

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Moderní separační techniky pro analýzu
biologického materiálu v klinickém výzkumu**

Disertační práce

2017

Mgr. Eva Kasalová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a školiteli specialistovi doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D. za odborné vedení po dobu mého postgraduálního studia, za poskytování cenných rad a zkušeností, za inspiraci a připomínky jak při tvůrčí praktické práci, tak při psaní odborných publikací.

Velké poděkování patří též doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. a PharmDr. Janě Aufartové, Ph.D. za pomoc a cenné rady během celého studia. Také děkuji prof. MUDr. Luboši Sobotkovi, CSc., prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, CSc. a celému kolektivu Výzkumné laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky za možnost pracovat v jejich laboratoři na velmi zajímavých projektech a získat tak mnoho dalších zkušeností.

Děkuji všem členům katedry za vstřícnost, trpělivost, ochotu a příjemné pracovní prostředí. Velice děkuji RNDr. Barboře Honegrové, Ph.D., RNDr. Jiřímu Plíškovi, Ph.D., Mgr. Barboře Červinkové a Mgr. Lence Javorské za spolupráci, za kamarádský přístup a příjemné chvíle, které jsme spolu strávili v laboratoři i mimo ni.

Také děkuji grantovým agenturám za finanční podporu a možnosti prezentace výsledků práce na mezinárodních konferencích. Práce byla podpořena grantem Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 267 002, Ministerstvem školství České Republiky (FRVŠ), Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví České Republiky a evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.

Na závěr děkuji také celé mé rodině a hlavně manželovi za trpělivost, každodenní podporu během celého studia a povzbuzování k dokončení postgraduálního studia.

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 jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Mgr. Eva Kasalová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Eva Kasalová

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Školitel specialista: doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.

Název disertační práce: Moderní separační techniky pro analýzu biologického materiálu v klinickém výzkumu

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem chromatografického stanovení lipofilních vitaminů a úpravou vzorku biologického materiálu před vlastní analýzou. Klinické monitorování hladin těchto vitaminů, zvláště pak vitaminu D, v různých biologických matricích je v posledním desetiletí velmi diskutovaným tématem.

V teoretické části této disertační práce jsou charakterizovány cílové analyty – vitaminy A, E, D s jejich biologickou aktivitou – dále pak biologický materiál používaný ve Výzkumné laboratoři, zvláště pak podrobný popis složení mateřského mléka, jeho nezastupitelná role ve výživě novorozenců a zpracování mateřského mléka v mléčné bance. Na tuto část navazuje obsáhlá kapitola věnující se úpravě biologické matrice před analýzou. Jsou zde popsány nejčastěji používané techniky úpravy vzorku, jako jsou extrakční metody, velká pozornost je věnována novým trendům v těchto metodách, které se rozvíjejí v posledních letech. Teoretickou část uzavírá problematika analytického stanovení pomocí separačních chromatografických metod s důrazem na HPLC a UHPLC.

Důležitou součástí této disertační práce je vypracovaná rešeršní publikace zabývající se stanovením vitaminu D a jeho metabolitů v mateřském a kravském mléce. Jsou zde diskutovány okruhy od významu vitaminu D a jeho metabolismu přes preanalytické úpravy mléka až k analytickému stanovení s využitím moderních instrumentálních technik.

Experimentální část je rozdělena do dvou tématických okruhů. První okruh se zabývá úpravou biologické matrice - sérum a mateřské mléko - a vývojem chromatografických metod. Jako první je popsána vyvinutá a publikovaná UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení 25-hydroxy derivátů vitaminu D v lidském séru s jednoduchou

úpravou vzorku vhodnou k rutinnímu využití. Druhá metoda se zabývá vývojem vhodného extrakčního postupu vitamínu D z mateřského mléka k následné chromatografické analýze s MS detekcí.

Další část disertační práce se věnuje analytickému stanovení lipofilních vitaminů A, E, D, zánětlivých markerů neopterinu, kynureninu, tryptofanu a jejich aplikacím v medicíně. Je zde komentována studie prováděná ve spolupráci s Tkáňovou bankou, kdy byla sledována stabilita retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce během pasterizace a skladování. Další studie se věnují změnám antioxidační kapacity při léčbě věkem podmíněné makulární degenerace a familiární hypercholesterolemie. Posledním okruhem je studium neopterinu jako prediktivního markeru u onkologicky nemocných pacientů ve spolupráci s FN Olomouc.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Eva Kasalová

Supervisor: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Supervisor specialist: Assoc. Prof. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Modern separation techniques for the analysis of biological material in clinical research

This doctoral thesis deals with development and validation of a chromatographic determination of liposoluble vitamins and with optimization of biological materials preparation. Clinical monitoring of these vitamins, especially vitamin D in different biological materials is one of the most discuss theme in the last decade.

In the theoretical part of this dissertation the target analytes - vitamins A, E and D with their biological activity are characterized - as well as the biological material used in the Research Laboratory, especially a detailed description of the composition of breast milk, its irreplaceable role in neonatal nutrition and description of breast milk processing in Milk Bank. This part is followed by a comprehensive chapter dealing with the treatment of the biological matrix before analysis. The most commonly used sample pretreatment techniques such as extraction methods are described here, with a great description of new trends in these methods that have been developing in recent years. The theoretical part concludes analytical determination using separation chromatographic methods with emphasis on HPLC and UHPLC.

An important part of this dissertation is a review publication dealing with the determination of vitamin D and its metabolites in human breast and cows' milk. There are discussed circuits from importance of vitamin D and its metabolism through pretreatment of milk to analytical determination using modern instrumental techniques, including the combination of ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass detection.

The experimental part is divided into two thematic areas. The first part deals with the preparation of the biological matrix - serum and human milk - and the development of chromatographic methods. The developed and published UHPLC-MS/MS method for the determination of 25-hydroxy derivatives of vitamin D in human serum with a simple

sample preparation suitable for routine use is described herein. The second method deals with the development of a suitable extraction procedure of vitamin D from human milk to subsequent chromatographic analysis with MS detection.

Another part of the dissertation deals with analytical determination of lipophilic vitamins A, E, D and inflammatory markers of neopterin, kynurenin, tryptophan and their applications in medicine. A study conducted in collaboration with Tissue Bank, where the stability of retinol and α -tocopherol in human milk during pasteurization and storage was monitored. Further studies address changes in antioxidant capacity in the treatment of age-related macular degeneration and familial hypercholesterolaemia. The last round is the study of neopterin as a predictive marker in oncological patients in cooperation with Teaching Hospital Olomouc.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (age-related macular degeneration)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
API	ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
BEH	hybridní technologie silikagelu a polymeru (bridged ethyl hybrid)
C8	oktyl, řetězec obsahující 18 atomů uhlíku
C18	oktadecyl, řetězec obsahující 18 atomů uhlíku
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CFME	mikroextrakce kontinuálního toku (continuous-flow microextraction)
CI	chemická ionizace (chemical ionization)
CPBA	analýza kompetitivní vazby na proteiny (competitive protein binding assay)
DAD	detektor diodového pole (diode array detector)
DBP	vitamin D vázající protein (vitamin D binding protein)
DI-SDME	mikroextrakce jednou kapkou pomocí přímého ponoření (direct immersion single drop microextraction)
DLLME	disperzní extrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid liquid microextraction)
DMEQ-TAD	4-[2-(3,4 –dihydro-6,7-dimethoxy-4–metyl-3-oxo-2quinoxaliny]etyl]
DPX	extrakce pomocí naplněných špiček pipet (disposable pipette tip extraction)
DSDME	mikroextrakce na přímo suspendované kapce (directly-suspended droplet microextraction)
EIA	enzymová imunoanalýza (enzyme immunoassay)
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immuno sorbent assay)
EME	elektromembránová extrakce (electrokinetic membrane extraction)
EMEA	European Medicines Agency

ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HF-LPME	mikroextrakce do kapalné fáze s využitím dutého vlákna (hollow-fiber liquid phase microextraction)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HS-SDME	mikroextrakce jednou kapkou pomocí head space (head space single drop microextrakcion)
ICR	iontová cyklotronová rezonance (ion cyklotrone resonance)
IL-1	interleukin 1
IT	iontová past (ion trap)
IU	mezinárodní jednotka (international unit)
KOH	hydroxid draselný
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LDL	lipoprotein nízké hustoty (low density lipoprotein)
LLE	extrakce kapalina- kapalina (liquid- liquid extraction)
LLLME	mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (liquid liquid liquid microextraction)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization)
MEPS	mikroextrakce tuhým sorbetem (microextraction by packed sorbent)
MIP	molekulárně vtištěné polymery (molecular imprinted polymer)
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spektrometry)
NIST	National Institute of Standards and Technology
PA	polyakrylát

Pa-EME	paralelní extrakce pomocí elektromembrány (parallel electromembrane extraction)
PDMS	polydimetylsiloxan
PEEK	polyetheretherketon
PDMS-DVB	polydimetylsiloxan-divinylbenzen
PP	sražení proteinů (protein precipitation)
PTAD	4-fenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion
Q	kvadrupól (quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól (triple quadrupole)
RAM	materiál s omezeným přístupem (restricted access material)
RCF	relativní odstředivá síla (relative centrifugal force)
RIA	radioimunoanalýza (radioimmunoassay)
RPM	počet otáček za minutu (rotation per minute)
RSD	relativní směrodatná odchylka
SBSE	sorpční extrakce míchadlem (stir bar sorptive extraction)
SDME	mikroextrakce jednou kapkou (single drop microextraction)
SIM	monitorování vybraného iontu (single ion monitoring)
SLM	kapalná membrána (supported liquid membrane)
SPE	extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction)
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi (solid phase microextraction)
SRM	standardní referenční materiál (standard reference material)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
UV/VIS	ultrafialová – viditelná oblast světla
25-OH D ₂	25-hydroxycholecalciferol
25-OH D ₃	25-hydroxyergocalciferol

1. OBSAH

1. OBSAH	11
2. ÚVOD	15
3. CÍL PRÁCE	16
4. TEORETICKÁ ČÁST	17
4.1. STANOVOVANÉ ANALYTY - VITAMINY	17
4.1.1. Vitamin A	17
4.1.1.1. Metabolismus vitaminu A	18
4.1.1.2. Funkce vitaminu A v těle	19
4.1.2. Vitamin D	21
4.1.2.1. Metabolismus vitaminu D	23
4.1.2.2. Funkce vitaminu D v těle	24
4.1.3. Vitamin E	25
4.1.3.1. Metabolismus vitaminu E	27
4.1.3.2. Funkce vitaminu E v těle	28
4.2. BIOLOGICKÝ MATERIÁL	29
4.2.1. Mateřské mléko	29
4.2.1.1. Složení mateřského mléka	30
4.2.1.2. Odběr a transport mateřského mléka	32
4.2.1.3. Mléčné banky	32
4.2.1.4. Pasterizace mateřského mléka v Mléčné bance ve Fakultní nemocnici Hradec Králové	33
4.2.2. Krev	34
4.2.2.1. Odběr a transport	34
4.2.3. Moč	35
4.2.3.1. Odběr a transport	35
4.3. METODY ÚPRAVY BIOLOGICKÉHO VZORKU K ANALÝZE	36
4.3.1. Precipitace	37
4.3.2. Centrifugace	38
4.3.2.1. Typy centrifug	40
4.3.2.2. Typy rotorů	41
4.3.2.3. Způsoby centrifugace	43
4.3.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)	46
4.3.4. Mikroextrakce kapalnou fází (LLME)	49

4.3.4.1.	Mikroextrakce jedinou kapkou (SDME, Single-drop microextraction)-----	49
4.3.4.2.	Mikroextrakce do kapalné fáze s využitím dutého vlákna (HF-LPME, hollow fibre liquid phase microextraction)-----	54
4.3.4.3.	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME, Dispersive liquid-liquid microextraction)-----	55
4.3.4.4.	Elektromembránová extrakce (EME, Electromembrane extraction)-----	56
4.3.4.5.	Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází (SLE, supported liquid extraction)-----	57
4.3.5.	Extrakce na pevné fázi (SPE)-----	58
4.3.5.1.	Moderní přístupy SPE-----	60
4.3.6.	Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)-----	62
4.3.6.1.	Fiber SPME-----	62
4.3.6.2.	In-tube SPME-----	64
4.3.7.	Mikroextrakce tuhým sorbentem umístěným v mikrostřikačce (MEPS, microextraction by packed sorbent)-----	64
4.3.8.	Sorpční extrakce míchadlem (SBSE, stir bar sorptive extraction)-----	66
4.3.9.	Extrakce pomocí naplněných špiček pipet (DPX, disposable pipette tip extraction)-----	67
4.4.	CHROMATOGRAFICKÉ METODY-----	68
4.4.1.	Historie chromatografie-----	68
4.4.2.	Rozdělení chromatografických metod-----	69
4.4.3.	Instrumentace kapalinové chromatografie-----	71
4.4.4.	Stacionární fáze-----	72
4.4.4.1.	Účinnost chromatografické kolony-----	72
4.4.4.2.	Částicové kolony-----	74
4.4.4.3.	Kolony s povrchově porézními částicemi-----	75
4.4.4.4.	Monolitické kolony-----	77
4.4.5.	Detektory používané v HPLC-----	80
4.4.5.1.	Spektrofotometrické detektory-----	81
4.4.5.2.	Fluorescenční detektory-----	82
4.4.5.3.	Elektrochemické detektory-----	82
4.4.5.4.	Refraktometrické detektory-----	83
4.4.5.5.	Detektor nabitého aerosolu – CAD-----	83
4.4.5.6.	Odpařovací detektor rozptylu světla – ELSD-----	83
4.4.5.7.	Hmotnostně-spektrometrický detektor - MS-----	84
4.4.6.	Spojení LC s MS detekcí-----	88
4.4.7.	Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC)-----	88
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST-----	90

5.1. STANOVENÍ VITAMINU 25-OH D₃ A 25-OH D₂ POMOCÍ UHPLC MS/MS S VYUŽITÍM STANDARDNÍHO REFERENČNÍHO MATERIÁLU NIST SRM 972	90
5.1.1. Úvod	90
5.1.2. Přístrojové vybavení a chemikálie	91
5.1.2.1. Laboratorní vybavení	91
5.1.2.2. Použité chemikálie	93
5.1.3. Úprava séra před analýzou	93
5.1.4. Podmínky analýzy	93
5.1.5. Vývoj metody	94
5.1.6. Validace metody	95
5.1.7. Využití metody	97
5.1.7.1. Sběr patientských vzorků	97
5.1.7.2. Statistické vyhodnocení	97
5.1.7.3. Výsledky a diskuze	98
5.1.8. Závěr	99
5.2. STANOVENÍ 25-HYDROXYDERIVÁTŮ VITAMINU D V MATEŘSKÉM MLÉČE	100
5.2.1. Úvod	100
5.2.2. Použité chemikálie	100
5.2.3. Chromatografická metoda	101
5.2.4. Vývoj postupu pro přípravu vzorku	102
5.2.4.1. Optimalizace deproteinace	102
5.2.4.2. Optimalizace saponifikačního procesu	102
5.2.4.3. Optimalizace LLE	103
5.2.5. Závěr	104
5.3. STANOVENÍ VITAMINU D V MLÉČE – PŘEHLED	105
5.3.1. Úvod	105
5.3.2. Úprava vzorku mléka před analýzou	106
5.3.2.1. Extrakce do kapaliny (LLE)	106
5.3.2.2. Extrakce na tuhé fázi (SPE)	107
5.3.2.3. Přímá extrakce	108
5.3.3. Analytické metody	108
5.3.3.1. HPLC – normální fáze	108
5.3.3.2. HPLC – reverzní fáze	109
5.3.3.3. LC-UV	109
5.3.3.4. LC-MS	110
5.3.4. Závěr	111
5.4. VLIV PASTERIZACE A NÁSLEDNÉHO SKLADOVÁNÍ NA HLADINY RETINOLU A ALFA-TOKOFEROLU V MATEŘSKÉM MLÉČE	112

