kolona: spojení monolitních kolon SpeedROD RP-18e, 50 x4,6 mm a Chromolith Performance RP-18e,100 x4,6 mm , MERCK (Darmstadt, Německo)
- Skleněné zkumavky, skleněné bakteriologické zkumavky (na extrakci)
- Eppendorf zkumavky
- Mikropipety Finnpipe F1, Thermo Scientific; (Vantaa, Finsko)

Chemikálie:

- Acetonitril HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)
- Ethanol HPLC grade, Merck (Darmstadt, Německo)
- Methanol HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)
- N-hexan HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)
- Heptan, Merck,(Darmstadt, Německo)
- 2-propanol HPLC grade, Sharlau (Sentmenat, Španělsko)
- Kyselina trichloroctová crystal extrapure, Merck (Darmstadt, Německo)
- Kyselina octová, Glacial 100%, Merck (Darmstadt, Německo)
- Kyselina askorbová, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková p.a. Penta (Praha, Česká republika)
- Hydroxid draselný pellets, AppliChem (Darmstadt, Německo)
- Destilovaná voda, ultrafiltrace (GORO s.r.o., Praha, Česká republika)
- Chlorid sodný, NaCl 0,9% B. Braun (Melsungen, Německo)

Standardy:

- 25-(OH)D₃ CALBIOCHEM, distributor Merck s.r.o.(Říčany, Česká republika)
- D₂ FLUKA, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- D₃ FLUKA, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- Retinol, FLUKA, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- α-tokoferol, FLUKA, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- Tokol, MATREYA (Pleasant Gap, USA)

5.2. Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky:

- Zásobní roztok 25-hydroxycholekalCIFerolu (25(OH)D₃) c = 250 μmol/L byl připraven analytickým rozpuštěním 1 mg 25-hydroxycholekalCIFerolu v methanolu a doplněním do 10 ml.
- Zásobní roztok cholekalCIFerolu (D₃) c = 2000 μmol/L byl připraven navážením 7,693 mg cholekalCIFerolu, rozpuštěn v methanolu a doplněním do 10 ml.
- Zásobní roztok ergokalCIFerolu (D₂) c = 2000 μmol/L byl připraven rozpuštěním 7,933 mg ergokalCIFerolu v methanolu a doplněn do 10 ml.
- Zásobní roztok retinolu c = 2000 μmol/L byl připraven rozpuštěním 5,729 mg retinolu v methanolu a doplněním do 10 ml.
- Zásobní roztok α-tokoferolu c = 2000 μmol/L byl připraven rozpuštěním 21,536 mg α-tokoferolu v hexanu a doplněním do 25 ml.
- Zásobní roztok tokolu c = 1000 μmol/L byl připraven rozpuštěním 3,89 mg tokolu v hexanu a doplněním do 10 ml.
- Zásobní roztok kyseliny trichloroctové c = 1 mol/L byl připraven rozpuštěním 1,6339 g v destilované vodě a doplněním do 10 ml.
- Zásobní roztok kyseliny askorbové c = 0,1 mol/L byl připraven rozpuštěním 440 mg v destilované vodě a doplněním do 25 ml.
- Zásobní roztok hydroxidu draselného c = 10 mol/L byl připraven rozpuštěním 14,027 g v destilované vodě a doplněním do 25 ml.

- Zásobní roztok kyseliny chlorovodíkové $c = 1 \text{ mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 0,3646 g v destilované vodě a doplněním do 10 ml.
- Zásobní roztok kyseliny octové $c = 1 \text{ mol/L}$ byl připraven rozpuštěním 0,6005 g v destilované vodě a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztoky:

- Pracovní roztok 25-hydroxycholecalciferolu ($25(\text{OH})\text{D}_3$) byl připraven zředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci: $c = 0,4 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 0,75 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 1,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$.
- Pracovní roztok cholecalciferolu (D_3) byl připraven zředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci: $c = 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 5 \text{ } \mu\text{mol/L}$.
- Pracovní roztok ergocalciferolu (D_2) byl připraven zředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci: $c = 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 5 \text{ } \mu\text{mol/L}$.
- Pracovní roztok retinolu byl připraven zředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci: $c = 1 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 5 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 10 \text{ } \mu\text{mol/L}$.
- Pracovní roztok α -tokoferolu byl připraven zředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci: $c = 4 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 10 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 40 \text{ } \mu\text{mol/L}$.
- Pracovní roztok tokolu byl připraven zředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci: $c = 4 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/L}$.
- Pracovní roztok kyseliny trichloroctové byl připraven zředěním zásobního roztoku destilovanou vodou na koncentraci: $c = 0,1 \text{ mol/L}$, $c = 0,01 \text{ mol/L}$, $c = 0,001 \text{ mol/L}$.

5.3. Výchozí extrakční postup

Metoda byla vyvinuta a částečně zvalidována v rámci diplomové práce: Aplikace SPE a technologie monolitních kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek (Horčíčková 2009). Nový extrakční postup byl vyvíjen z důvodu nízké výtěžnosti extrakce pro cílové analyty 25(OH)D₃, D₂ a D₃. Dalším důvodem pro volbu jiného postupu přípravy vzorku před HPLC analýzou byl celkový čas předúpravy vzorku (1,5 hod), který byl nevhodný pro zpracovávání velkých sérií vzorků.

Do skleněné zkumavky napipetovat 250 µl séra a přidat 1000 µl ethanolu chlazeného (4 °C). Vzorek protřepat na vortexu a 10 minut deproteinovat při 4 °C v chladničce. Po 10 minutách zcentrifugovat (4 000xg, 15 minut, 4 °C). Připravit kolonku (Speed C18/18 500 mg/3 ml) aktivací a kondicionací 1 ml methanolu a promytím 1 ml destilované vody. Během těchto kroků nesmí vyschnout sorbent kolonky. Odebrat supernatant ze zkumavky a nanést na předem připravenou kolonku, nechat naadsorbovat analyty na sorbent. Vyměnit zkumavky a eluovat vitaminy 1,5 ml methanolu a následně 2 ml hexanu. Na konci elučního kroku zvýšit tlak vakuové pumpy na maximum a působit vakuem přibližně 1 minutu. Eluát odpařit ze zkumavky v koncentrátoru při 45 °C. Odparek rozpustit v 250 µl methanolu a analyzovat HPLC metodou.

Vyvinutá a optimalizovaná metoda byla částečně validována. Hodnoty výtěžnosti SPE extrakce ze spikovaného lidského séra pro jednotlivé vitaminy byly následující: kalcidiol 66,7 ± 7,8 %, ergokalciferol 67,4 ± 4,2 %, cholekalciferol 66,6 ± 4,1 %, retinol 83,7 ± 8 %, α-tokoferol 73 ± 6,9 % [39].

5.3.1. Chromatografické podmínky analýzy

Metoda byla optimalizována a validována v rámci diplomové (Vývoj HPLC metody a stanovení vitamínu D v biologickém materiálu; 2008, Vlčková) a rigorózní (HPLC metoda pro současné stanovení liposolubilních vitamínu A, D, E; 2010, Nová) práce[55,56].

- mobilní fáze:
 - A: methanol:voda:2-propanol (75:15:10)
 - B: methanol:voda (95:5)
- kolona: spojení monolitních kolon SpeedROD RP-18e, 50 x 4,6 mm a Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
- průtok mobilní fáze:
 - A: 3 ml/min, 0.- 3. minuta
 - B: 3,5 ml/min, 3.- 3,5 minuta
- doba analýzy: 6,5 minuty
- nástřik: 20 μ l
- detekce:
 - 25-(OH) D₃, D₂, D₃: 264 nm
 - retinol: 325 nm
 - α -tokoferol, tokol: 295 nm

5.4. Optimalizace SPE postupu

Výše zmíněný postup byl obměňován za účelem dosažení lepších výsledků výtěžnosti extrakce vitamínu D₂, D₃ a metabolitu (25-(OH) D₃). Byly testovány změny v podmínkách:

- deproteinace séra (vliv teploty, různá deproteinační činidla a také čas deproteinace)
- postupu eluce
- postupu dávkování vzorku a elučních rozpouštědel na SPE kolonku
- vlivu centrifugace na čistotu extraktu

Centrifuga (HERAEUS 400R), která byla použita při vývoji extrakčního postupu, který byl optimalizován v této práci, byla v laboratoři nahrazena novou centrifugou (Eppendorf 5810R), proto byly podmínky cetrifugace při optimalizaci postupu změněny.

