

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Markéta Drastíková (roz. Kašparová)

Školitel: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Název disertační práce: Využití separačních metod v klinickém výzkumu

Předkládaná práce se zabývá vývojem a validací chromatografického stanovení liposolubilních vitamínů a optimalizací vhodných postupů přípravy biologického materiálu.

V první části je řešena problematika stanovení vitamínů D, A a E v séru. Pro separaci analytů byly vyvinuty postupně dvě metody. 1) Separace na monolitních kolonách – byly použity dvě sériově zapojené monolitní kolony Chromolith Performance RP-18e, 100×4,6 mm a SpeedRod RP-18e, 50×4,6 mm. Vitamíny 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃, retinol, tokol (vnitřní standard), cholekalciferol, ergokalciferol a α-tokoferol byly separovány během 6,5 minuty. Extrémně rychlá změna složení i průtoku mobilní fáze byla zajištěna skokovým gradientem. Takto byla maximálně využita velmi rychlá ekvibrace monolitních kolon. 2) Separace na koloně s částicemi s pevným jádrem – kolona Ascentis Express RP-Amide 75×3,0 mm. Pro rychlou separaci byla použita gradientová eluce. Stanovení retinolu, 25(OH)D₂, 25(OH)D₃, tokolu (vnitřní standard) a α-tokoferolu po optimalizaci separace nečistot přítomných ve vzorku trvalo 8,5 minuty. Při výběru vhodné přípravy vzorku byly porovnávány postupy extrakce na pevnou fázi (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), které byly vyvinuty. Jako vhodnější byl zvolen LLE postup, který optimalizoval uvolnění analytů z proteinových nosičů. Přídavkem EDTA ke vzorku před deproteinací a okyselením extrakčního prostředí kyselinou trichloroctovou bylo dosaženo výtěžností stanovovaných vitamínů mezi 98–109 %. Celý postup přípravy vzorku trvá méně než 45 minut.

Druhá část práce je věnována vývoji postupu přípravy vzorku pro stanovení retinolu a α-tokoferolu v mateřském mléce. Také v tomto případě byla zvolena LLE. Postup zahrnující deproteinaci, saponifikaci a samotnou extrakci byl validován podle požadavků FDA. Výtěžnost retinolu se na třech koncentračních hladinách pohybovala mezi 82–90 %, α-tokoferolu 92–109 %. Metoda byla aplikována na vzorky mateřského mléka. Ze závěrů statistického hodnocení vyplývá, že koncentrace retinolu v průběhu laktace statisticky významně klesá na hladině významnosti 5%.