5.4.1.	Úvod	112
5.4.2.	Sběr vzorků a pasterizace	113
5.4.3.	Přístrojové vybavení a chemikálie	114
5.4.3.1.	Laboratorní vybavení	114
5.4.3.2.	Použité chemikálie	114
5.4.4.	Analýza vitaminů	115
5.4.4.1.	Statistické vyhodnocení	116
5.4.5.	Výsledky a diskuze	116
5.4.6.	Závěr	121
5.5.	ZMĚNY KREVNÍCH ANTIOXIDANTŮ BĚHEM LÉČBY VĚKEM PODMÍNĚNÉ MAKULÁRNÍ DEGENERACE RHEOHEMAFERÉZOU	122
5.6.	VLIV LDL-AFERÉZY A RHEOHEMAFERÉZY NA VITAMIN E	126
5.7.	PROGNOSTICKÝ VÝZNAM KONCENTRACE NEOPTERINU V SÉRU A MOČI U PACIENTŮ S KARCINOMEM REKTA LÉČENÝCH CHEMORADIACÍ	130
6.	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ A PŘÍSPĚVKŮ	132
6.1.	PUBLIKOVANÉ PRÁCE	132
6.2.	PŘEDNÁŠKY A POSTERY PREZENTOVANÉ NA KONFERENCÍCH	133
6.2.1.	PŘEDNÁŠKY	133
6.2.2.	POSTERY	134
6.3.	ŘEŠENÉ GRANTY	136
7.	ZÁVĚR	137
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	139
9.	PŘÍLOHY	151
9.1.	PŘÍLOHA I	151
9.2.	PŘÍLOHA II	159
9.3.	PŘÍLOHA III	173
9.4.	PŘÍLOHA IV	181
9.5.	PŘÍLOHA V	190
9.6.	PŘÍLOHA VI	197

2. ÚVOD

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické látky, které jsou nezbytné pro normální růst, vývoj a metabolismus lidského těla. Lidské tělo si je syntetizuje jen v omezené míře, proto je musí přijímat v potravě. Stanovení těchto látek je v biologickém materiálu (sérum, mateřské mléko, lipoproteinové vrstvy) složité, protože jejich koncentrace je často velice nízká. Důležitou roli zde hraje úprava vzorku před analýzou a následná kvantifikace pomocí vhodné instrumentální metody.

Zvýšený zájem o tyto látky zvyšuje i počty jejich stanovení jak v laboratořích rutinních, tak výzkumných. Aby bylo možné splnit všechny požadavky na jejich vyšetření, je potřeba použít vhodnou analytickou metodu. Velký důraz je kladen na délku analýzy, zpracování velkých sérií vzorků a v neposlední řadě také na citlivost metody. Nejvíce se rozvíjející instrumentální technikou se v posledních letech stala vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je nejrozšířenější separační technikou v klinickém výzkumu a stále širší uplatnění nachází i v rutinních laboratořích. Jako detektor se nejčastěji používá detektor diodového pole, který je v mnoha laboratořích nahrazen citlivějším a selektivnějším hmotnostním spektrometrem.

Protože biologická matrice je velice složitá a obsahuje mnoho balastních látek, je důležitá úprava vzorku před vlastní analýzou. Tento krok je časově nejnáročnější, zaujímá asi 70% času z celkové doby analýzy. Vedle stále používaných klasických extrakčních metod jako je extrakce na pevné fázi (SPE) nebo extrakce kapalina-kapalina (LLE) jsou dnes v popředí zájmu mikroextrakční techniky založené na LLE a SPE. U těchto miniaturizovaných technik je kladen velký důraz na zkrácení doby, snížení spotřeby organických rozpouštědel a tím snížení zatížení životního prostředí, použití co nejmenšího objemu vzorku a omezení manipulace s biologickým materiálem.

3. CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce byl vývoj, optimalizace a validace chromatografických metod pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek v biologickém materiálu, zejména v séru a v mateřském mléce. Nedílnou součástí metod byl vývoj a optimalizace technik přípravy vzorku před samotným stanovením. Požadavky na vývoj nových moderních chromatografických metod vhodných pro klinický výzkum vycházejí nejen z Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Výzkumná laboratoř spolupracuje také s klinickými pracovišti a s odborníky z jiných nemocnic v České republice jako např. s Onkologickou klinikou ve Fakultní nemocnici Olomouc.

Jedním z cílů bylo podat přehled a základní informace o používaných technikách přípravy vzorku mateřského mléka k analýze vitamínu D a jeho metabolitů. Klíčovou roli ve stanovení hladin tohoto vitamínu hraje chromatografická detekce ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Další cílem mé disertační práce byl vývoj a validace metod vhodných pro stanovení 25-hydroxy vitamínu D₃ a 25-hydroxy vitamínu D₂ v lidském séru a mateřském mléce pomocí UHPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií s vhodným extrakčním postupem k úpravě biologické matrice. Dalším úkolem bylo zjistit vliv Holderovy pasterizace a skladování na hladiny vitamínů A a E v mateřském mléce.

Posledním, důležitým úkolem během mého doktorského studia, bylo využití analytických metod pro řešení výzkumných grantů ve spolupráci s dalšími pracovišti Fakultní nemocnice Hradec Králové a Fakultní nemocnice Olomouc. Jednalo se zejména o stanovení lipofilních vitamínů A, E a D v séru, lipoproteinových vrstvách a membráně erytrocytů a zánětlivých markerů v séru a v moči u pacientů s familiární hypercholesterolémií, věkem podmíněnou makulární degenerací a u onkologických pacientů.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. STANOVOVANÉ ANALYTY - VITAMINY

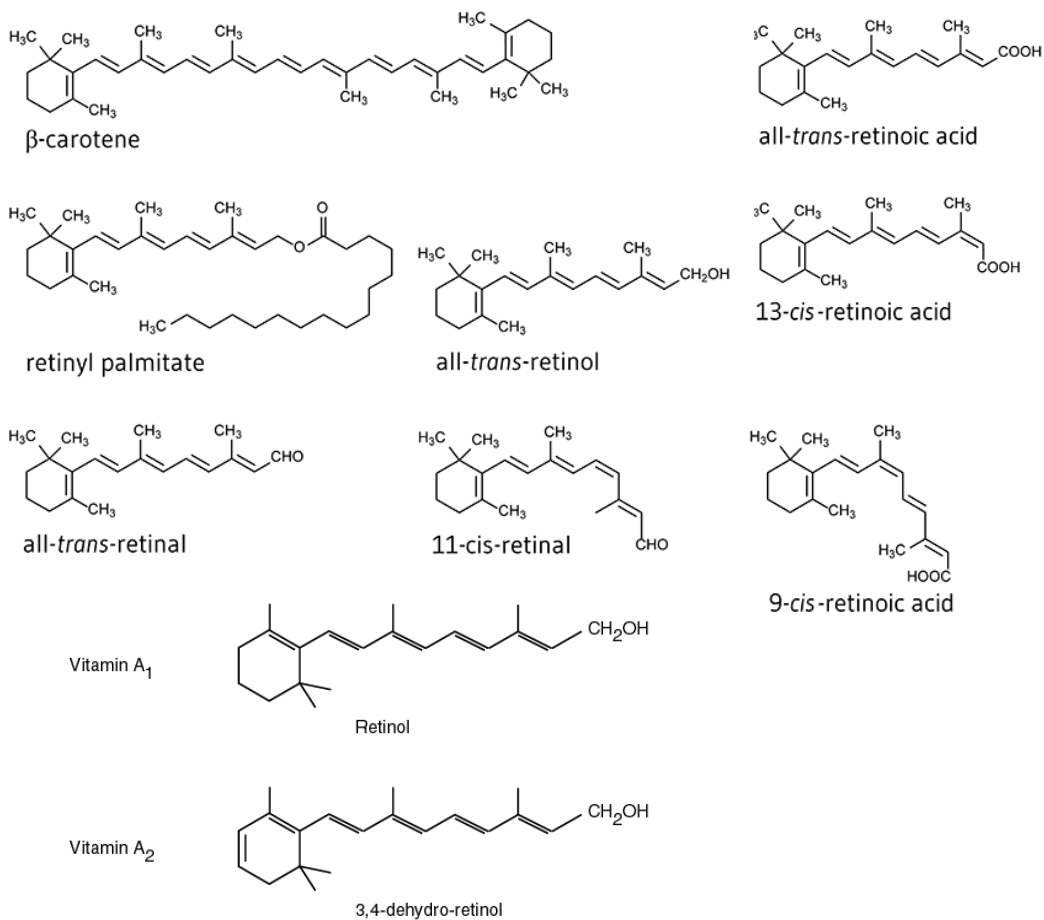
Vitaminy jsou skupina nízkomolekulárních organických látek, které jsou nezbytné pro normální růst, vývoj a metabolismus lidského těla. Lidské tělo si je neumí samo syntetizovat (většinu z nich), proto je musíme přijímat v potravě. Bylo identifikováno 13 vitamínů, které dělíme na základě jejich rozpustnosti do dvou základních skupin:

- vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K)
- vitaminy rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B a vitamin C) [1]

Některé vitaminy se do těla dostávají ve formě prekurzorových molekul – provitaminů. Tyto látky nevykazují biologickou aktivitu, ale v organismu se přeměňují na molekuly vitamínů např. β -karoten, provitamin vitaminu A. Téměř všechny vitaminy tvoří skupiny chemicky podobných sloučenin (vitamery) sdílející podobné biologické účinky. Ačkoliv mají vitaminy mnoho vlastností společných, určité funkce mají odlišné. Některé vitaminy fungují jako enzymový kofaktor (vitamin A, K atd.), některé jako antioxidant (vitamin E, C), jiné fungují jako kofaktor v oxidačně-redukčních reakcích (vitamin E, K atd.) a některé mají funkci hormonů (vitamin D, A) [2].

4.1.1. Vitamin A

Vitamin A se vyskytuje v několika různých formách pocházející buď z rostlinných nebo živočišných zdrojů. Z rostlinných zdrojů pocházejí karotenoidy (provitamin beta-karoten), kde jsou syntetizovány jako barevné pigmenty. Provitaminy karotenoidů nacházíme hlavně v tmavě zelené a žluto-oranžové zelenině jako je paprika, mrkev, rajčata, špenát a v oranžovém ovoci jako jsou meruňky a broskve. Retinoidy jsou uchovávány v živočišných tkáních jako jsou játra a ledviny a produktech (mléko, vajíčka). Aktivní retinoidy se vyskytují přirozeně ve třech formách jako alkohol – retinol, jako aldehyd – retinal a jako kyselina – retinová kyselina (obr.1). Základní strukturou je šestičlenný beta iononový kruh s postranním isoprenoidním řetězcem složeným ze dvou jednotek. Podle počtu dvojných vazeb v šestičlenném kruhu rozlišujeme vitamin A₁ a A₂ (dehydrogenovaný beta iononový kruh) (obr.1). Vzhledem k postrannímu řetězci, který obsahuje čtyři dvojně vazby mohou vytvářet příslušné cis a trans izomery [2].

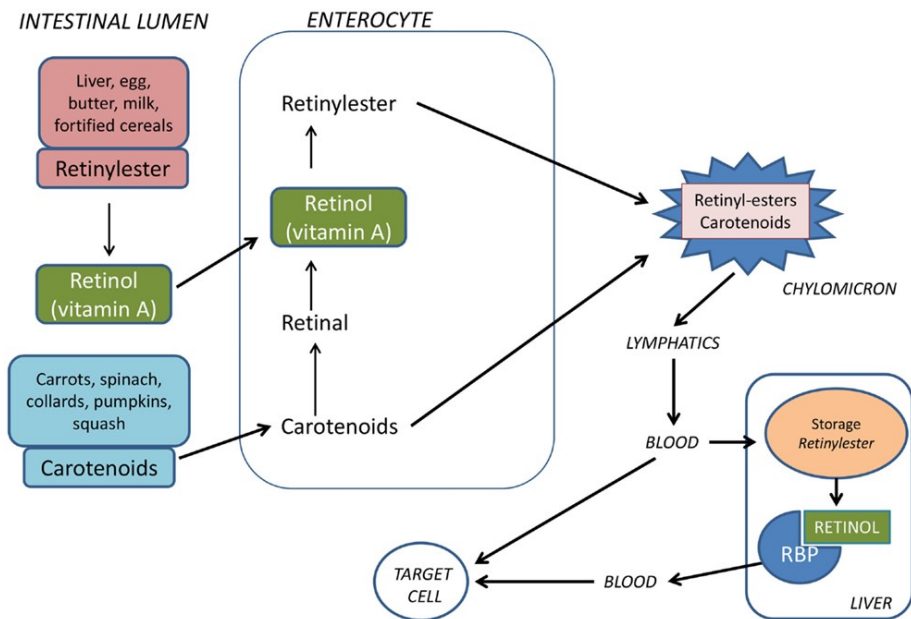


Obr.1: Chemické struktury vitamínu A a jeho derivátů [1]

4.1.1.1. Metabolismus vitamínu A

Většina vitamínu A v potravě je přijímána ve formě retinolu, retinyl esteru nebo karotenoidů. Tenké střevo je první tkání v těle, kde dochází k přeměně karotenoidů na retinoidy a hydrolyzaci retinyl esteru na retinol. V buňkách tenkého střeva poté dochází reakci retinolu s mastnými a žlučovými kyselinami za vzniku esterů, které jsou poté inkorporovány do chylomikronů. Tato esterifikace je vyžadována kvůli hydrofóbním vlastnostem vitamínu A. Chylomikrony jsou z enterocytů transportovány přes střevní lymfatické uzliny do krevního řečiště a dále do jater, kde dochází k jeho metabolizaci a akumulaci. Lipocyty jaterních buněk obsahují více než 90% zásob jaterního retinolu a retinyl esteru. V krvi je retinol transportován ve vazbě na plazmatický retinol vázající protein (RBP, retinol binding protein) a transtyreтин (TTR). Retinol-RBP-TTR komplex je

hlavní transportní molekula, která dodává retinol periferním tkáním v období nalačno. V cílových buňkách podstoupí retinol další biotransformační procesy, kterými je přeměněn na aktivní formy vitamínu - retinal a retinovou kyselinu (Obr.2). Lidské sérum obsahuje jako hlavní komponenty β -karoten, α -karoten, lykopen, kryptoxanthin a lutein, s menšími koncentracemi zeaxanthinu a jiné xantofyly a polyeny, které jsou všechny získané ze stravy [1-3].