5.5. Vývoj a optimalizace LLE postupu

Na základě literární rešerše [27,28,57,58,59] a zkušeností z vývoje SPE byl navržen jednoduchý postup extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) kalcidiolu, ergokalciferolu, cholekalciferolu, retinolu a α -tokoferolu z lidského séra.

- Spikované deproteinační činidlo - koncentrace v 10 ml odměrné baňce

D ₂	c=1 μ mol/L
D ₃	c=1 μ mol/L
retinol	c=1 μ mol/L
25(OH)D ₃	c=0,4 μ mol/L
α -tokoferol	c=4 μ mol/L
tokol	c=4 μ mol/L

- 500 μ l séra + 500 μ l spikovaného etanolu
- promíchat (vortex cca.10 s)
- deproteinace (- 28 $^{\circ}$ C, 10 minut)
- 1 ml hexanu, promíchat (vortex cca.10 s)
- centrifugace (10 min, 4 $^{\circ}$ C, 3 220 x g)
- odebrat organickou vrstvu,odpařit v koncentrátoru (45 $^{\circ}$ C)
- odparek rozpustit ve 100 μ l methanolu

Navržený extrakční postup byl dále optimalizován. Byla testována: různá deproteinační činidla, vhodný objem a změna pH a různá extrakční (organická) činidla.

6. Výsledky a diskuse

6.1. Optimalizace SPE postupu

Pro optimalizaci deproteinace séra byl testován vliv teploty, různá deproteinační činidla a také čas deproteinace.

6.1.1. Optimalizace deproteinace

6.1.1.1. Výběr vhodné teploty

Byl testován vliv různé teploty v průběhu deproteinace na výtěžnost extrakce. Proti 4 °C používaným ve výchozí metodě byla testována teplota vyšší (60°C) a později nižší (-28°C).

6.1.1.1.1. Testování teploty (60°C)

Aby bylo možné provést deproteinaci za zvýšené teploty bylo deproteinační činidlo (99 % ethanol, 1 000 µl) a sérum (250 µl) smícháno v 1,5 ml Eppendorf zkumavce a uzavřeno. Deproteinace probíhala 10 minut při 60°C v termostatu. Po deproteinaci byl vzorek centrifugován za použití centrifugy Minispin (Eppendorf). Separace byla provedena při 14 000 x g, 5 minut (centrifuga není chlazená). SPE extrakce byla provedena původním způsobem (hexan, methanol) a extrakty proměřeny.

Tab 8: Testování vlivu teplot na deproteinaci 4°C a 60°C 10 min

deproteinace	plocha píku		
	25(OH)D ₃	retinol	α-tokoferol
4°C 10 min	4 055	26 491	23 997
60°C 10 min	2 514	21 867	21 666

Deproteinační efekt zvýšené teploty (60°C) nebyl při pokusu prokázán. Naměřené hodnoty vycházeli nižší než při (4 °C) (viz.Tab 8). Výsledek odpovídá údajům z literatury [60,61], kde je obecně uváděno, že vyšší teplota není pro vitamíny rozpustné v tucích vhodná. Proto byla dále testována teplota nižší, než byla používána v původní metodě.

6.1.1.1.2. Testování teploty (-28 °C)

Při pokusu byly vzorky 250 µl séra s 1 000 µl deproteinačního činidla (99 % ethanol) opět v Eppendorf zkumavce uzavřeny a uloženy do mrazicí skříně (-28°C). Doba deproteinace byla 15 minut. Centrifugace a extrakce, byla provedena stejným postupem jako v předchozí kapitole. Výsledky jsou shrnuty v tabulce Tab 9.

Tab 9: Testování vlivu teplot na deproteinaci 4°C a -28°C 15 min

deproteinace	plocha píku					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
4°C 15 min	74 577	14 128	157 004	258 478	264 118	14 925
-28°C 15 min	79 920	12 741	161 027	242 940	269 997	15 155

Z výsledků je jasné, že teplota (-28 °C) při deproteinaci má pozitivní vliv na 25(OH)D₃, hodnoty ostatních analytů nejsou významně ovlivněny. Proto byla tato teplota zvolena pro další postupy.

6.1.1.2. Výběr vhodného deproteinačního činidla

Testování deproteinačních činidel probíhalo ve stejné fázi pokusů jako volba optimální teploty, proto deproteinace neprobíhala při -28°C, ale pouze při 4°C.

Pro testování byly vybrány tři pro tento účel běžně používaná rozpouštědla. Ethanol, který byl součástí původního postupu, methanol a acetonitril (Tab 10).

Tab 10: Testování deproteinačních činidel

deproteinace	plocha píku					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
1 ml ACN	92 217	12 793	156 312	274 076	269 418	3 267
1 ml MeOH	90 568	13 572	158 289	187 612	225 882	10 684
1 ml EtOH	74 577	14 128	157 004	258 478	264 118	14 925

Acetonitril měl prokazatelně pozitivní vliv na stanovení cílových analytů (25(OH)D₃, D₂ a D₃). U dalších analytů nebylo tohoto efektu dosaženo. Vyšších hodnot bylo dosaženo s původně používaným ethanolem.

V další fázi byl ověřen efekt směsí těchto rozpouštědel (Tab 11).

Tab 11: Testování směsí rozpouštědel

deproteinace	plocha píku					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
1 ml ACN:MeOH 1:1	87 768	12 718	155 187	252 399	253 711	12 590
1 ml ACN:EtOH 1:1	88 798	13 736	165 133	272 329	264 213	14 757
1 ml MeOH:EtOH 1:1	81 684	13 230	154 110	253 870	270 323	13 648

Z uvedené tabulky je patrné, že původně používaný 99 % ethanol nevykazuje nejvyšší výsledky. Nejlépe se zde jeví využití kombinace acetonitril:ethanol 1:1.

Následně byla provedena další měření s deproteinací vzorku již při -28°C 10 minut a porovnávána směs acetonitrilu s ethanolem v různých poměrech (Tab 12).

Tab 12: Porovnání poměrů acetonitril:ethanol

deproteinace	plocha píku					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
ACN:EtOH 1:1	78 432	14 606	153 876	251 234	263 081	13 949
ACN:EtOH 1:2	80 256	14 814	151 241	250 949	230 457	13 099
ACN:EtOH 2:1	78 983	15 297	150 950	256 734	257 313	14 556

Výsledky z tohoto měření nebyly jednoznačně ukazující na výhodnost některého z poměrů.

6.1.1.3. Optimalizace doby působení deproteinačního činidla

Po výběru činidla a teploty deproteinace byl testován čas, po který je nejvhodnější nechat činidlo působit při teplotě -28°C (Tab 13). Další postup extrakce byl stejný jako výchozí postup.

Tab 13: Testování času deproteinace

deproteinace	plocha píku					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
5 min	75 381	13 838	147 662	230 429	241 207	13 744
10 min	78 432	14 606	153 876	251 234	263 081	13 949
15 min	74 348	14 227	146 195	226 764	247 500	13 044
20 min	78 349	14 995	152 992	256 736	247 021	14 022

Po porovnání ploch změřených analytů vychází nejlépe čas deproteinace 10 min. Oproti zároveň dobře vycházejícímu času 20 minut byl zvolen kratší čas (10 minut), výhodnější vzhledem k celkové době přípravy vzorku před stanovením vitaminů.