Obr.2: Metabolismus vitamínu A v těle [4]

4.1.1.2. Funkce vitamínu A v těle

Vitamin A je nenahraditelnou a důležitou složkou těla účastnící se na mnoha biologických pochodech. Důležitou funkci tvoří v mechanismu vidění, kde derivát vitamínu A, 11-cis-retinal tvoří rhodopsin, společně s proteinem opsin. Vitamin A není důležitý jen pro vidění, ale také pro růst, vývoj plodu a diferenciaci tkání. Četné další funkce vitamínu A mají systémový charakter a ovlivňují metabolické funkce epitelálních buněk a to jak kůže, kde nedostatek vitamínu A ovlivňuje termální vývoj keratinocytů, tak dýchacích cest a gastrointestinálního aparátu. Kyselina retinová významně ovlivňuje funkci epitelálních buněk četných endokrinních žláz, např. hypofýzy, štítné žlázy a gonád.

Další důležitou funkcí vitamínu A je regulace syntézy důležitých bílkovin, včetně signálních. Vitamin A má také imunostimulační efekt a jeho nedostatek vede k snížení imunitní odpovědi, potlačení buněčné imunity a tím ke zvýšení rizika infekce.

Antioxidační vlastnosti vitamínu A jsou relativně slabé, přesto významné. Působí mechanismem zhášedče (quencher) singletového kyslíku, který není přímo volný radikál, ale je velmi reaktivní oxidant vznikající peroxidací lipidů. Všechny formy vitamínu A dokážou převzít jeho energii bez chemické změny a vrátit excitovaný kyslík do jeho původního stavu. [1, 2, 5, 6].

Vysoké dávky retinolu jsou teratogenní, způsobují kraniofaciální anomálie plodu, nedoporučuje se proto těhotným ženám překračovat nejvyšší tolerovatelnou hranici (UL) retinolu pro těhotné 2800–3000 $\mu\text{g}/\text{den}$. Karotenoidy nemají teratogenní účinek, proto je jejich použití v těhotenství bezpečné.

Pro standardizaci aktivity vitamínu A z různých dietárních zdrojů se vitamin A vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (UI či IU), nebo nověji v retinolových jednotkách (RE) uvedených v tab.1.

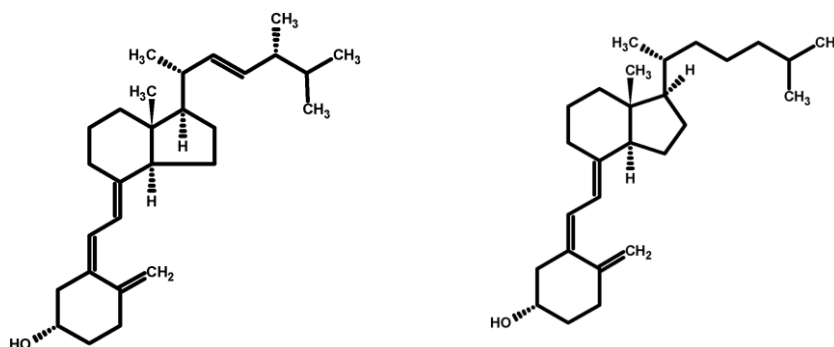
Tab.1: Aktivita vitamínu A vyjádřena mezinárodní jednotkou a retinolovým ekvivalentem [4]

1 mezinárodní jednotka (IU – international unit)	= 0,3 mg retinol = 0,344 mg retinyl acetate = 0,6 mg beta-karoten = 1,2 mg provitamin A – karotenoid
1 retinolový ekvivalent (RE)	= 1 mg retinol = 6 mg beta-karoten = 12 mg provitamin A - karotenoid

Doporučená denní dávka vitamínu A pro ČR je 800 μg (dle vyhl. 450/2004 Sb.). Doporučené denní dávky vitamínu A jsou pro dospělého muže 900 μg RE, 700 μg RE pro dospělé ženy a pro kojící ženy 1200 μg RE [7]. Doporučený denní příjem pro kojence a děti do 6-ti měsíců je 400 μg / 1,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ za den. Mateřské mléko obsahuje přibližně 1,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ retinolu, kojení zajišťuje optimální příjem vitamínu A pro správný růst a vývoj dítěte [8].

4.1.2. Vitamin D

Vitamin D, také známý jako sluneční vitamin, je hormonový prekurzor se steroidním skeletem. Vyskytuje se ve dvou formách – ergokalciferol, nazývaný též vitamin D₂ a cholekalciferol, nazývaný vitamin D₃. Ergokalciferol spolu se svým provitaminem ergosterolem se přirozeně vyskytují v rostlinách, houbách, plísních a v některých mikroorganismech. Cholekalciferol a jeho provitamin, 7-dehydrocholesterol, se nalézají u lidí a zvířat. Jejich koncentrace závisí na obsahu vitamínu D v potravě a délce pobytu na slunečním svitu. Obě formy vitamínu D se navzájem liší pouze postranními řetězci, kdy deriváty vitamínu D₂ obsahují 9 uhlíků a jednu dvojnou vazbu mezi C22-C23, deriváty vitamínu D₃ obsahují 8 uhlíků a žádnou dvojnou vazbu. Účinky těchto dvou vitamínů jsou v lidském těle téměř stejné, a proto se často mluví o vitamínu D bez bližšího upřesnění [2,9].



Obr.3: Chemické struktury vitamínu D₂ a D₃ [10]

Cholekalciferol se dostává do organismu dvěma způsoby. Vzniká fotochemicky ze 7-dehydrocholesterolu v kůži po ozáření UV světlem. Další možností příjmu cholekalciferolu je alimentární cesta, kdy se tento vitamin nachází v živočišných i rostlinných produktech (obr.4). Nejbohatším přírodním zdrojem vitamínu D jsou rybí játra a oleje z těchto jater. Cenným zdrojem je také maso tučných ryb (např. makrela, sled, losos). V mnohem menší míře se také nachází v hovězím a vepřovém mase, ve vnitřnostech, v mléku a mléčných výrobcích a vejcích. Mezi rostlinné zdroje patří hlavně kokosové máslo, houby, zelí, špenát a obiloviny. Vzhledem k nízké koncentraci vitamínu D v potravinách je doporučováno obohacovat běžně používané potraviny jako jsou obilné produkty, mléko, mléčné produkty a dětská výživa vitamínem D [2,11].



Obr.4: Zdroje vitamínu D [12]

Mateřské mléko obsahuje nedostatečné množství vitamínu D. Nachází se v něm asi třetinová koncentrace vitamínu D než je sérová koncentrace v těle matky a stokrát méně 25-OH-D než je v krvi matky. Proto je doporučováno podávat vitamin D kojencům a dětem do jednoho roku [13].

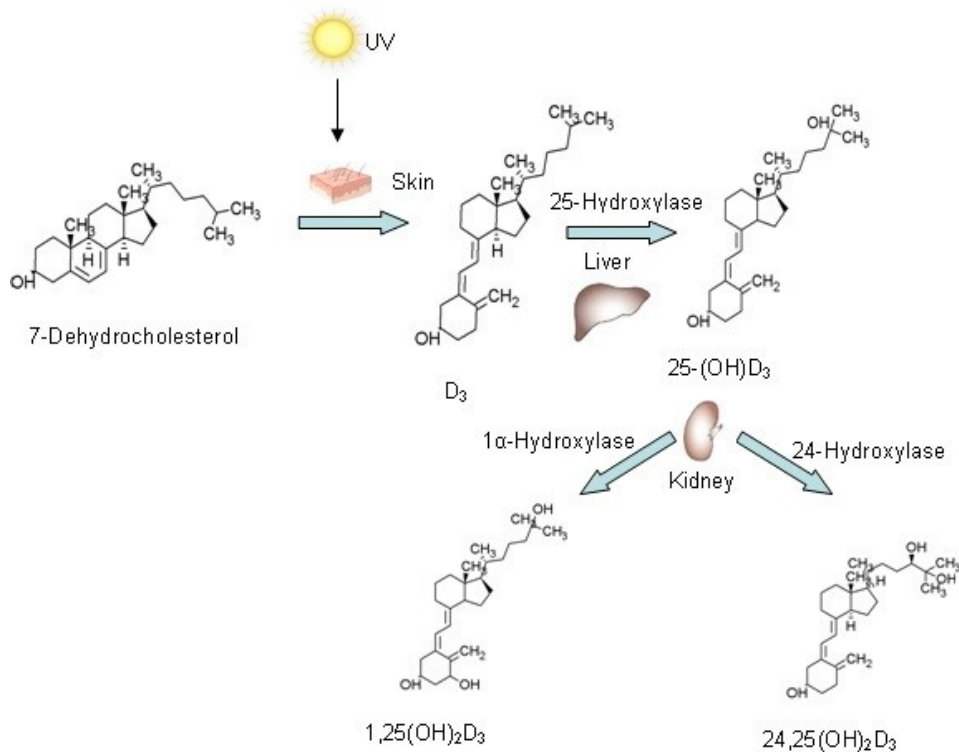
Obsah je často uváděn v mezinárodních jednotkách (IU, International Units). Jedné IU odpovídá 0,025 μg vitamínu D. Doporučené denní dávkování nalezneme v tab. 2. Doporučená denní dávka vitamínu D pro ČR je 5 μg (dle vyhl. 450/2004 Sb.).

Tab.2: Doporučené denní dávkování vitamínem D dle Endocrine Society [14, 15]

Věk	Doporučená denní dávka
0 – 1 rok	nejméně 400 IU (10 μg)
1 – 18 let	nejméně 600 IU (15 μg)
18 – 50 let	nejméně 600 IU (15 μg)
50 – 65 let	nejméně 600 IU (15 μg)
nad 65 let	nejméně 800 IU (20 μg)
Těhotné a kojící ženy	nejméně 600 IU (15 μg)

4.1.2.1. Metabolismus vitamínu D

Aby mohl vitamin D působit na cílové tkáně, musí neaktivní vitamin D₂ a D₃ podstoupit několik metabolických přeměn. Vitamin D₂ a jeho prekurzor ergosterol přijímaný z potravy, se účastní stejných metabolických drah jako vitamin D₃ (viz. obr. 4).



Obr.5: Metabolismus vitamínu D₃ v lidském těle [16]

Vitamin D₃ je syntetizován z provitaminu D₃, 7-dehydrocholesterol, v kůži působením UV-B záření (295 – 300 nm). Fotolýzou 7-dehydrocholesterolu v kůži vzniká meziprodukt previtamin D₃, který je termodynamicky nestabilní a rychle se mění na vlastní vitamin D₃. Vitamin D₃ je v plasmě transportován navázaný na specifický protein tzv. transkalciferin neboli vitamin D vázající protein (vitamin D-binding protein - DBP) do jater. Prekurzory vitamínu D₃ i D₂ přijímané v potravě jsou absorbovány v tenkém střevě a následně transportovány pomocí DBP krevním řečištěm také do jater. V hepatocytech dochází k první hydroxylaci na 25-hydroxy vitamin D (kalcidiol) pomocí enzymu 25-hydroxylázy. 25-hydroxy vitamin D je hlavní zásobní forma a hlavní cirkulující forma vitamínu v krevním řečišti. K dalšímu metabolickému kroku dochází v ledvinách, kde se působením enzymu 1- α -hydroxylázy hydroxyluje 25-hydroxy vitamin D

na aktivní metabolit 1,25-dihydroxy vitamin D (kalcitriol). Kalcitriol je klíčový metabolit vitaminu D účastnící se metabolismu vápníku a fosforu. Aktivita enzymu 1 α -hydroxylázy byla prokázána také v placentě, kůži, lymfatických uzlinách, střevě, plicích, kostech a dalších. 25-hydroxy vitamin D může být také hydroxylován na uhlíku 24 mitochondriálním enzymem 24-hydroxylázou na 24,25-dihydroxy vitamin D, který je neaktivní [2,16-18].

4.1.2.2. Funkce vitaminu D v těle

Nejdůležitější fyziologickou funkcí vitaminu D v těle je udržení homeostázy vápníku a fosforu. Ten je udržován hormonálním systémem kalcitriolu (1,25 $-(OH)_2-D_3$) ve spolupráci s parathormonem a kalcitoninem. Aktivní metabolit 1,25 $-(OH)_2-D_3$ stimuluje vstřebávání vápenatých a fosfátových iontů z tenkého střeva. Tím je udržována odpovídající hladina vápníku a fosforu v krvi, což je důležitá podmínka pro růst a mineralizaci kostí. Také se podílí na regulaci aktivity osteoklastů a osteoblastů. Prostřednictvím osteoblastů indukuje produkci, zrání a mineralizaci kolagenní matrix, dochází k osifikaci tkáně. Při nedostatečné sérové hladině vápníku zvyšuje aktivitu osteoklastů, čímž dochází k uvolnění vápníku z kostí. Nedostatek vitaminu D v dětství se projeví křivicí, kdy dochází k deformacím kostí, v dospělosti se pak projevuje měknutím kostí tzv. osteomalácií, kdy dochází k demineralizaci již vyvinutých kostí.

Receptory vitaminu D se nacházejí i na dalších tkáních, které se nepodílejí na regulaci kalciofosfátového metabolismu, jako např. na kůži, ve svalech, v pankreatu, reprodukčních orgánech, imunitním a nervovém systému a v endokrinních tkáních.

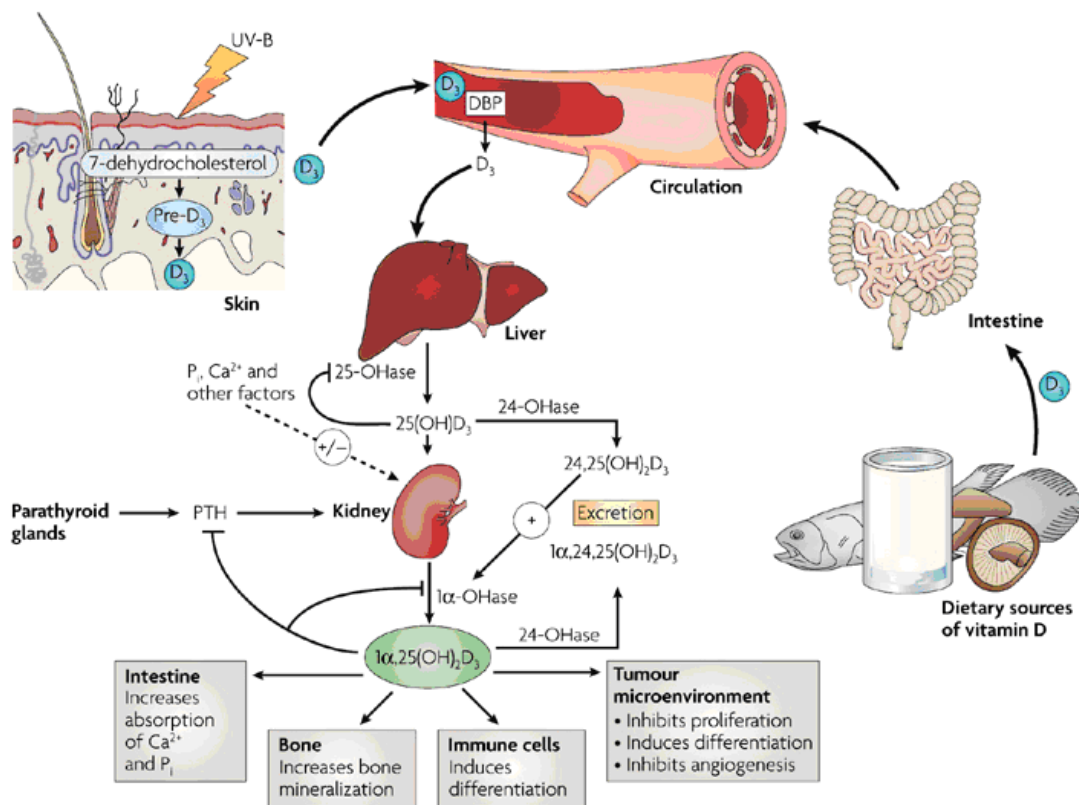
V ledvinách reguluje ztráty vápníku močí tím, že snižuje aktivitu 1 α -hydroxylázy a zvyšuje aktivitu 24-hydroxylázy. Zvyšuje se tak syntéza méně aktivního 24,25(OH) $_2D_3$ a klesá produkce 1,25(OH) $_2D_3$. Mimo to také zvyšuje reabsorpci kalcia a fosforu v proximálním, ale především v distálním tubulu.

Také stimuluje produkci insulinu v pankreatických buňkách a nízké hladiny vitaminu D korelují s výskytem diabetu mellitu 2. typu a obezitou. Nedostatek vitaminu D může vést k hypertrofii srdce a následně k progresi srdečního selhání.

Vitamin D má imunomodulační vliv. Indukuje produkci IL-1 monocytů a podporuje jejich vyžívání a zvyšuje účinnost makrofágů. Naopak inhibuje produkci imunoglobulinu

aktivovanými T a B-lymfocyty. Deficit vitamínu D je spojen se sníženou obranyschopností a zvyšuje výskyt i závažnost autoimunitních onemocnění, jakými jsou roztroušená skleróza, artritida a diabetes mellitus I., a zvyšuje riziko tuberkulózy.

Vitamin D hraje také důležitou roli u nádorových onemocnění. Kalcitriol je jedním z iniciátorů diference a apoptózy maligních buněk a zároveň inhibuje proliferaci buněk (pozorováno u kolorektálního karcinomu, karcinomu mléčné žlázy i prostaty) [2,16,19-24].

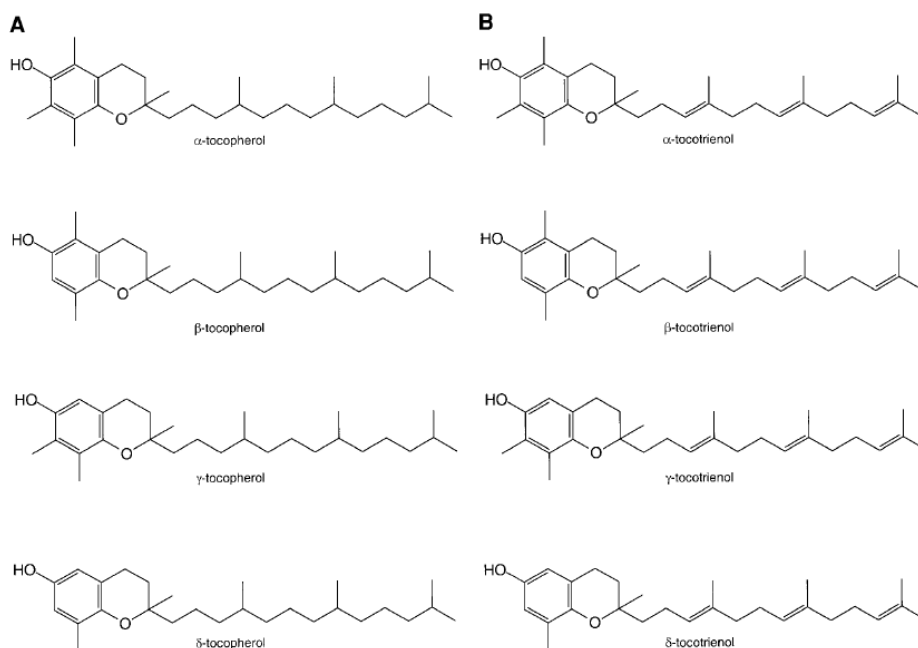


Obr.6: Osud vitamínu D v těle [24]

4.1.3. Vitamin E

Vitamin E je hlavní v tuku rozpustný antioxidant, který si lidské tělo neumí syntetizovat samo a musí ho přijímat v potravě. Skládá ze z chromanového kruhu a hydrofobního fytylového postranního řetězce. Na chromanovém kruhu je připojena jedna hydroxylová skupina jako dárce vodíkových atomů, podmiňující jeho antioxidační účinek. Vitamin E můžeme dle jeho struktury rozdělit na dvě základní podskupiny

tokoferoly a tokotrienoly. Ty se od se liší dvojnou vazbou na postranním řetězci. Obě tyto podskupiny jsou dále rozděleny na alfa (α), beta (β), gama (γ) a delta (δ) izomery (vitamery) (Obr.7), od sebe se odlišují polohou metylové skupiny na chromanovém kruhu. Mezi hlavní zdroje vitamínu E patří hlavně rostlinné oleje (olivový, slunečnicový, palmový), dále pak ořechy, vaječný žloutek, sýr, sójové boby, listová zelenina, avokádo, olivy či pšeničné klíčky. Tokoferoly mají tři asymetrické uhlíky (chirální centra), na pozici 2 v chromanovém cyklu a na pozicích 4',8' v postranním řetězci. Proto pro každý tokoferol existuje osm možných optických izomerů. Nejvíce rozšířen je R, R, R- α -tokoferol, dříve označovaný jako D- α -tokoferol, který má také největší antioxidační aktivitu. Přičemž účinnost klesá s klesajícím počtem methylových skupin v pořadí α -tokoferol > β -tokoferol > γ -tokoferol > δ -tokoferol. Syntetické tokoferoly se vyskytují v racemické směsi, která obsahuje všechny stereoizomery ve stejném poměru [1-2,25-26-30].



Obr.7: Vitamin E a jeho izomery [31]

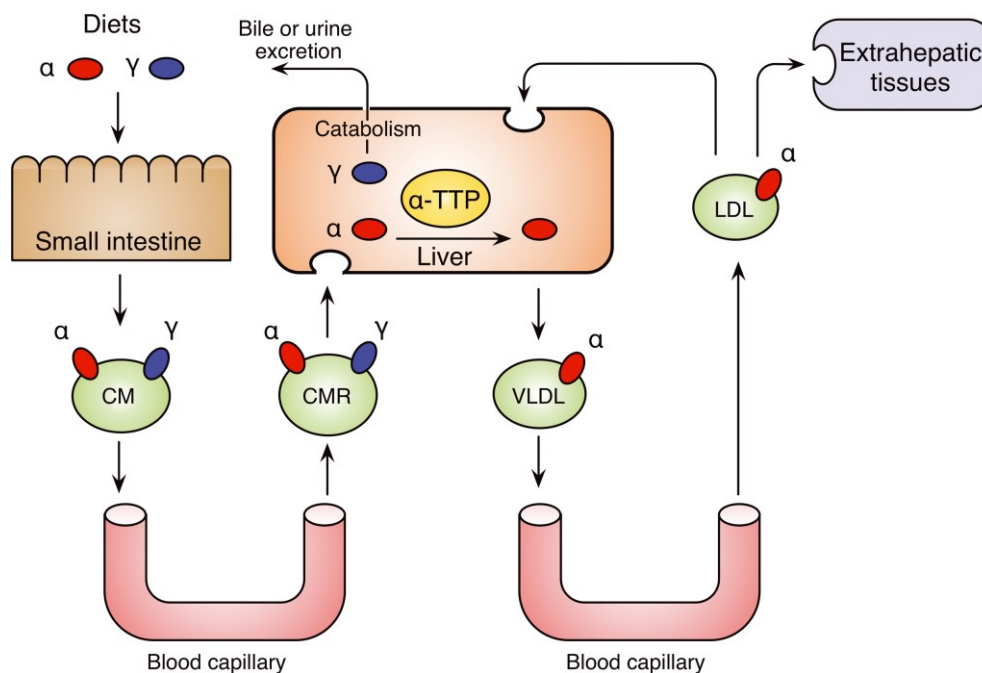
Doporučená denní dávka vitamínu E pro ČR je 12 mg (dle vyhl. 450/2004 Sb.). Doporučené denní dávkování vitamínem D dle Institute of Medicine pro je v tab. 3. Pokud matka v dostatečné míře přijímá vitamin E v potravě, je jeho koncentrace dostatečná i v mateřském mléce [32].

Tab.3: Doporučené denní dávkování vitamínem E [32]

Věk	Doporučená denní dávka
0 – 1 rok	4-5 mg
1 – 3 let	6 mg
4 – 8 let	7 mg
9 – 13 let	11 mg
13 – 18 let	15 mg
18 – 70 let	15 mg
nad 65 let	20 mg
Těhotné ženy	15 mg
Kojící ženy	19 mg

4.1.3.1. Metabolismus vitamínu E

Z potravy přijatý vitamín E (převážně α - a γ -tokoferol) je absorbován v tenkém střevě a transportován do krevního řečiště navázaný na chylomikrony. Zde jsou tyto chylomikrony katabolizovány lipoproteinovou lipázou na chylomikronové remnanty obsahující vitamín E, které jsou díky jaterním receptorům apolipoproteinu B a E vychytávány z krevní cirkulace. V játrech jsou dále metabolizovány nebo přepravovány do dalších orgánů. Zde dochází k přeměně většiny izomerů na vodě rozpustné metabolity, které jsou vylučovány do žluče nebo do moče. Tokoferoly mají specifický transportní protein α -tocopherol transfer protein (α -TTP). Ten váže izomery s různou afinitu, nejvyšší má k α -tokoferolu. Z jater je buď vylučován do plasmy jako VLDL cholesterol, který je následně hydrolyzován na LDL cholesterol do ostatních tkání, kde je vychytáván pomocí LDL receptorů, nebo se vrací zpět do jater. Metabolická dráha tokoferolů je znázorněna na obr. 8 [1-2,26,33-36].



Obr.8: Schéma metabolické dráhy pro vitamin E [1]

4.1.3.2. Funkce vitaminu E v těle

Vitamin E patří mezi nejdůležitější antioxidanty a vychytávače (scavengery) reaktivních forem kyslíku. Funkce antioxidantů spočívá v přerušení řetězové reakce volných radikálů a v zabránění jejich nadměrné tvorby. Reaguje s volnými radikály jako jsou singletový kyslík, peroxid vodíku a dalšími tím, že přenáší vodík z fenolové skupiny na volný peroxidový radikál. Při reakci s vitaminem C dochází k regeneraci tokoferolu. Chrání lipidy a lipoproteiny biologických membrán svalů, nervů a kardiovaskulárního systému před účinky oxidací, i když je jeho koncentrace v buněčných membránách nízká (méně než 1 molekula α -tokoferolu na 1000 lipidů). Pomáhá zpomalovat stárnutí a prokazatelně působí i jako prevence proti nádorovému bujení. Vitamin E také neutralizuje hydroperoxidové radikály, které oxidují LDL cholesterol a krevní tuky, čímž snižuje riziko aterosklerózy, onemocnění srdce a cév, také zlepšuje hojení ran. Má pozitivní účinky na tvorbu pohlavních buněk, zvyšuje plodnost a podporuje činnost nervového systému [26,37-39].

4.2. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

4.2.1. Mateřské mléko

Mateřské mléko je ideální zdroj živin pro správný růst a vývoj novorozenců. Je lehce stravitelné, snadno dostupné a má mnoho dalších výhod ve vývojových, psychologických, sociálních a ekonomických aspektech pro dítě i matku. Světová zdravotnická organizace doporučuje kojení mateřským mlékem prvních 6 měsíců po narození. Složení mateřského mléka se v čase dynamicky mění od colostru po zralé mléko. První tekutinou produkovanou ihned po porodu je tzv. mlezivo (colostrum). Toto první mléko je žluté, husté, bohaté na bílkoviny a imunologické složky jako je Ig A, laktoferrin, leukocyty. Kolostrum obsahuje poměrně málo laktosy, draslíku a vápníku. U tohoto mléka převažuje funkce obranná (imunologická) nad výživovou. Mezi 5. - 14. dnem nastává období zvýšené tvorby mléka, které je potřeba pro rychlý růst a vývoj dítěte. V tomto období je tvořeno tzv. přechodné mléko, které je charakterizováno postupným vzestupem koncentrace sodíku, citrátu a laktosy. Po 4.- 6. týdnu po porodu je mléko považováno za plně zralé.

Složení mateřského mléka se mění i během jednoho kojení. Na začátku kojení obsahuje mléko více vodné a sacharidové složky, toto mléko se nazývá „přední mléko“. Ke konci kojení se produkuje husté tzv. „zadní mléko“, kde přibývá nenasycených mastných kyselin a cholesterolu [40-42].



Obr.9: Rozdíl mezi „předním“ a „zadním“ mateřským mlékem [43].

4.2.1.1. Složení mateřského mléka

Jednotlivé složky mateřského mléka pocházejí ze tří zdrojů – některé jsou tvořeny přímo prsní žlázou, některé mají původ z přijímané potravy od matky a některé pocházejí z tělních zásob matky. Složení mateřského mléka je proměnlivé a závisí na mnoha faktorech jako je potrava, věk, rasa atd.