6.1.2. Vliv množství vzorku na stanovení

Z důvodu nutnosti zakoncentrování musel být původní postup upraven zvýšením objemu vzorku (v původním postupu nebyl krok zakoncentrování zahrnut). Proto byl testován vliv objemu vzorku na výtěžnost extrakce. Jako testovaná byla zvolena menší SPE kolonka (200 mg/3 ml) než byla použita v původním postupu. Účelem bylo ověřit, zda kapacita 500 mg kolonky není příliš velká, a proto analyty nejsou dostatečně eluovány.

Pro testování kapacity kolonky byl použit standardní roztok o složení kalcidiol $c=0,75 \mu\text{mol/L}$, ergokalciferol $c=2,5 \mu\text{mol/L}$, cholekalciferol $c=2,5 \mu\text{mol/L}$, retinol $c=5 \mu\text{mol/L}$, α -tokoferol $c=20 \mu\text{mol/L}$, tokol $c=20 \mu\text{mol/L}$.

Postup:

- aktivace kolonky: 2x200 μl methanolu
- dávkování různých objemů vzorku na kolonku
- eluce: 2x200 μl Hexan:Methanol (95:5)

Kapalina, která protekla kolonkou po nanesení vzorku, byla odebrána a odpařena v koncentrátoru. Odparek rozpouštěn ve stejných objemech, jako byly objemy vzorků. Byly získány dvě sady vzorků, jedna sada odpadů viz. (Tab 15) a druhá sada elucí viz. (Tab 14).

Tab 14: Eluce hexan:propanol (95:5).

eluce – objem vzorku (μl)	výtěžnost v %					
	25(OH) D_3	retinol	tokol	D_2	D_3	α -tokoferol
100	45	73	91	86	85	83
200	0	72	85	81	80	77
300	0	67	85	84	81	79
400	0	58	83	83	81	82
500	0	47	82	88	85	84

Tab 15: Analýza odpadů různých objemů vzorku

odpad– objem vzorku (μl)	výtěžnost v %					
	25(OH) D_3	retinol	tokol	D_2	D_3	α -tokoferol
100	49	0	0	0	0	0
200	20	0	0	0	0	0
300	10	3	0	0	0	0
400	13	18	2	0	0	0
500	9	9	10	1	5	0

Z těchto dvou tabulek je zřejmé, že se na kolonce analyty zcela nezachycují a určité množství odchází do odpadu a dochází tak ke snižování výtěžku. Nejvýznamnější úbytek byl zaznamenán u pro nás nejdůležitějšího analytu $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Menší kolonka (200 mg/3 ml) byla vyhodnocena jako nevhodná.

6.1.3. Eluce

Pro optimalizaci eluce analytů byla testována různá eluční činidla a vliv teploty při odpařování elučního činidla na analyty.

6.1.3.1. Výběr vhodného elučního činidla

Vhodné eluční činidlo bylo vybíráno na základě eluce standardů. Bylo použito 250 μl standardního roztoku o složení:

- kalcidiol $c=1,5 \mu\text{mol/L}$
- ergokalciferol $c=5 \mu\text{mol/L}$
- cholekalciferol $c=5 \mu\text{mol/L}$
- retinol $c=10 \mu\text{mol/L}$
- α -tokoferol $c=40 \mu\text{mol/L}$
- tokol $c=20 \mu\text{mol/L}$

Standardní roztok byl nanášen na předem aktivovanou kolonku dle výchozího postupu. Po naadsorbování analytů a výměně zkumavek byla provedena eluce vybranými činidly.

Bylo použito 2 ml n-hexanu a n-hexan s přídavkem 2-propanolu o celkovém objemu 2 ml. Přídavek 2-propanolu byl testován z důvodů zvýšení polaritě elučního činidla. 2-propanol je na rozdíl od původně používaného methanolu mísitelný s hexanem což umožňuje vytvořit eluční směs o vhodné polaritě. Pro porovnání byla použita eluce z původního postupu (1,5 ml methanolu+2 ml n-hexanu) viz. tabulka Tab 16.

Tab 16: Výběr elučního činidla obměna výchozího postupu

eluče	výtěžnost v %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
hexan	16	0	0	0	0	66
hexan:propanol (1:1)	112	95	96	89	86	68
hexan:propanol (2:1)	87	68	94	67	61	63
hexan:propanol (3:1)	96	76	95	83	80	66
hexan:propanol (4:1)	106	87	91	77	75	65
hexan:propanol (5:1)	0	64	72	59	56	47
1,5 ml MeOH+2 ml hexan	95	46	100	84	83	68

Každý vzorek byl porovnáván se změřeným standardem, který neprošel extrakcí. Na základě výsledků bylo změněno eluční činidlo. Oproti výchozímu postupu z 1,5 ml methanolu a 2 ml n-hexanu na 2 ml n-hexan:propanol (1:1).

6.1.3.2. Odpařování eluátu

Z důvodu zkrácení doby odpařování eluátu vzorku, které při 45 °C trvalo přibližně 140 minut což je velmi nevýhodné pro použití metody v praxi. Bylo ověřeno zda zvýšení teploty ze 45 °C na 60 °C nemá negativní vliv na stanovované analyty.

Směsi standardů byly odpařeny při obou uvedených teplotách.

Tab 17: Vliv teploty na odpařování eluátu

odpařování	plocha píku					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
45°C	8 226	17 064	12 372	11 591	13 318	16 394
60°C	8 002	16 004	12 112	11 062	13 126	15 294
pokles %	3	6	2	5	1	7

Zvýšení teploty zkrátilo dobu odpařování standardů ze 140 minut na 100minut. Ve výsledku měření byl zaznamenán několika procentní pokles velikosti ploch píků při vyšší teplotě viz. Tab 17. Byl tedy řešen problém, zda je výhodnější urychlení odpařování eluátu, za cenu nižších výtěžností stanovovaných analytů.

Pro další postup byla zvolena nižší teplota odpařování.

Výsledky zkoušených postupů nebyly uspokojující a nebylo dosaženo výrazného zlepšení výchozího postupu pro SPE extrakci. Bylo proto rozhodnuto vyzkoušet jinou metodu extrakce a v další pokusech pokračovat s vývojem metody s využitím LLE.

6.2. Liquid liquid extrakce

6.2.1. Zkoušení deproteinačního činidla

Pokusy byly prováděny za použití spikovaného ethanolu (deproteinační činidlo) a současného stanovení blanku séra.

6.2.1.1. Výběr nejvhodnějšího objemu deproteinačního činidla (DC)

Byl testován různý objem deproteinačního činidla vhodného pro deproteinaci 500 µl séra. K séru byla přidána různá množství spikovaného ethanolu (4°C). Výsledná procenta výtěžnosti extrakce viz tabulka (Tab 18).

- promíchat (vortex cca.10 s)
- deproteinace (- 28 °C, 10 minut)
- 1ml hexanu, promíchat (vortex cca.10 s)
- centrifugace (10 min, 4°C, 3 220x g)
- odebrat organickou vrstvu, odpařit (45°C)
- odparek rozpustit ve 100 µl methanolu

Tab 18: Výběr množství deproteinačního činidla

objem DC (µL)	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
500 DC	68	63	87	85	80	89
1000 DC	29	61	67	67	67	56
1500 DC	4	45	64	66	64	63

Z prvního pokusu s různými objemy deproteinačního činidla bylo zjištěno, že nižší objem vykazuje lepší výsledky viz Tab 18. Proto bylo později provedeno další podrobnější měření s menšími objemy (500 µl - 100 µl) spikovaného ethanolu. Postup byl obměněn přidáním 200 µl TCA c=0,01 mol/L po deproteinaci a zvýšením objemu hexanu na 2 ml. K této obměně bylo přistoupeno na základě pozdějších pokusů. Výsledky jsou shrnuty v Tab 19.