Základní živiny

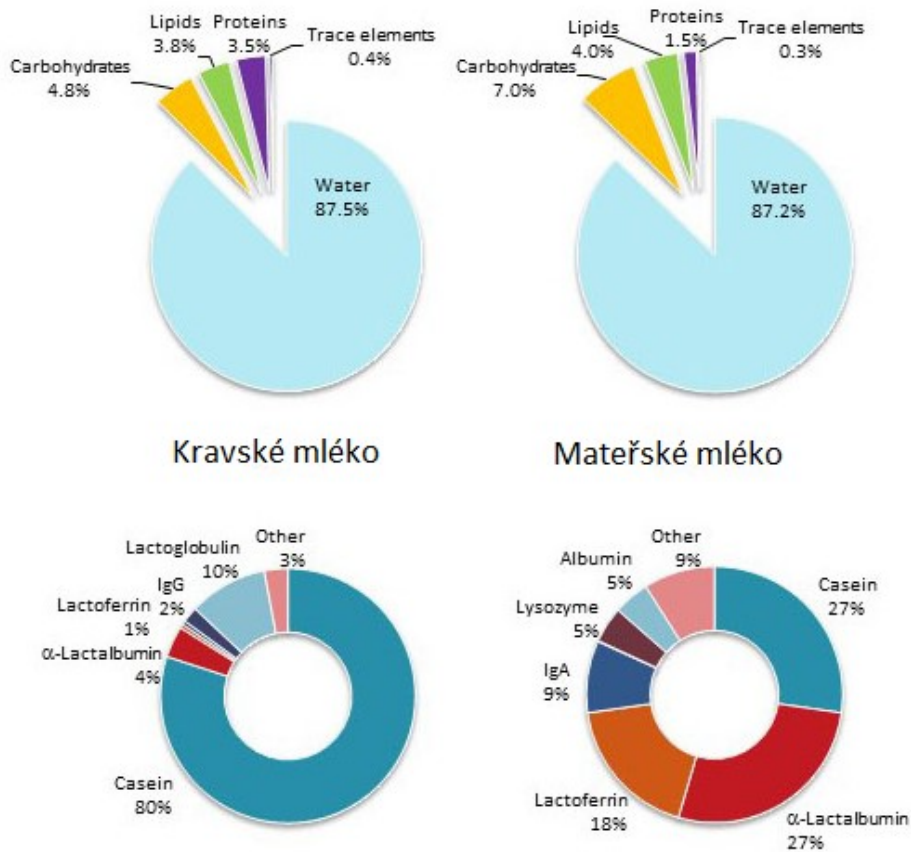
Zralé mateřské mléko obsahuje přibližně 0,9 – 1,2 g/100mL bílkovin, 3,2 – 3,6 g/100mL tuků a 6,7 – 7,8 g/100mL laktosy.

Bílkoviny jsou nejstálější složkou mateřského mléka. Celková bílkovina mateřského mléka zahrnuje jak bílkoviny mléčné, tak imunoglobuliny a sérové bílkoviny. Mléčné bílkoviny jsou kasein a syrovátkové bílkoviny – α -laktalbumin, β -laktalbumin a laktoferin (váže železo). Dominantní syrovátkovou bílkovinou je α -laktalbumin. Dalšími významnými složkami jsou imunologické faktory bílkovinné povahy - lysozym, který má obranou funkci, podobně jako imunoglobuliny a sekreční imunoglobulin A, který povléká sliznici trávicího ústrojí a chrání tak novorozence před osídlením choroboplodnými organismy. Laktoferrin spolu s laktózou tvoří příznivé prostředí pro růst bakteriálního kmene *Lactobacillus bifidus*, nejčastější bakterie osidlující trávicí trakt kojených dětí [41,44].

Tuky jsou nejvariabilnější složkou mateřského mléka, jejich množství závisí na stravě matky. Obsah tuku kolísá během dne a mění se i během jednoho kojení. Při sání tuku v mléce přibývá. Zadní mléko může obsahovat 2-3 krát více tuku než přední mléko. Fosfolipidy a mastné kyseliny tvoří důležitou část lipidů v mateřském mléce. Za energetickou složku lze považovat především triacylglyceroly a nasycené mastné kyseliny s krátkým či středně dlouhým řetězcem jako jsou kyselina palmitová, olejová a myristová. Nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (linolenová, linolová, arachidonová a dokosaheptaenová) jsou nezbytné pro myelinizaci a vývoj CNS a sítnice [41,45,46].

Základním sacharidem v mateřském mléce je disacharid laktóza. Ta dodává téměř polovinu energie. Obsah laktózy stoupá ze 4 % v kolostru na 7 % ve zralém mateřském mléce, je efektivně trávena a vstřebávána v tenkém střevu prostřednictvím laktázy ze střevního epitelu. Dalšími významnými sacharidy jsou galaktóza, fruktóza a

oligosacharidy. Oligosacharidy podporují selektivně růst tělu prospěšných organismů a znesnadňují adhezi patogenních mikroorganismů na střevní epitel [47].



Obr.10: Složení kravného a mateřského mléka [48]

Vitaminy

Obsah vitaminů v mateřském mléce je závislý na stravě matky a jejich zásobách v těle. V mateřském mléce nalezneme jak vitaminy rozpustné ve vodě (B komplex a vitamin C) tak vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K).

Vitamin A se nachází v mateřském mléce v dostatečném množství. Kolostrum ho obsahuje 2x více než plně zralé mléko a způsobuje jeho nažloutlou barvu.

Vitaminu D je v mateřském mléce poměrně málo (průměrně 0,15 µg/100 ml). Vitamin D se tvoří v kůži působením UV záření, kde se tvoří v nedostatečném množství. Doporučuje se doplňovat jeho množství pomocí doplňků stravy.

Vitamin E je v dostatečném množství v mléce matek, které mají ve stravě dostatek nenasycených mastných kyselin.

Hladiny vitamínu K jsou v mateřském mléce nízké, proto je doporučováno ho podávat jako prevence krvácivého onemocnění všem novorozencům [49].

Minerální látky a stopové prvky

Vápník, hořčík, jód a fluor jsou důležité látky pro osifikaci kostí, pro tvorbu thyreoidních hormonů a pro správný neurologický vývoj. V některých zemích se objevuje nízký obsah jódu v mateřském mléce. Proto byla vytvořena doporučení dle WHO a Unicefu pro příjem jódu. Pro kojící ženy je doporučený příjem jódu stanoven na 250 µg za den. Železo, zinek a měď jsou esenciální stopové prvky přispívající ke správnému růstu a vývoji dětí. Nedostatek těchto látek v mateřské mléce je velmi vzácný. Kravské mléko a umělé kojenecké výživy obsahují stejný nebo dokonce vyšší obsah minerálních látek, avšak jejich biologická dostupnost je mnohem lepší z mléka mateřského [50,51].

4.2.1.2. Odběr a transport mateřského mléka

Dárkyně mateřské mléko odstříká do plastových či skleněných vyvařených lahví k tomuto účelu určených a vydávaných přímo Mléčnou bankou. Láhev nemusí být sterilní, ale před použitím musí být vypláchnuta horkou vodou. Prvních 10 ml odstříkaného mléka se odstříká mimo sběrnou láhev, protože je více kontaminováno bakteriemi. Láhev s mlékem musí být označena jménem a datem sběru. Mléko je po odběru okamžitě uloženo do mrazničky. Během transportu do Mléčné banky se musí mléko transportovat v přenosné mrazničce, aby zůstalo zmražené. Před pasterizací se mléko nechá rozpustit ve vodní lázni 20 °C teplé, maximálně po dobu 3 hodin.

4.2.1.3. Mléčné banky

Mateřské mléko je jedinou přirozenou potravou novorozence a kojence. Pokud nemůže být dítě z jakýchkoliv důvodů kojeno, měla by mu být poskytnuta plnohodnotná náhrada. K tomuto účelu začaly ve světě při nemocnicích vznikat banky mateřského mléka. V roce 1907 přišel pražský pediatr Epstein s myšlenkou konzervace mateřského mléka. Za 2 roky na to vznikla první banka mateřského mléka ve Vídni. V České Republice

je v současnosti 5 bank mateřského mléka, většinou při perinatologických centrech (Hradec Králové, Most, České Budějovice, Česká Lípa, Praha-ÚPMD).

Mléčné banky uchovávají, zpracovávají a distribuují mateřské mléko jako optimální výživu pro novorozence, zejména nedonošené děti na oddělení JIP. Většinou jde o mléko od jejich matek, dále matek z oddělení šestinedělí, ale i od dárkyň.

Od roku 1987 je v České Republice zakázáno dle doporučení WHO kojit dítě cizí matkou či krmit dítě cizím neošetřeným mateřským mlékem, vzhledem k možnému přenosu HIV. Proto se cizí mateřské mléko před podáním musí pasterizovat. Metoda používaná k pasterizaci mateřského mléka v mléčných bankách se nazývá Holderova pasterizace. Tato metoda využívá teploty 62,5 °C po dobu 30-ti minut. Při této teplotě dochází k inaktivaci virů (cytomegalovirus, virus HIV) a bakterií, ale zároveň zůstávají zachovány důležité látky jako jsou oligosacharidy, laktóza, glukóza, polynenasycené mastné kyseliny. Bohužel, při této teplotě dochází také ke snížení obsahu nebo aktivity některých látek jako např. imunoglobulin A, laktoferin, lysozym a některých cytokinů, růstových faktorů a hormonů. Pasterizace je kompromis mezi bezpečností a biologickou kvalitou mateřského mléka [52-55].

4.2.1.4. Pasterizace mateřského mléka v Mléčné bance ve Fakultní nemocnici Hradec Králové

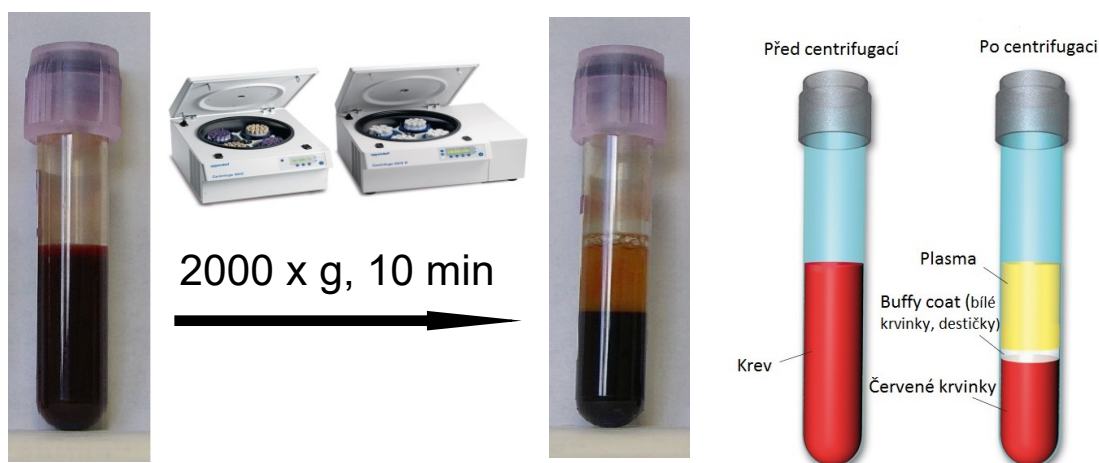
Před pasterizací se mléko nechá rozpustit ve vodní lázni 20°C teplé, maximálně po dobu 3 hodin. Proveďte se odběr vzorků na mikrobiologické vyšetření, kde nesmí být přítomny žádné potencionální patogeny a další vyšetření, která zahrnují např. i vyšetření tučnosti ke stanovení krematokritu či vyšetření na přítomnost bílkoviny kravského mléka.

K pasterizace mateřského mléka se využívá tzv. Holderova pasterizace (dlouhodobá pasterizace). Vzorky mléka ve 250 ml skleněné lahvi jsou umístěny ve vodní lázni, která je vyhřátá na 62,5 °C. Spolu se vzorky je v pasterizační lázni umístěna kontrolní lahev s kalibrovaným teploměrem naplněna slanou vodou. Tato kontrolní lahev zaznamenává teplotu během celého pasterizačního procesu. Jakmile dosáhne tato kontrolní lahev teploty 5x přes 62,5 °C, pokračuje proces zahřívání po dobu 20-ti minut. Po ukončení pasterizačního procesu je mateřské mléko velmi rychle zchlazeno v ledové lázni. Po zchlazení se provede odběr mateřského mléka na bakteriologické vyšetření, poté je mléko zmrazeno a uloženo nejdéle na 3 měsíce [55-57].

4.2.2. Krev

Krev je neprůhledná červená tekutina cirkulující v uzavřeném cévním řečišti lidského těla. Skládá se z pevných částí tzv. krevních buněk a fragmentů (červené krvinky, bílé krvinky, krevní destičky) suspendovaných ve vodném roztoku – plazmě (voda, organické a anorganické sloučeniny a prvky).

Plazma se získává centrifugací venózní, arteriální či kapilární krve ve zkumavkách s přidavkem protisrážlivého činidla (citrát Na, heparin, K₂EDTA, Na₂EDTA). Nesrážlivá krev se centrifugací rozdělí na plazmu a krevních buňky (obr.11). Plazma se skládá z vody, elektrolytů, živin, proteinů a hormonů. Voda a složení elektrolytů plazmy je prakticky stejné jako ve všech mimobuněčných tekutinách.



Obr.11: Oddělení plazmy z plné krve [58, 59]

Sérum se získává srážením celé krve, která se nechá srážet po dobu 20 minut. Po centrifugaci vzorku se získá nažloutlá tekutina podobná plazmě, která neobsahuje srážecí faktory (hlavně fibrinogen) [58, 60].

4.2.2.1. Odběr a transport

Odebírá se nejlépe ráno nalačno (pokud lékař nerozhodne jinak) 4-5 ml krve do sterilní zkumavky (bez přísad - EDTA, heparin, apod.) Lze použít odběrové zkumavky s aktivátorem hemokoagulace. Transport do laboratoře při 2- 8 °C do 48 hod. Nesmí se mrazit.

Do laboratoře lze také zaslat vzorek ve formě séra. Sérum je nutno uchovávat při 4-8 °C a ihned transportovat do laboratoře do 12 hodin nebo zamrazit na -20 °C a transportovat v zamraženém stavu [61].



Obr.12: Odběrová zkumavka na sérum [61]

4.2.3. Moč

Moč je většinou snadno dostupná tělesná tekutina, často bez nutnosti invazivního zásahu při odběru. Jako odpadní kapalina tvořící se v ledvinách, v podstatě se jedná o zahuštěný ultrafiltrát plazmy. Moč se skládá z vodného roztoku metabolických odpadů (např. močovina - urea), rozpuštěných solí zejména chloridu sodného a dalších organických látek. Barva je za fyziologických podmínek světle žlutá až žlutá.

4.2.3.1. Odběr a transport

Odběr:

- moč získaná jednorázově (zejména pro kvalitativní analýzy)
- moč sbíraná po určitý časový úsek (pro většinu kvantitativních analýz)

Pro většinu vyšetření je nejvhodnější první ranní moč, která je koncentrovanější a má nižší pH. Pro fyzikálně chemické vyšetření by moč měla být skladována při pokojové teplotě a zpracována do 1 hodiny od odběru. Pro kultivační vyšetření by vzorek měl být zpracován do 2 hodin, případně uložen při +4°C (maximálně po dobu 12 hodin) až do zpracování [62, 63].