Tab 19: Vliv malých objemů DC na deproteinaci lidského séra

objem DC (µl)	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
500	85	141	102	104	96	82
400	115	147	98	110	99	167
300	135	127	98	105	97	185
200	136	157	85	96	87	563

Objem 100 μl tabulka nezahrnuje, takto nízký objem DC nestačí na deproteinaci 500 μl séra. I u ostatních nižších objemů bylo vzhledem k naměřeným hodnotám podezření, že deproteinace je nedokonalá a vzorek pravděpodobně obsahuje balastní látky, které falešně navyšují výtěžnost.

Tabulka (Tab 20) zobrazuje procentuální zastoupení jednotlivých fází v extrakční směsi. Toto zastoupení se logicky mění s rostoucím objemem deproteinačního činidla.

Tab 20: Procentuální zastoupení fází

extrakční prostředí						
Vzorek (μl)	ethanol (μl)	n-hexan (μl)	TCA 0.01mol/l	% EtOH+TCA	% vodné fáze	% organ. fáze
500	500	2000	200	26	38	63
500	1000	2000	200	38	46	54
500	1500	2000	200	46	52	48

Vliv procentuálního zastoupení fází extrakčního prostředí na výtěžnost extrakce jednotlivých analytů je shrnut v tabulce (Tab 21).

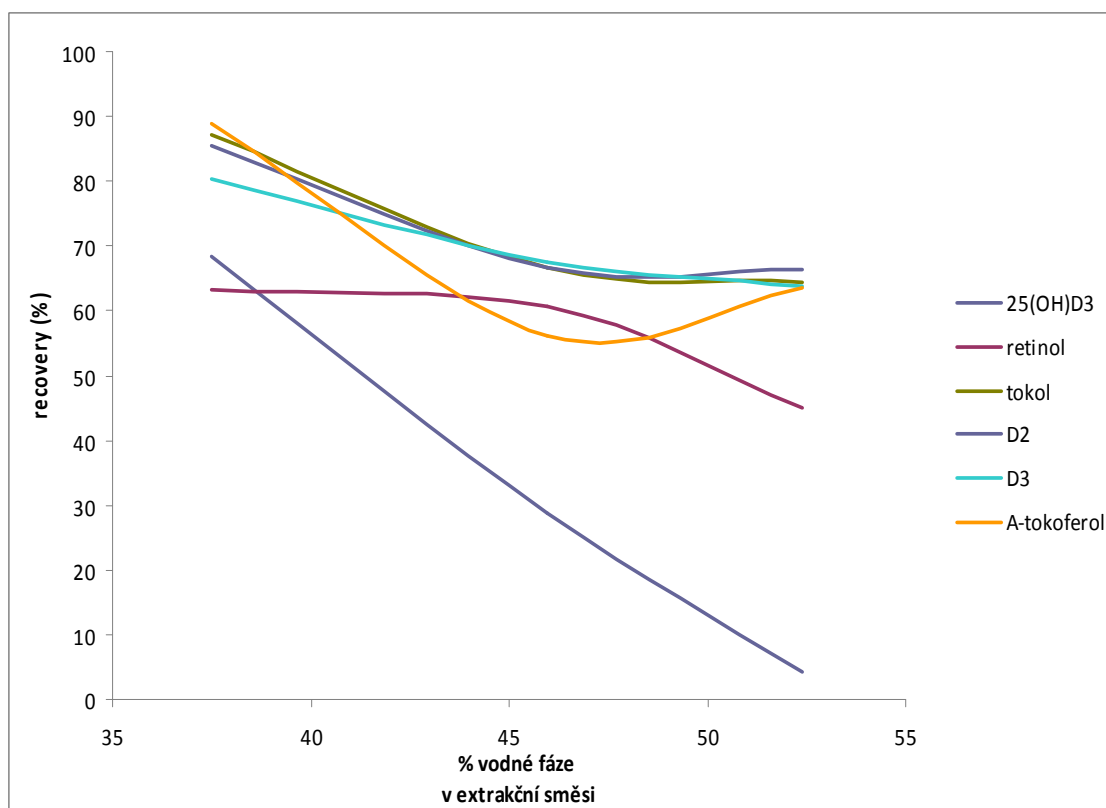
Tab 21: Vliv procentuálního zastoupení fází extrakčního prostředí na recovery

analyt	% vodné fáze		
	38	46	52
výtěžnost %			
25(OH)D₃	68	29	4
retinol	63	61	45
tokol	87	67	64
D₂	85	67	66
D₃	80	67	64
α-tokoferol	89	56	63

Z tabulky je patrné, že s rostoucím zastoupením vodné fáze a ethanolu+TCA se snižuje výtěžnost cílových analytů, oproti tomu se zastoupením organické fáze narůstá. Tento efekt svědčí pro výhodnější použití objemu 500 μl ethanolu, kde je ve výsledné směsi nejnižší zastoupení vodné fáze a ethanolu s TCA a nejvyšší % organické fáze.

Závislosti zastoupení vodné fáze na výtěžnosti extrakce zobrazuje následující graf (Obr 20).

Obr 20: Graf procentuální závislosti výtěžnosti extrakce analytů na zastoupení vodné fáze



6.2.1.2. Výběr vhodného deproteinačního činidla

V předešlých pokusech byl pro deproteinaci používán pouze 99 % ethanol vychlazený na 4 °C. Dále byla za využití výsledků z předešlých pokusů testována různá deproteinační činidla (ethanol, acetonitril, methanol a jejich kombinace v poměrech 1:1). Bylo postupováno vždy přidáním 500 µl séra k spikovanému deproteinačnímu činidlu, přičemž byl vždy změřen také blank a standard deproteinačního činidla. Sérum a deproteinační činidlo bylo promícháno na vortexu cca. 10 sec. Deproteinace probíhala při -28° C 10 minut. Poté byla přidána kyselina trichloroctová o objemu 200 µl (c= 0,01 mol/l) a následně 2 ml hexanu opět promícháno na vortexu cca. 10 sec. Dále proběhlo 5 min třepání a následná centrifugace 10 min při 4° C, 3220 x g. Horní hexanová vrstva byla odebrána a odpařena v koncentrátoru při 45°C. Odparek rozpuštěn ve 100 µl metanolu a analyzován.

Souhrn získaných výsledků je znázorněn v tabulce (Tab 22).

Tab 22: Výběr deproteinačního činidla

DC (1 mL)	výtěžnost v %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
ethanol	29	61	67	67	67	56
methanol	45	63	57	62	55	62
acetonitril	27	60	69	79	74	67
ethanol:acetonitril	32	60	82	90	61	75
ethanol:methanol	16	63	76	98	67	63
methanol:acetonitril	32	69	74	86	76	69

Z výsledků bylo zjištěno, že samotný ethanol stejně jako u SPE nevykazuje nejlepší výsledek. Pro další testování byly vybrány poměry methanol:acetonitril a ethanol:acetonitril (1:1). Stejným postupem jako u předchozího pokusu byl zkoušen vliv objemu těchto deproteinačních činidel na výtěžnost a testovány objemy 500 µl a 1000 µl. Výsledky viz Tab 23.

Tab 23: Porovnání objemů vybraných deproteinačních činidel

objem	DC	výtěžnost v %					
		25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
500µl	methanol:acetonitril (1:1)	112	91	95	101	99	133
1000µl		80	122	107	111	109	147
500µl	ethanol:acetonitril (1:1)	119	131	112	117	118	121
1000µl		68	87	97	105	103	114

Opět byl pokus uzavřen závěrem, že nižší objem deproteinačního činidla je výhodnější pro extrakci vitaminů rozpustných v tucích ze séra. V tomto pokuse bylo dosaženo hodnot kolem 100% u všech analytů s deproteinačním činidlem ethanol:acetonitril (1:1) o objemu 500 µl viz tabulka (Tab 23). Poměr ethanol:acetonitril (1:1) se osvědčil již při použití u SPE, ovšem v kombinaci s LLE bylo dosaženo o mnoho vyšších výtěžností.

6.2.2. Změna pH extrakční směsi

Byla testována změna pH, která by ovlivnila uvolnění analytu z matrice. Dále bylo testováno použití antioxidantu (kyselina askorbová), které by mohlo zabránit oxidaci analytů při velké změně pH. Použitá činidla:

- kyselina askorbová (AA)
- hydroxid draselný
- kyselinu octovou, trichloroctvou a chlorovodíkovou

6.2.2.1. Zvýšení pH - saponifikace

Za účelem zmýdelnění tuků (saponifikace) a uvolnění analytů z matrice byl testován efekt různých objemů hydroxidu draselného, v kombinaci s přidanou kyselinou askorbovou (AA), jako antioxidantu pro zabránění rozkladu analytů.

- 1000 µl ethanolu + 500 µl séra
- KOH + AA
- promíchat (vortex cca.10 s)
- deproteinace (- 28°C, 10 minut)
- 1ml hexanu promíchat (vortex cca.10 s)
- centrifugace (10 min, 4°C, 3 220 x g)
- odebrat organickou vrstvu, odpařit v koncentrátoru (45°C, cca. 12 min)
- odparek rozpustit ve 100 µl methanolu

Tab 24: Testování hydroxidu draselného a kyseliny askorbové

KOH + AA	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
250 +250	20	69	5	75	62	89
500 +500	22	51	9	74	58	32
1 000+1 000	3	23	30	68	62	32

Přítomnost KOH a AA při extrakci vitaminů ze séra nepomohla k výraznému navýšení výtěžku viz. Tab 24. Pouze 25(OH)D₃ v přítomnosti nižších objemů 250 µl a 500 µl saponifikační směsi vykazuje mírné zlepšení z 0 % na 22 %.

Výtěžnost vnitřního standardu (Tokol) byla v zásaditém prostředí výrazně nižší (maximálně 30%). Proto byla saponifikace séra z extrakčního postupu vynechána.

6.2.2.2. Snížení pH

Pro změny pH prostředí a usnadnění přestupu analytů fázovým rozhráním byly použity následující kyseliny (octová, trichloroctová a chlorovodíková).

- 1000 µl ethanolu+500 µl séra
- 200 µl AA + 200 µl kyseliny chlorovodíkové. octové nebo trichloroctové
- promíchat (vortex cca.10 s)
- deproteinace (- 28°C, 10 min.)
- 1ml hexanu, promíchat (vortex cca.10 s)
- centrifugace (10 min, 4°C, 3 220 x g)
- odebrat organickou vrstvu, odpařit v koncentratu (45°C, cca. 12min.)
- odparek rozpustit ve 100 µl methanolu

Tab 25: Testování změny pH extrakčního prostředí

200 µl AA +200 µl kyseliny	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
HCL (1mol/l)	53	50	88	87	85	60
kys.octová (1mol/l)	49	94	91	89	87	79
kys.trichloroctová (1mol/l)	55	96	92	88	84	149

S přidáním kyselin k deproteinačnímu činidlu bylo dosaženo výrazného vzestupu výtěžnosti všech analytů viz. Tab 25. Z kyselin byl vyhodnocen jako nejlepší efekt přidané kyseliny trichloroctové (TCA) viz. tabulka 24.

Byla testována též kyselina chlorovodíková o koncentracích 35 a 10 %. Obě koncentrace však neposkytly použitelný výsledek z důvodů vytvoření gelu, ze kterého analyty nebylo možné stanovit.

6.2.2.2.1. Testování kyseliny trichloroctové

Byl testován vliv koncentrace kyseliny trichloroctové na výtěžnost extrakce. Zároveň bylo proměřeno pH, nejprve samotné kyseliny a později deproteinační směsi (kyselina trichloroctová, ethanol, kyselina askorbová, sérum) viz: Tab 26.

Do postupu testování kyselin bylo zařazeno po přidání 1ml hexanu 5min třepání.

Tab 26: Závislost pH deproteinační směsi na koncentraci kyseliny trichloroctové

koncentrace TCA (mol/l)	pH TCA vypočtené	pH TCA změřené*	pH směsi (TCA+AA+EtOH+sérum)
1,0	0	1,15	2,02
0,1	1	1,60	2,53
0,01	2	2,01	3,40
0,001	3	2,92	4,05

K deproteinační směsi (1000 µl) a séru (500 µl) byla přidána směs 200 µl kyseliny askorbové a 200 µl různých koncentrací kyseliny trichloroctové.

Tab 27: Vliv koncentrace kys. trichloroctové na výtěžnost extrakce

koncentrace TCA (mol/l)	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
1,0	30	0	85	82	82	70
0,1	23	76	83	84	83	70
0,01	29	81	84	83	85	70
0,001	29	77	305	81	79	61

Z výsledků vyplynula nejlepší výtěžnost s přidavkem TCA o koncentraci 0,01 mol/L viz. Tab 27. A také bylo ověřeno, že příliš nízké pH nebylo vhodné pro stanovení retinolu, který při koncentraci TCA 1 mol/l a pH deproteinační směsi 2,02 již nebylo možné stanovit. Vitamin D₂, D₃ a jejich metabolit 25(OH)D₃ nevykazovaly v testovaném rozmezí pH deproteinační směsi (2,02 – 4,05) významné změny výtěžnosti. Výtěžnost α-tokoferolu byla negativně ovlivněna až koncentrací 0,001 mol/L kyseliny trichloroctové.

V předešlých pokusech byla přidávána TCA o koncentraci (c = 0,01 mol/L), přímo s deproteinačním činidlem. Dále bylo testováno jestli přidání TCA v jiné fázi extrakčního postupu změní výtěžnost. Deproteinace séra probíhala bez přítomnosti TCA, kyselina byla k směsi přidána až před extrakcí (před nebo po přidání hexanu). Tento pokus probíhal později, proto nebyla použita kyselina askorbová jako antioxidant a k extrakci byly použity 2 ml n-hexanu.

Tab 28: Přidání TCA po deproteinační

TCA přidána	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
S DC	29	81	84	83	85	70
před n-hexanem	84	105	107	85	82	68
po n-hexanu	77	77	98	75	71	58

Z výsledků je zřejmé, že s kyselinou trichloroctovou bylo docíleno lepších výtěžností extrakce přidáním k již zdeproteinovanému vzorku. Přičemž lépe dopadla aplikace TCA před hexanem viz. Tab 28.

Vliv antioxidačního účinku 200 µL kyseliny askorbové (AA) pravděpodobně nebyl dostačující pro desetiminutové působení během deproteinace, proto byl ověřen antioxidační efekt AA deproteinační směsi.

6.2.2.3. Ověření antioxidačního efektu používané kyseliny askorbové

V předešlých pokusech byla do deproteinační směsi přidávána kyselina askorbová jako antioxidant chránící stanovované analyty.

Antioxidační efekt na analyty byl ověřen přidáním různých objemů AA do deproteinační směsi.

Tab 29: LLE vliv kyseliny askorbové na stanovované vitaminy

200 µL TCA + AA (µL)	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
0	28	85	86	86	87	109
200	9	64	76	75	76	52
700	26	58	75	75	73	23
1500	32	62	48	52	50	12

Pozitivní vliv kyseliny askorbové na stanovení nebyl potvrzen. Naopak větší objemy přidané kyseliny askorbové vedly k nižším výtěžnostem retinolu, tokolu (IS), vitamínu D₂ a D₃ i α-tokoferolu viz Tab 29. Nižší výtěžnost byla pravděpodobně způsobena změnou pH a poměru vodná/organická fáze v extrakční směsi. Výtěžnost 25(OH)D₃ nebyla ovlivněna objemem přidané AA.