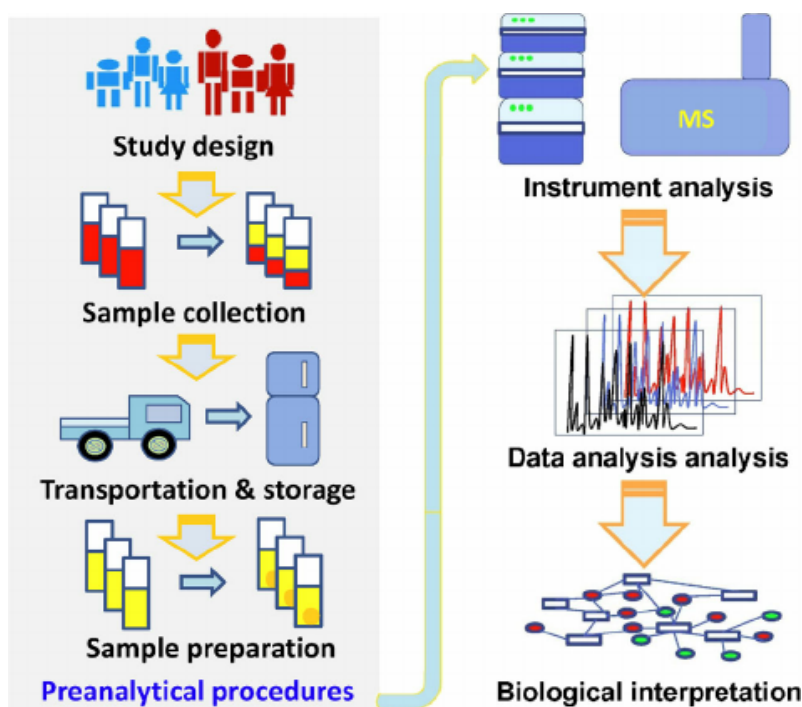


Obr.13: Různé zkumavky na moč [64-66]

4.3. METODY ÚPRAVY BIOLOGICKÉHO VZORKU K ANALÝZE

Biologický materiál, mezi který patří i tělní tekutiny (sérum, plazma, mateřské mléko, moč), je nejčastěji analyzovaný materiál v bioanalýze. Jedná se o velmi složitou a komplexní matici, která kromě sledovaných analytů obsahuje i velké množství interferujících látek, jako jsou proteiny, fosfolipidy, soli a další organické látky. Tyto balastní složky mohou být podobné svými vlastnostmi stanovovaným látkám a mohou negativně ovlivnit výsledek analýzy. Proto je nutné nejdříve tyto interferující látky odstranit. Výběrem vhodné metody pro úpravu biologického vzorku dojde k odstranění nechtěných složek vzorku, zakoncentrování a izolaci měřeného analytu, který se ve vzorku většinou nachází ve velmi nízkých koncentracích. Na volbě správné techniky pro úpravu vzorku závisí výsledek celého analytického stanovení. Při tomto rozhodování bychom měli zohlednit druh biologického materiálu, chemickou strukturu stanovované látky a její fyzikálně-chemické vlastnosti. Dále je také důležité brát v úvahu délku přípravy, spotřebu rozpouštědel, pracnost metody a náročnost na vybavení. Tyto faktory jsou důležité hlavně u zpracování velkých sérií vzorků. Z celkové doby analýzy biologického vzorku, od odběru až po vyhodnocení dat, je preanalytická fáze úpravy vzorku časově nejnáročnějším krokem, mnohdy zabírá až 80% času.

Mezi metody pro úpravu vzorku patří jednoduché techniky jako precipitace, centrifugace a ultracentrifugace a jiné, dále pak metody extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), extrakce na tuhé fázi (SPE) a nejmodernější metody mikroextrakce založené na LLE a SPE, mezi jejichž hlavní výhody patří snížení objemu vzorku a spotřeby rozpouštědel, zkrácení doby přípravy, snížení počtu kroků, snížení nákladů na analýzu a možnost automatizace [67-69].



Obr.14: Preanalytická fáze s následným vyhodnocením dat [70]

4.3.1. Precipitace

V biologickém materiálu (sérum, plazma, mateřské mléko) se nachází velké množství bílkovin, které mohou způsobit problémy při analytickém stanovení. Proto je důležité tyto proteiny ze vzorku odstranit. Nejenže působí rušivě na stanovení sledovaných analytů, ale může také dojít k poškození analytického vybavení např. chromatografické kolony.

Nejjednodušší metodou k odstranění těchto rušivých látek je precipitace neboli srážení proteinů. K precipitaci můžeme použít několik typů deproteinačních činidel, které nesmí reagovat se sledovanou látkou, interferovat při detekci či ovlivňovat analytickou výtěžnost.

Typy deproteinačních činidel:

1. silné anorganické či organické kyseliny (např. kyseliny chlorovodíkové, trifluoroctové, trichloroctové, pikrové, chloristé, mravenčí, metafosforečné ad.), vzniká kyselý supernatant, který může rozložit analyt
2. organické rozpouštědlo mísitelné s vodou (nejčastěji methanol, ethanol, acetonitril, tetrahydrofuran, atd. a jejich kombinace)

3. ionty těžkých kovů (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , či Ba^{2+}), nevhodné pro analyty, které snadno vytvářejí komplexy s ionty těžkých kovů.

Deproteinační činidlo se přidá ke vzorku, rozruší vazby proteinů a vzniká sraženina či precipitát, který je následnou centrifugací oddělen od supernatantu obsahující cílový analyt (obr. 15). Po centrifugaci lze čirý supernatant buď přímo použít k analýze, nebo odpařit do sucha a následně odparek rozpustit v malém množství mobilní fáze.

Po této úpravě může získaný supernatant stále obsahovat interferující látky z matrice, proto je většinou nutné použít další selektivnější techniku pro úpravu vzorku před konečnou analýzou [69,71-72].



Obr.15: Vznik precipitátu [73]

4.3.2. Centrifugace

Centrifugace neboli odstředování je jednoduchá základní laboratorní metoda, která využívá odstředivé síly pro dělení látek na základě jejich rozdílných hustot, zrychluje rovněž proces sedimentace těchto částic. V praxi se centrifugace většinou používá k dělení směsí kapalin, odstranění sraženin, izolaci nebo odstranění buněk, oddělení plazmy či séra od krevních elementů nebo k frakcionaci makromolekul podle hustoty. Dále se může použít ke speciálním preparativním či analytickým účelům, např. k přípravě buněčných struktur, k izolaci buněčných organel či stanovení relativních molekulových hmotností sloučenin. K těmto účelům se používá zařízení zvané centrifuga.

Během centrifugace působí na vzorky pohybující v tzv. rotoru po kruhové dráze, odstředivá síla, která je přímo úměrná rychlosti a délce dráhy po které se vzorky pohybují. Tato síla F tedy závisí na poloměru rotoru a na rychlosti, se kterou se rotor otáčí. Lze ji vypočítat ze vztahu:

$$F = m \cdot r \cdot \omega^2,$$

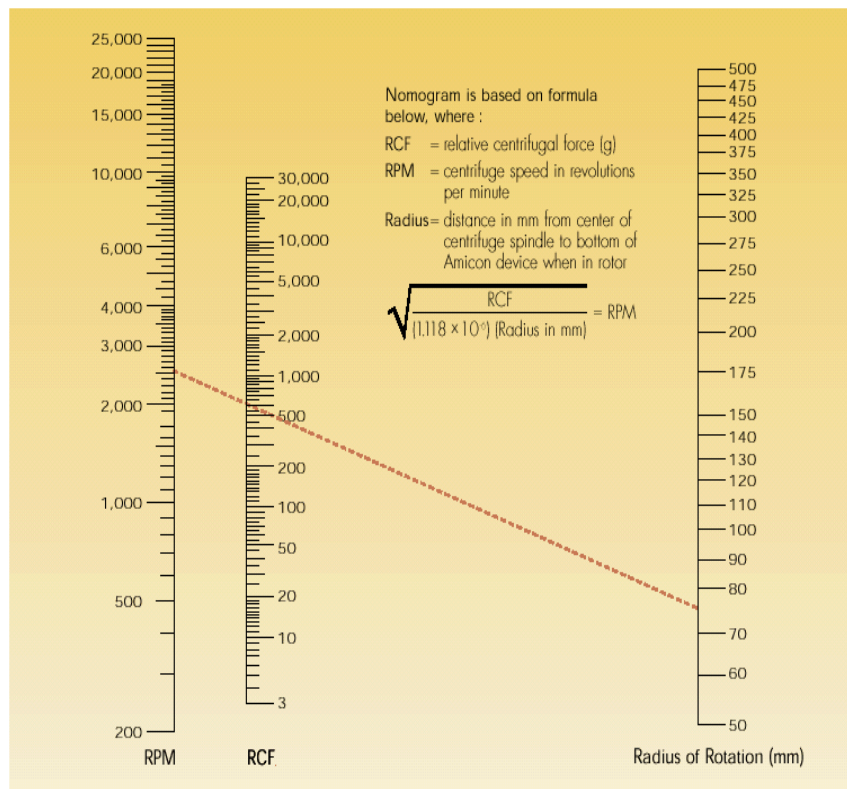
kde m je hmotnost částice, r je poloměr otáčení a ω je úhlová rychlost ($\omega = 2\pi f$, kde f je frekvence otáček). Pro praktické výpočty se zavádí veličina relativní centrifugační síla (RCF), která udává, kolikrát je vyvolané centrifugační zrychlení vyšší než tíhové zrychlení, uvádí se v násobcích g (je bezrozměrná, $g=9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$). Platí pro ni

$$\text{RCF} = r \cdot \omega^2 / g,$$

snadno se vypočítá pro kteroukoli centrifugu a daný počet otáček:

$$\text{RCF} = 1,118 \cdot r \cdot N^2 \cdot 10^{-5},$$

kde N je počet otáček za minutu a r je poloměr otáčení v cm . Místo výpočtu se k zjištění centrifugační síly používají nomogramy. Po změření poloměru r (mm) od středu centrifugy na konkrétní požadované místo je protnuta přímka, která spojí hodnotu poloměru v pravém sloupci a příslušnou rychlost centrifugy v levém sloupci (RPM). Vzniklý průsečík ve středovém sloupci udává výslednou hodnotu RCF [74-76].



Obr.16: Nomogram [77]

4.3.2.1. Typy centrifug

Centrifugy můžeme rozlišovat dle velikostí na malé stolní až po velkoobjemové odstředivky, chlazené, nechlazené či s možností mrazení. Podle dosahovaného odstředivého zrychlení, resp. frekvence otáček, se centrifugy dělí na nízko- ($2 - 6 \times 10^3$ ot/min), středně- ($18 - 25 \times 10^3$ ot/min) a vysokoobrátkové (ultracentrifugy, $35 - 150 \times 10^3$ ot/min).

V běžných rutinních laboratořích postačují zpravidla nízkoobrátkové centrifugy, které se používají především k urychlení sedimentace buněk. Vysokoobrátkové centrifugy pracují zpravidla bez vakua a bývají chlazené. Lze jimi navíc separovat bakterie, buněčná jádra a některé membránové organely. Pro sedimentaci menších částic, např. virů, makromolekul, ribozomů nebo membránových frakcí se používají ultracentrifugy dosahující relativního odstředivého zrychlení až $1\,000\,000$ g. Aby se zabránilo vzniku nežádoucího tepla třením, pracují rotory ultracentrifug ve vakuu [74-76].



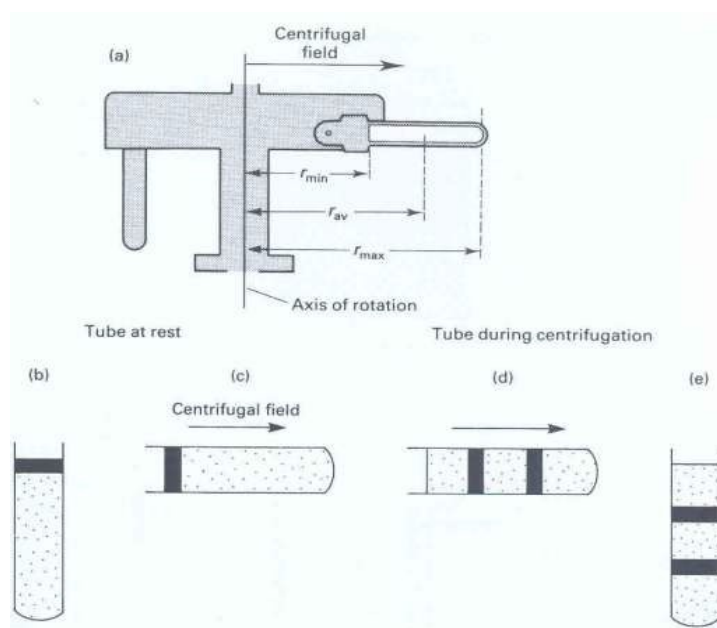
Obr.17: Ultracentrifuga Optima MAX-XP používaná ve Výzkumné laboratoři KGM [78]

4.3.2.2. Typy rotorů

Rotor je otáčející se část centrifugy s otvory pro centrifugační zkumavky (kyvety), do kterých je dáván vzorek. Obvykle obsahuje sudý počet otvorů na kyvety, které musí být před centrifugací vyváženy (a to i včetně víček, pokud jsou součástí kyvet), neboť tato technika je velice citlivá a každá nepřesnost ve vyvážení se mnohonásobně projeví zvětšením odstředivého tlaku na jednu stranu osy.

Podle konstrukce se rozlišují rotory:

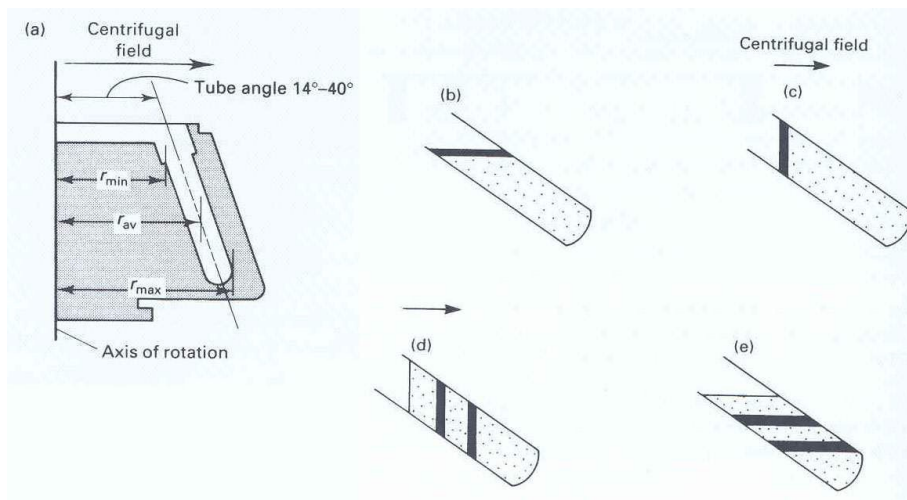
1. výkyvné - rotor je tvořen tělem rotoru a závěsnými nosiči kyvet. Kyvety jsou v rotoru zavěšeny a při otáčení se vykloní ve směru odstředivé síly (obr.18). Jejich výhodou je, že odstředivá síla působí kolmo ke dnu zkumavky, naopak nevýhodou je omezená mechanická odolnost čepů, na kterých dochází k vychýlení nosiče zkumavek. Rotory s výkyvnými kyvetami se převážně využívají při menším zrychlení u nízkoobrátkových centrifug [76,79-80].