V dalších pokusech nebyla proto AA používána.

6.2.2.4. Testování množství extrakčního činidla

S vyšším objemem extrakčního činidla bylo prokazatelně docíleno vyšších výtěžností, proto byl vhodný objem použitého extrakčního činidla testován v dalším pokuse opakovanou extrakcí.

Opakovaná extrakce byla provedena přidáním 1 ml nebo 2 ml hexanu k zdeproteinovanému vzorku. Každý vzorek byl třikrát extrahován stejným objemem činidla (5 min třepání, centrifugace 10 min při 4°C 3220 x g, odebrání organické vrstvy a opět přidání hexanu). Organické vrstvy byly dohromady odpařeny při 45°C. Odparek vždy rozpuštěn ve 100 µl metanolu. Výsledky viz Tab 30.

Tab 30: Opakovaná LLE extrakce 1ml hexanu a 2ml hexanu

	výtěžnost %					
1ml hexanu	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
1. extrakce	0	23	49	51	51	10
2. extrakce	0	27	18	16	15	16
3. extrakce	0	9	3	0	3	4
celková výtěžnost %	0	59	70	68	69	30
	výtěžnost %					
2 ml hexanu	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
1. extrakce	20	68	76	78	79	97
2. extrakce	20	16	8	6	6	0
3. extrakce	15	3	9	0	0	0
celková výtěžnost %	55	87	94	85	85	97

Extrakce 1 ml extrakčního činidla je na základě výsledků nedostatečná. Při druhé extrakci byla výtěžnost retinolu, tokolu, vitamínu D₂, D₃ a α-tokoferolu mezi 15 – 27 %, v dalším extrakčním kroku bylo pouze 3 – 9 % těchto analytů. Celková výtěžnost po třech extrakcích se pohybovala v rozmezí 30 – 70 %. 25(OH)D₃ se bez přidání TCA k deproteinačnímu činidlu nepodařilo objemem 1 mL hexanu vyextrahovat.

Extrakce 2 mL hexanu měla mnohem vyšší výtěžnost už při první extrakci, podařilo se extrahovat i 25(OH)D₃ (výtěžnost 20 %). Výtěžnosti ostatních analytů se pohybovaly mezi 68 – 97 %. Při opakování extrakce měl nejvyšší výtěžnost 25(OH)D₃ (20 a 15 % pro druhou a třetí extrakci). Pro zvýšení výtěžnosti byla vyzkoušena změna polaritý extrakčního činidla.

6.2.2.5. Zvýšení polaritý extrakčního činidla

Na základě předchozích pokusů bylo zvoleno deproteinační činidlo ethanol:acetonitril (v poměru 1:1), které bylo spikováno stejným postupem jak je uvedeno v postupu pro ethanol

- 500 µl ethanol:acetonitril (1:1) + 500 µl séra
- promíchat (vortex cca.10 s)
- deproteinace (- 28°C, 10 minut)
- extrakční činidlo 2 ml (n-hexan,2-propanol), promíchat (vortex cca.5 s)
- přidat 200 µl TCA 0,01 mol/L, promíchat (vortex cca. 10 s)
- 5 min třepání
- centrifugace (10 min, 4°C, 3 220 x g)

- odebrat 1,5 ml organické vrstvy a odpařit v koncentrátoru (45°C) - výsledné plochy násobit 1,33
- odparek rozpustit ve 100 µl methanolu

Tab 31: Testování extrakčního činidla

extrakční činidlo 2 mL	výtěžnost %					
	25(OH)D ₃	retinol	tokol	D ₂	D ₃	α-tokoferol
hexan	0	94	86	82	77	76
hexan: propanol (98:2)	0	104	96	91	90	87
hexan: propanol (96:4)	0	81	95	88	90	67
hexan: propanol (95:5)	0	79	85	82	82	60
hexan: propanol (94:6)	0	102	104	99	100	100
hexan: propanol (92:8)	0	103	101	96	93	97

U všech analytů kromě 25(OH)D₃ bylo tímto postupem dosaženo vysokých výtěžností viz. Tab 31. Pro další extrakce byla zvolena kombinace hexan:2-propanol (94:6). Analyt 25(OH)D₃ u testovaných vzorků nemohl být hodnocen, protože se změnou polaritý extrakčního činidla stanovený pík 25(OH)D₃ obsahoval nečistoty, které falešně zvyšovaly výtěžnost až na několik set procent.

Některé vzorky krevního séra obsahovaly nečistoty, které byly eluovány ve stejný retenční čas jako 25(OH)D₃, proto pro použití výše zmíněného postupu musela být upravena HPLC metoda.

6.3. Porovnání výchozího postupu a LLE

Výchozí postup shrnutí:

- Množství vzorku 250 μ l séra
- Deproteinační činidlo 1000 μ l ethanolu (4 $^{\circ}$ C)
- Vortex 10 s
- Deproteinace 10 minut 4 $^{\circ}$ C
- Centrifugace 4000 x g, 15 minut, (4 $^{\circ}$ C)
- Kolonka Speed C18/18 500 mg/3 ml
- Aktivace a kondicionace 1 ml methanolu promytí 1 ml destilované vody
- Eluce 1,5 ml methanolu a následně 2 ml hexanu
- Vakuová pumpa 1 minuta
- Odpaření eluátu 45 $^{\circ}$ C, 1 hod 30 min
- Rozpouštění odparku 250 μ l methanolu

Celkový čas preanalytické fáze v min. 140 min

Spotřeba použitých činidel v ml 6,75 ml

Hodnoty výtěžnosti SPE extrakce spikovaného lidského séra pro jednotlivé vitaminy byly následující: kalcidiol 66,7 \pm 7,8 %, ergokalciferol 67,4 \pm 4,2 %, cholekalciferol 66,6 \pm 4,1 %, retinol 83,7 \pm 8 %, α -tokoferol 73 \pm 6,9 % [39].

LLE postup shrnutí:

- Množství vzorku 500 μ l séra
- Deproteinační činidlo 500 μ l ethanolu:acetonitril 1:1, (4 $^{\circ}$ C)
- Vortex 10 s
- Deproteinace 10 minut, -28 $^{\circ}$ C
- Extrakce 200 μ l TCA c=0,01mol/L
2 ml hexan:2-propanol (94:6)
- Vortex 10 sec
- Třepání 5 min
- Centrifugace 3220 x g, 10 minut, (4 $^{\circ}$ C)
- Odpaření eluátu 45 $^{\circ}$ C, 12min
- Rozpuštění odparku 100 μ l methanolu

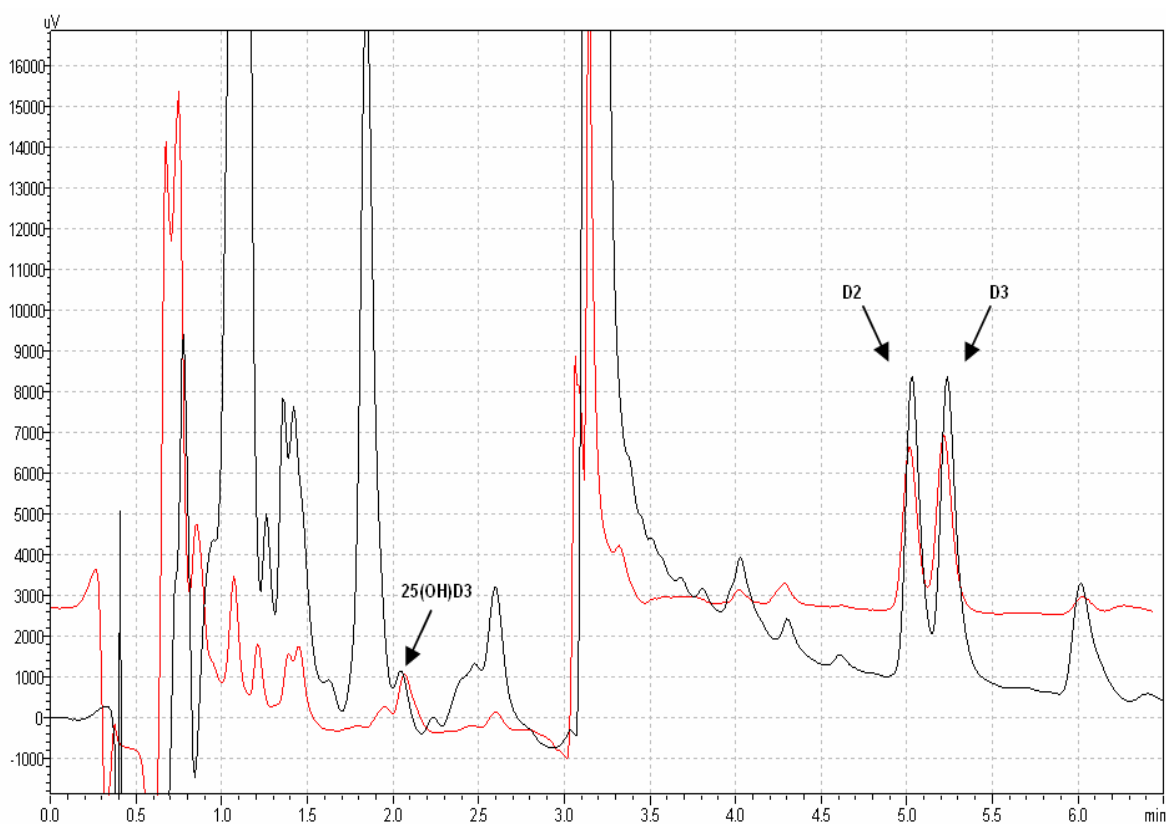
Celkový čas preanalytické fáze v min. 38 min

Spotřeba použitých činidel v ml 2,8 ml

Hodnoty výtěžnosti LLE extrakce spikovaného lidského séra pro jednotlivé vitaminy byly následující: kalcidiol 87 %, ergokalciferol 99 %, cholekalciferol 100 %, retinol 102 %, α -tokoferol 100 %.

Nevýhodou postupu využívajícího LLE byla přítomnost nečistot, které negativně ovlivňovali zejména stanovení kalcidiolu (25-(OH)D₃). Kalcidiol je v séru přítomen pouze ve velmi malých koncentracích (nmol/L) a přítomný pík nečistot po zakoncentrování téměř znemožňoval stanovení cílového analytu. Srovnání chromatogramu měřeného při 264 nm po SPE a LLE extrakci viz Obr 21

Obr 21: Chromatogram HPLC stanovení vitamínů rozpustných v tucích měřeno při 264 nm (červený záznam SPE, černý záznam LLE)



Výchozí postup a nová LLE metoda přípravy vzorku byly porovnány také na základě spotřeby a ceny použitých rozpouštědel viz. Tab 32.

Tab 32: Porovnání spotřeby a ceny rozpouštědel výchozího postupu a LLE

rozpouštědlo	spotřeba rozpouštědel na 100 vzorků (ml)		cena rozpouštědel na 100 vzorků (Kč)	
	výchozí postup (SPE)	LLE	výchozí postup (SPE)	LLE
methanol	275	10	112	4
ethanol	100	25	16	4
acetonitril	0	25	0	73
n-hexan	200	188	60	56
2-propanol	0	12	0	8
celkem	575	260	188	145

Spotřeba rozpouštědel použitých při extrakci na pevnou fázi byla více než dvojnásobná oproti spotřebě při extrakci z kapaliny do kapaliny. Rozdíl v cenách spotřebovaných rozpouštědel (počítáno na 100 vzorků) nebyl významný, cena

rozpouštědel použitých pro LLE byla navýšena použitím acetonitrilu, který pro SPE metodu nebyl použit.

7. Závěr

V diplomové práci byly porovnány dvě extrakční metody (SPE a LLE) a jejich uplatnění pro stanovení cílových analytů vitamínu D₂ (ergokalciferol), D₃ (cholecalciferol), 25-(OH)D₃ (kalcidiol) společně s dalšími vitaminy rozpustnými v tucích retinolem a α-tokoferolem z krevního séra s využitím HPLC. Jako výchozí metoda byl použit postup, který byl vyvinut a částečně zvalidován v rámci diplomové práce: Aplikace SPE a technologie monolitních kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek (Horčíčková 2009). Tento postup byl dále optimalizován za účelem navýšení výtěžnosti extrakce pro cílové analyty 25(OH)D₃, D₂ a D₃ a zkrácení celkového času metody. Výsledkem optimalizace bylo použití směsi deproteinačních činidel ethanol:acetonitril (1:1), které zvýšilo výtěžnost extrakce proti původně používanému 99% ethanolu. Další snížení teploty deproteinace na -28°C a kombinace organických rozpouštědel hexan:2-propanol (94:6) vedlo rovněž ke zlepšení extrakční výtěžnosti pro sledované analyty.

Na základě výsledků optimalizace SPE metody extrakce byl následně vyvinut a optimalizován nový postup extrakce s využitím LLE.

Postup vyvinuté LLE:

Do skleněné bakteriologické zkumavky napipetujeme deproteinační činidlo 500 µl (ethanolu:acetonitril) 1:1, přidáme 500 µl séra a zkumavku uzavřeme víčkem. Promícháme na vortexu 10 vteřin. Deproteinujeme 10 minut při teplotě -28 °C. Po deproteinaci přidáme 200 µl TCA c=0,01mol/L a následně 2 ml směsi hexan:2-propanol (94:6), uzavřeme a opět promícháme na vortexu 10 vteřin. Extrahujeme 5 minut na třepačce. Následuje centrifugace v chlazené centrifuzě (3220 x g, 10 minut, 4 °C). Odebereme 1,5 ml organické vrstvy do skleněné zkumavky a odpaříme v koncentrátoru (45 °C, 12 min). Odparek rozpustíme ve 100 µl methanolu a analyzujeme na HPLC.

Nově vyvinutá extrakční metoda s využitím LLE je ve srovnání s původní SPE metodou extrakce kratší o 100 minut, snížila se spotřeba rozpouštědel a bylo dosaženo vyšší výtěžnosti extrakce pro jednotlivé sledované analyty (kalcidiol 87 %, ergokalciferol 99 %, cholecalciferol 100 %, retinol 102 %, α-tokoferol 100 %). Nevýhodou proti původní metodě SPE je zvýšení spotřeby vzorku z 250 na 500 µl.

Vzhledem k vyššímu obsahu nečistot ve vzorku po LLE musela být následně upravena HPLC metoda.