Obr.18: Rotor s výkyvnými kyvetami [79]

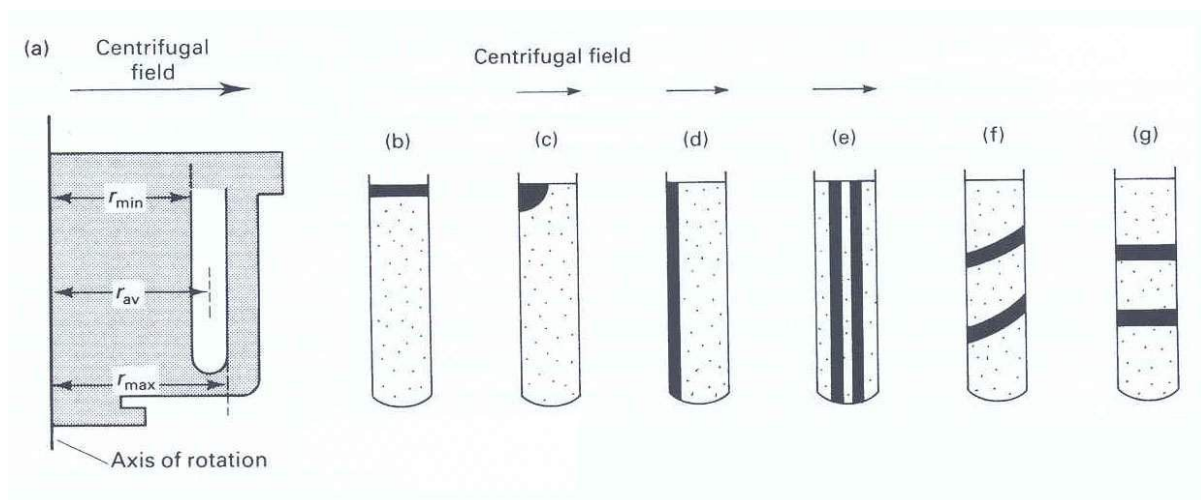
2. úhlové - rotor je tvořen jedním blokem, prostor na kyvety je součástí rotoru. Kyvety svírají s osou otáčení rotoru úhel, nejčastěji $15^\circ - 40^\circ$ (obr. 19), částice

nesedimentují podél osy kyvety ale šikmo. Tyto rotory jsou vhodné pro zonální typ centrifugace [76,79-80].



Obr.19: Rotor s úhlovými kyvetami [79]

3. vertikální - rotor je tvořen jedním blokem. Prostor na kyvety je rovnoběžný s osou otáčení rotoru (obr.20). Tento rotor je využíván ve vysokoobrátkových centrifugách a v ultracentrifugách [76,79-80].



Obr.20: Rotor s vertikálními kyvetami [79]

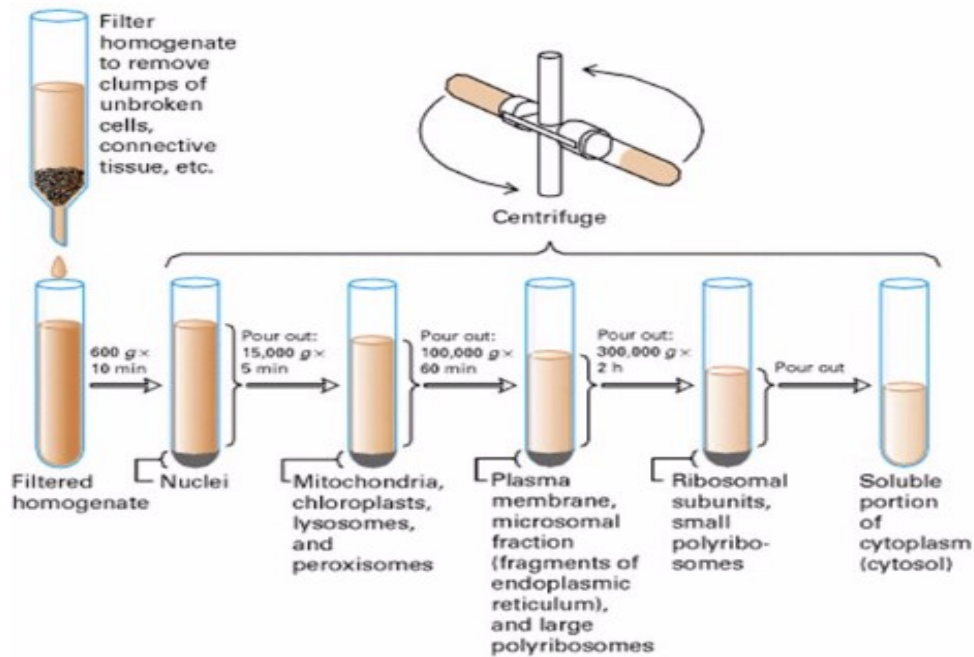
4.3.2.3. Způsoby centrifugace

Rozlišujeme dva základní typy centrifugačních postupů a to jsou analytická a preparativní centrifugace. Analytická se dříve používala k měření fyzikálních vlastností sedimentujících částic např. pro stanovení molekulové hmotnosti makromolekulárních látek. Díky novějším jednodušším postupům jako např. gelová filtrace nebo SDS-PAGE se začalo k izolaci specifických částic využívat především preparativní centrifugace. Ta postrádá, na rozdíl od analytického postupu, zařízení pro pozorování vzorku během odstředování. Můžeme ji dělit na a) diferenciální a b) gradientovou centrifugaci, kterou lze dále dělit na techniku zonální a izopyknické centrifugace.

a) Diferenciální centrifugace

Nejběžnější metodu separace je diferenciální centrifugace, ke které dochází při postupném odstředění vzorku za zvyšující se centrifugační síly. Během tohoto procesu sedimentují různé částice různou rychlostí na základě jejich sedimentačních koeficientů. Sedimentační koeficient závisí na hmotnosti a densitě částic a na jejich interakci s kapalinou, tedy částice jedné velikosti (se stejným koeficientem sedimentace) zcela sedimentují. Především je používána k opakovanému odstředění buněčného lyzátu za účelem izolace buněčných komponent se snižující se velikostí a hustotou. Každý centrifugační krok má za následek vznik sedimentu na dně kyvety, která obvykle obsahuje směs buněčných složek o stejné velikosti a hustotě.

V praxi se provádí opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček. Kdy je supernatant, tekutina nad sedimentem, podrobena další centrifugaci, což vytváří další sediment obsahující menší buněčné komponenty s nižší hustotou. Tento proces se opakuje do konečného separování všech složek vzorku, obr.21 . Tato technika je rychlá a jednoduchá, ale hlavní nevýhoda je, že odděluje pouze buněčné složky lišící se významně svou velikostí a proto nejsou frakce zcela čisté [74,76,79].



Obr.21: Schéma diferenciální centrifugace [81]

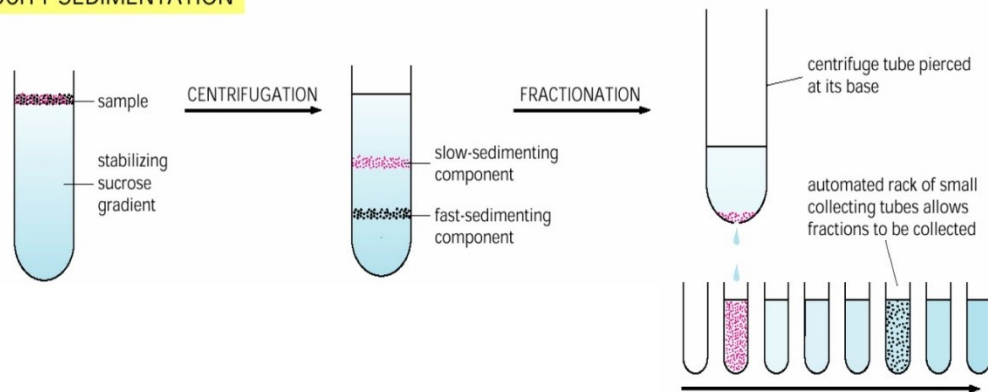
b) Centrifugace v hustotním gradientu

Tato centrifugace probíhá za použití centrifugačního média, které musí vytvářet gradient, nesmí interferovat se vzorkem a musí být ze vzorku snadno odstranitelné. K tomuto účelu se nejčastěji používá sacharóza, glycerol či dextran, u kterých se musí gradient připravit anebo soli CsCl, Cs₂SO₄ či NaBr, které samy vytvářejí gradient během centrifugace. Existují dva typy hustotních gradientů – diskontinuální (je tvořen několika různě hustými vrstvami) a kontinuální (změna hustoty je plynulá v celém rozsahu centrifugační zkumavky). Gradientovou centrifugaci lze rozdělit na zonální a izopyknickou.

1. zonální (rychlostní) centrifugace - při zónové ultracentrifugaci se částice dělí podle svých sedimentačních koeficientů (tvaru a molekulové hmotnosti). Vzorek se opatrně v kyvetě navrství na hustotní gradient, jehož účelem je zamezit konvekčnímu míchání roztoku. Tento gradient je nejčastěji vytvořen inertním roztokem sacharózy. Během centrifugace se každý druh makromolekul pohybuje gradientem rychlostí převážně závislou na sedimentačním koeficientu, tím

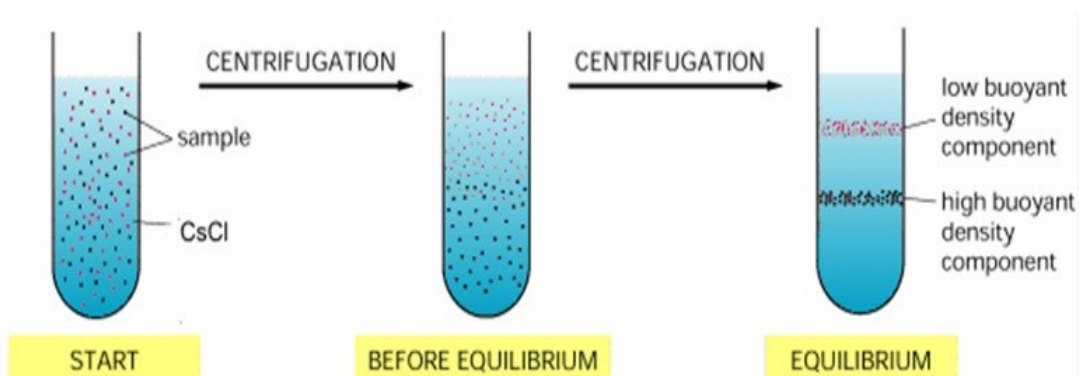
dochází k vytvoření zón jednotlivých látek, které mohou být od sebe snadno separovány (obr.22) [74,76,79-80].

VELOCITY SEDIMENTATION



Obr.22: Zonální centrifugace [82]

2. izopyknická (rovnovážná) centrifugace – při této centrifugace se separují látky podle jejich hustoty, nezávisle na jejich velikosti a molekulové hmotnosti. Při rovnovážné centrifugaci v hustotním gradientu je vzorek rozpuštěn v koncentrovaném solném roztoku jako je např. roztok chloridu nebo síranu cesného. Následná centrifugace probíhá až do ustavení rovnováhy v roztoku (obr.23). Během centrifugace sedimentují částice právě do místa, kde se jejich hustota shoduje s hustotou média (tzv. izopyknický bod) [74,76,79-80].



Obr.23: Izopyknická centrifugace [83]

4.3.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

LLE je jednou z nejstarších a dodnes široce používanou technikou přípravy vzorků. Tato jednoduchá metoda je založená na přechodu cílového analytu z vodného roztoku vzorku do extrakčního rozpouštědla nemísitelného s vodou (obr. 24). Přestup analytů je umožněn na základě jejich rozdílné rozpustnosti v těchto dvou fázích, což je dáno rozdělovacím koeficientem oktanol/voda. Po ustavení rovnováhy je poměr koncentrací cílové látky v obou fázích konstantní.

Rozdělovací koeficient (distribuční konstanta) je dán vztahem:

$$K_D = c_{\text{org}} / c_{\text{vod}}$$

K_D ... distribuční konstanta

c_{org} ... koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi

c_{vod} ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi

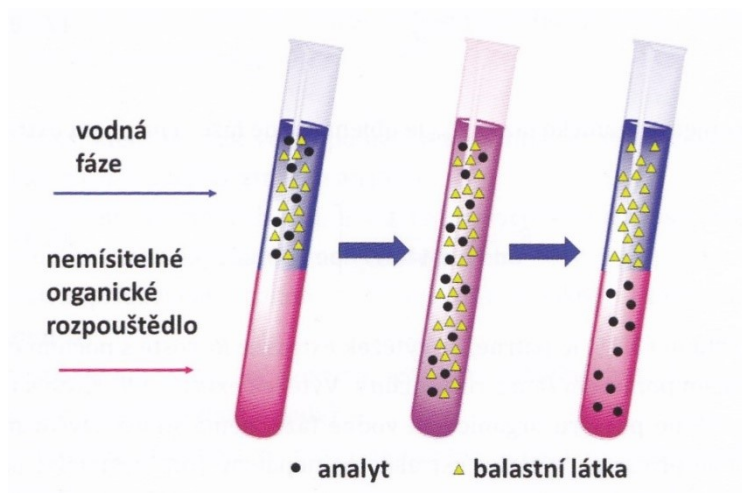
Pro úspěšnou LLE je důležitá správná volba rozpouštědel. Neexistuje však všeobecné pravidlo pro výběr soustavy rozpouštědel, která by byla vhodná pro extrakci určité látky v kombinaci s matricí vzorku. Dále se může účinnost extrakce ovlivnit množstvím extrakčního rozpouštědla, vzájemným poměrem fází, dobou extrakce či změnou pH roztoku vzorku. Tuto extrakci lze využít k dělení a zakoncentrování hlavně organických, ale i anorganických látek z vodných vzorků (např. vitaminů a jejich metabolitů z tělních tekutin) do extrakčního rozpouštědla. Touto technikou lze dosáhnout dvou typů separací:

1. odseparování polárních látek od nepolárních
2. separace polárních sloučenin na kyselé, neutrální a zásadité dle jejich pH

LLE se provádí nejčastěji v dělicí nálevce, ve které jsou obě nemísitelné fáze promíchávány třepáním. Obě oddělené vrstvy mohou být dále použity k další analýze. K zajištění kompletní extrakce analytů do požadované fáze je možné provádět extrakci opakovaně. Mnohem vyšší účinnosti extrakce se dosáhne, extrahuje-li se vícekrát menším objemem organického rozpouštědla, než jednou velkým objemem.

U iontových a amfoterních látek je malá účinnost extrakce do organického rozpouštědla. Proto se v těchto případech využívá iont-párová extrakce pro zvýšení

výtěžnosti a selektivity. Tato metoda je založená na vzniku asociovaných komplexů iontu vzorku a protiiontu opačného náboje. Iontové páry vytvořené mezi velkými organickými anionty a kationy jsou často rozpustné v málo polárních organických rozpouštědlech [69,71,84-85].



Obr.24: Schéma LLE [85]

Hlavním důvodem stálého využívání této techniky je zejména finanční a instrumentální nenáročnost, snadná manipulace, při MS detekci mohou být sníženy matricové efekty díky omezenému přechodu balastních látek z matrice do extrakčního činidla. Mezi nedostatky této metody patří časová náročnost, nedostatečné oddělení jednotlivých vrstev fází, velká spotřeba toxických organických rozpouštědel a produkce velkého objemu odpadu, nízká citlivost a selektivita. LLE je také nevhodná pro extrakci hydrofilních sloučenin.