8. Použitá literatura

[1] Schreiber M. a kolektiv, Funkční somatologie, nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany (1998), stran 467, str: 232-235

[2] Ledvina M. a kolektiv, Biochemie pro studující medicíny 2.díl (kapitola 14-23), nakladatelství Karolinum, Praha (2006), stran 562, str: 537-542

[3] Racek J. a kolektiv, Klinická biochemie, nakladatelství Galén, Praha (2006), stran 329, str: 141-143

[4] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-677-7/pdf/061.pdf
(navštíveno 5.1.2011)

[5] <http://chemikalie.upol.cz/skripta/zcll/OFCh.pdf> (navštíveno 5.1.2011)

[6] Chernecky Cintia C., Berger Barbara J., Laboratory test and diagnostic procedures second edition, W.B.Saunders copany, Philadelphia, 1997

[7] <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/kb-fig65.jpg> (navštíveno 16.9.2010)

[8] <http://www.chromsystems.com/Specifications.145.0.html?&L=1> (navštíveno 28. 4. 2011)

[9] <http://www.chromsystems.com/Chromatogram.146.0.html?&L=1>(navštíveno 1.4. 2011)

[10] <http://www.chromsystems.com/946-Carotene.728.0.html?&L=1> (navštíveno 1.4.2011)

[11] <http://www.chromsystems.com/Chromatogram.109.0.html?&L=1>(navštíveno 1.4.2011)

[12] http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/Chrom/form_vitE.gif (navštíveno 16.9.2010)

[13] Čepová J., Vitamin D, jeho význam a suplementace vitaminem D u pacientů s osteoporózou, Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2.LF UK a FN Motol, Praha (2008)

[14] <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---V/Vitamin-D2.-0iP.htm> (navštíveno 27.9.2010)

[15] <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---V/Vitamin-D3---Cholecalciferol.htm> (navštíveno 27.9.2010)

[16] <http://mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=884> (navštíveno 9.11.2010)

[17] Holick F.M., Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application, Elsevier Inc. 2008

[18] http://www.globalrph.com/labs_v.htm (navštíveno 1.4.2011)

[19] <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/03314847p.pdf> (navštíveno 24.10.2010)

[20] Dusilová Sulková S. Význam vitaminu D a jeho analog v nefrologii, Klinika gerontologická a metabolická, subkatedra nefrologie LF UK a FN Hradec Králové, 2007

<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/syndrom-deficitu-vitaminu-d-teorie-nebo-klinicka-realita-308615>

[21] <http://vitamind.ucr.edu/Images/metab.gif> (navštíveno 2.3.2011)

[22] Cirmanová V. a kolektiv, Renaissance vitamínu D, Endokrinologický ústav Praha, Dětská klinika LF a FN Hradec Králové, Diabetologie metabolismus endokrinologie výživa, Časopis postgraduálního vzdělávání, ročník 13, č. 3, 2010

[23] Lukeš J. a kolektiv, Laboratorní diagnostika onemocnění štítné žlázy, Klinika nukleární medicíny FN Olomouc, Interní medicína pro praxi 2001/3

<http://www.solen.cz/pdfs/int/2001/03/05.pdf> (navštíveno 10.11.2010)

[24] Drahošová M. a kolektiv, Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii, Imunochemické vyšetřovací metody, Radioizotopové metody, Kompetitivní RIA v pevné fázi, vydala Střední zdravotnické škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové (2004), stran: 68, str: 58 <http://www.zshk.cz>

[25] <http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm> (navštíveno 10.11.2010)

[26] <http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bam/08.ppt> (navštíveno 10.11.2010)

[27] <http://www.chromsystems.com/Specifications.1090.0.html?&L=1> (navštíveno 3.4.2011)

[28] <http://www.chromsystems.com/Specifications.733.0.html?&L=1> (navštíveno 3.4.2011)

[29] <http://www.chromsystems.com/Chromatogram.732.0.html?&L=1> (navštíveno 3.4.2011)

[30] www.abbott.cz (navštíveno 3.4.2011)

[31] http://mat.skola-biotechnologie.cz/2007/VIII.workshop/Lecture_2.ppt
(navštíveno 19.8.2010)

[32] Solichová D., Krčmová L., Kašparová M., HPLC stanovení antioxidantů vitamínů A a E v lyofilizovaném séru, materiály k praktickému cvičení z předmětu Vybrané separační metody, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (2007)

[33] Sklenák L., Preparativní a separační metody. Studijní text KFY PŘF OU, Ostrava 2005

<http://artemis.osu.cz/mbf1p/mbf1p.pdf> (navštíveno 15.9.2010)

-
- [34] Solichová D., Centrifugace a ultracentrifugace, materiály k přednášce z předmětu Analýza exogenních látek v biologickém materiálu, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (2008)
- [35] <http://is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=down&did=8932> (navštíveno 20.8.2010)
- [36] <http://biomikro.vscht.cz/isolacebmm/prednaska2.pdf> (navštíveno 20.8.2010)
- [37] Kvasnicová V., Laboratorní metody, letní semestr, http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/kruhy/1_rocnik/kruh_7/metody_letni_semestr.ppt (navštíveno 24.8.2010)
- [38] Klouda P., Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava (2003), stran 123, str: 46-49
- [39] Horčíčková Š., Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, diplomová práce 2009, Aplikace SPE a technologie monolitních kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek.
- [40] Karlíček R. a kolektiv, analytická chemie pro farmaceuty, nakladatelství Karolinum, Praha (2005), stran 281, str: 265-281
- [41] <http://www.appliedseparations.com/SPE/default.asp> (navštíveno 6.8.2010)
- [42] <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=35833> (navštíveno 9.8.2010)
- [43] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> (navštíveno 9.8.2010)
- [44] Šatinský D., Ionově výměnná chromatografie, gelová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie, materiály k přednášce z předmětu Speciální instrumentální metody, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (2009)

[45] Marešová V., Ústav soudního lékařství a toxikologie 1 LF UK, Principy řízených extrakcí nox z biologického materiálu pro různé typy toxikologických analýz, Význam správné přípravy vzorku pro konečný výsledek

<http://www.vfn.cz/Data/files/Toxikologie/Správná%20příprava%20vzorku-VM.ppt>

[46] <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf> (navštíveno 16.9.2010)

[47] Jandera P., Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, HPLC pokroky ve vývoji kolon pro HPLC-současný stav a perspektivy www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc

[48] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M., Chem. Listy 101, 190–199 (2007), Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf

[49] <http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html> (navštíveno 16.9.2010)

[50] <http://www.hplc.cz/Teorie%5Chilic.html> (navštíveno 16.9.2010)

[51] www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm (navštíveno 16.9.2010)

[52] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromatogram.png> (navštíveno 30.8.2010)

[53]

http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf (navštíveno 1.3.2011)

[54] <http://www.forumsci.co.il/HPLC/system.gif> (navštíveno 25.8.2010)

[55] Vlčková A., Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, diplomová práce, Vývoj HPLC metody a stanovení vitamínu D v biologickém materiálu; 2008

[56] Nová A., Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, rigorózní práce, HPLC metoda pro současné stanovení liposolubilních vitamínu A, D, E; 2010

[57] Aksnes L., A simplified high-performance liquid method for determination of vitamin D3, 25-hydroxyvitamin D2 a 25-hydroxyvitamin D3 in human serum, Department of Pediatrics, University of Bergen, Haukeland Hospital, N-5021 Bergen, Norway, 1992

[58] Jones G., Assay of Vitamins D2 and D3 and 25-hydroxyvitamins D2 and D3 in human plasma by High-performance Liquid Chromatography, Clinical chemistry 24/2, 287-298, 1978

[59] Granado-Lorencio F., Herrero-Barbudo C., Blanco-Navarro I., Pérez-Sacristán B., Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D and individual carotenoids), published online april 2010, Springer-Verlag 2010

[60] Fortifications basics http://www.mostproject.org/Updates_Feb05/Stability.pdf (navštíveno 20.3.2011)

[61] Clark S., Youngman L.D., Chukwurah B., Palmer A., Parish S., Peto R., Collins R., Effect of temperature and light on the stability of fat-soluble vitamins in whole blood over several days: implications for epidemiological studies, International Journal of Epidemiology, 2004; 33: 518–525
<http://ije.oxfordjournals.org/content/33/3/518.full.pdf>

[62] Cirmanová V. a kolektiv, Renesance vitamínu D, Endokrinologický ústav Praha, Dětská klinika LF a FN Hradec Králové, Diabetologie metabolismus endokrinologie výživa, Časopis postgraduálního vzdělávání, ročník 13, č. 3, 2010

[63] Hlúbik P., Vitaminy důležitý faktor ovlivňující zdraví 1.část metabolismus liposolubilních vitamínů, Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové, Interní medicína pro praxi 2001/11, <http://www.solen.cz/pdfs/int/2001/11/03.pdf> (navštíveno 10.11.2010)

[64] <http://mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=884> (navštíveno 9.11.2010)