Při extrakci může také docházet k tvorbě nežádoucích emulzí, kterým je možno předcházet opatrným třepáním či vhodnou volbou rozpouštědel. Po vytvoření emulze můžeme k jejímu odstranění využít několik vhodných metod jako je filtrace (pomalá a při velkém objemech neúčinná), přidavek neutrálních solí (nasycený roztok chloridu sodného či vápenatého), odstředění (při velmi odlišné hustotě rozpouštědel), přidavkem ethanolu, vyššího alkoholu či přípravků na bázi silikonu pro rozbití emulze (polydimethylsiloxan).

Vzhledem k těmto nedostatkům klasické LLE dochází k rozvoji nových, moderních technik, které jsou citlivější, selektivnější, snadněji automatizovatelné, dosahují lepších

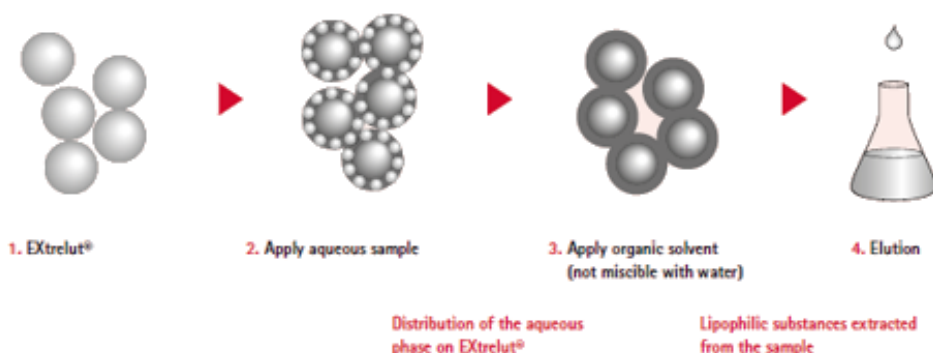
výsledků zakoncentrování analytů než tradiční LLE, hlavní předností je výrazně nižší spotřeba organických rozpouštědel a tím pádem i menší produkce toxických odpadů [67,85-87].

LLE na tuhém nosiči Extrelut

Extrakce lipofilních látek z komplexních matric je nezbytným krokem v rámci čištění vzorku před vlastní analýzou. Extrelut nahrazuje klasickou dělicí nálevku a činí extrakce jednoduššími a efektivnějšími. Hlavní jeho výhody jsou lepší automatizace a při extrakci se netvoří emulze. Avšak vzhledem k opakovanému procesu extrakce nedochází zde k úspoře rozpouštědel ani času.

Extrelut je tvořený speciálně zpracovanou, porézní křemelinou s velkým objemem pórů, která slouží jako tuhý nosič k navázání roztoku vzorku. Křemelina je chemicky inertní a může být použita v rozsahu pH od 1 do 13.

Na začátku extrakce se kapalným vzorkem se nanese na suchou kolonku naplněnou zrnitým nosičem Extrelut. Rozšiřuje se přes chemicky inertní matici jako tenká vrstva a funkčně jako stacionární fáze. Eluce se provádí organickým rozpouštědlem, které je nemísitelné s vodou. Jakmile rozpouštědlo projde přes kolonu, všechny lipofilní sloučeniny jsou extrahovány z vodné fáze do fáze organické (obr.25). Vodná fáze zůstává a v eluátu se netvoří interferující emulze. Látky rozpuštěné v eluátu jsou analyzovány hned nebo po odpaření rozpouštědla. Není potřeba vakuum. Vhodná rozpouštědla – diethyl ether, ethyl acetát, methyl acetát, hexan, cyklohexan, chloroform, dichlormethan [85,88].



Obr.25: Schématické znázornění LLE s Extrelut nosičem [88]

4.3.4. Mikroextrakce kapalnou fází (LLME)

Mikroextrakce kapalnou fází je miniaturizovaná LLE procedura. Vyznačuje se použitím pouhých mikrolitrů rozpouštědel a minimalizací počtu jednotlivých extrakčních kroků, produkcí malého množství toxického odpadu. Jsou používány nejen ve farmaceutické, ale i v potravinářské analýze a analýze životního prostředí. Můžeme však u nich najít i několik nevýhod. Jsou náročnější na manipulaci, vybavení laboratoře a složitost výběru vhodného rozpouštědla. Z těchto důvodů často nenahrazují nové moderní techniky stabilně zavedené konvenční techniky přípravy vzorku v bioanalytických či farmaceutických laboratořích.

Mezi tyto techniky patří několik přístupů LLME: mikroextrakce jednou kapkou (SDME), mikroextrakce do kapalnou fázi s využitím dutého vlákna (HF-LPME), disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME), extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází (SLE) či extrakce využívající elektromembrány (EME). Techniku SDME můžeme podle způsobu provedení dělit na direct immersion (DI-SDME), headspace (HS-SDME), liquidliquid-liquid microextraction (LLLME), continuous-flow microextraction (CFME), drop-in-drop microextraction (DDME) a directly suspended droplet microextraction (DSDME) [89-91].

4.3.4.1. Mikroextrakce jedinou kapkou (SDME, Single-drop microextraction)

Tato technika vyvinuta roku 1996 Jeannotem a Cantwellem [92] je založena na extrakci analytu z kapalnou vzorku do mikrokapky extrakčního rozpouštědla (1-10 μ l) zavěšené na špičce jehly. Po extrakci je mikrokapka vtažena zpět do jehly a může být přímo injikována do chromatografického systému. Tím odpadají kroky odpaření a následného rozpuštění analytu. V porovnání s klasickou LLE došlo ke snížení používaných rozpouštědel o 99%.

Kolísání objemu kapky v průběhu procesu extrakce a nestabilita kapky negativně ovlivňuje přesnost a reprodukovatelnost celého procesu.

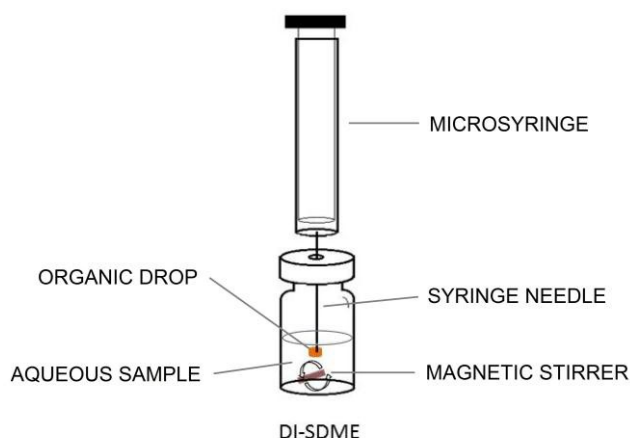
Modifikace SDME:

- 1) mikroextrakce jedinou kapkou pomocí přímého ponoření (DI-SDME, direkt immersion SDME)
- 2) mikroextrakce jedinou kapkou pomocí head-space (HS-SDME, head-space SDME)
- 3) mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (LLLME, liquid-liquid-liquid microextraction)
- 4) mikroextrakce kontinuálního toku (CFME, continuous-flow microextraction)
- 5) mikroextrakce kapka v kapce (DDME, drop-in-drop microextraction)
- 6) mikroextrakce přímo suspendovaná kapka (DSDME, directly suspended droplet microextraction) [89-91,93]

Mikroextrakce jedinou kapkou pomocí přímého ponoření (DI-SDME)

Tato metoda je založena na přímém ponoření mikrokapky organického rozpouštědla nemísitelného s vodou přímo do roztoku vzorku. Mikrokapka o velikosti 0,3 až 3 μl vytvořená na špičce jehly mikrostríkačky je ponořena do roztoku vzorku, který je pro lepší přenos sledovaných analytů intenzivně promícháván magnetickým míchadlem (obr.26). Jako extrakční činidlo (mikrokapka) se používají rozpouštědla nemísitelná s vodou jako toluen, cyklohexan, chloroform či oktan-1-ol. Po stanovené době extrakce je kapka nasáta zpět do jehly mikrostríkačky a poté nastříknuta do chromatografického systému.

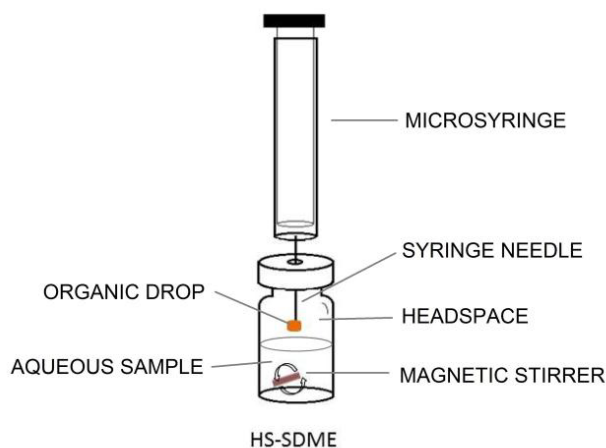
Nevýhodou DI-SDME je nestálost kapky při vyšších rychlostech míchání vzorku, při vyšších teplotách či při nedokonale čistém vzorku. Nevhodná jsou rozpouštědla s relativně vyšší rozpustností ve vodě a nižší teplotou varu z důvodu jejich disoluce a odpařování [93-95].



Obr.26: Schéma DI-SDME [94]

Mikroextrakce jedinou kapkou pomocí head-space (HS-SDME)

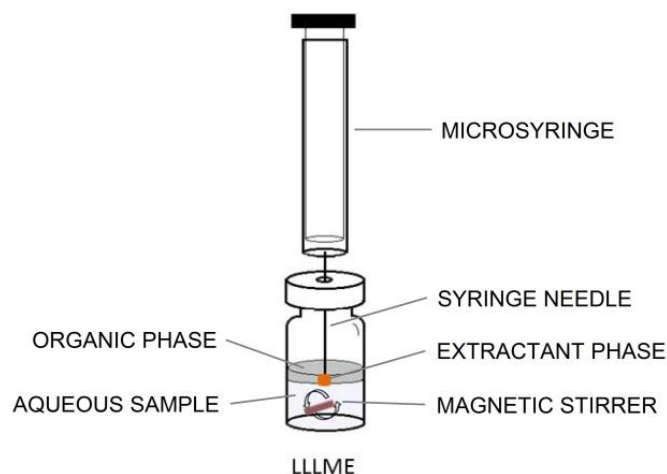
Jedná se o techniku, která umožňuje extrakci a zakoncentrování těkavých analytů do mikrokapky vodného nebo organického rozpouštědla, která visí na konci jehly v prostoru nad vzorkem. Vzorek musí být umístěn ve vzduchotěsné vialce (obr.27). U této techniky je možné provést extrakci a derivatizaci v jednom kroku, kdy mikrokapka na hladinou vzorku obsahuje i derivatizační činidlo. Proces přenosu analytů ze vzorku do extrakčního činidla je urychlen mícháním pomocí magnetického míchadélka. Výhodou této techniky oproti DI je, že nehrozí utržení či rozpuštění mikrokapky a je možné použít větší rozsah extrakčních rozpouštědel. Tento typ extrakce se nejčastěji používá k přípravě vzorků pro GC a je možné celý proces extrakce automatizovat. Avšak je tato metoda vhodná pouze pro omezené množství analytů, které musí být těkavé [93-95].



Obr.27: Schéma HS-SDME [94]

Mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (LLLME)

Poprvé byla tato technika extrakce vhodná pro ionizovatelné látky použita r. 1998 autory Ma a Cantwell [97]. Tato jednoduchá, reprodukovatelná a selektivní metoda je založena na principu extrakce analytu z vodného roztoku do organického rozpouštědla s nižší hustotou než má vodný vzorek a reextrakce do vodné mikrokapky umístěné v této vrstvě (obr.28). Během tohoto procesu je potřeba upravit pH vodného roztoku vzorku s cílovými analyty z neutrální formy (extrahovatelné do vrstvy organického rozpouštědla) do ionizované, kdy analyty přecházejí do vodné mikrokapky. Kapka je dále analyzována separačními technikami jako HPLC či CE [93-95].

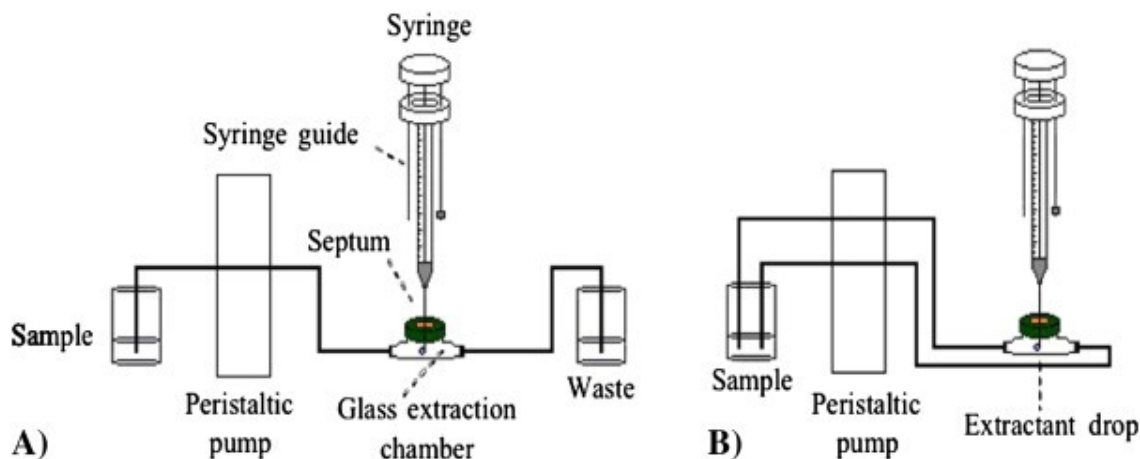


Obr.28: Schéma LLLME [94]

Mikroextrakce kontinuálního toku (CFME)

Tato technika byla poprvé představena v r. 2000 [98]. Jedná se o dynamickou mikroextrakci probíhající ve speciální skleněné extrakční nádobce, do které je zavedena mikropipetka rozpouštědla umístěna na jehle mikrostríkačky. Vzorek s analyty je místo míchání pumpován peristaltickou pumpou kontinuálně a konstantní rychlostí přes extrakční komoru do odpadu a do mikropipetky se extrahují sledované analyty (obr.29 A). Na rozdíl od ostatních SDME technik je zde mikropipetka extrakčního rozpouštědla v kontaktu s neustále novým, proudícím roztokem vzorku. Díky tomuto nepřetržitému kontaktu je účinnost extrakce vyšší, než u statických extrakcí. Vzhledem ke kontinuálnímu toku je potřeba větší množství vzorku. Nevýhodou této techniky je větší spotřeba roztoku vzorku, případně poměrně krátká doba expozice extrakčního činidla s roztokem vzorku.

Xia a kol. [99] upravili tuto techniku tak, aby vzorek nebyl pumpován do odpadu, ale zpět do extrakční nádoby. Díky tomu vzorek cirkuluje a dochází k opětovnému kontaktu vzorku s analyty s mikropipetkou extrakčního rozpouštědla (obr.29 B). Tím se zvýší účinnost extrakce a sníží se spotřeba vzorku. Tato modifikace se nazývá cycle-flow microextraction (mikroextrakce kruhového průtoku).



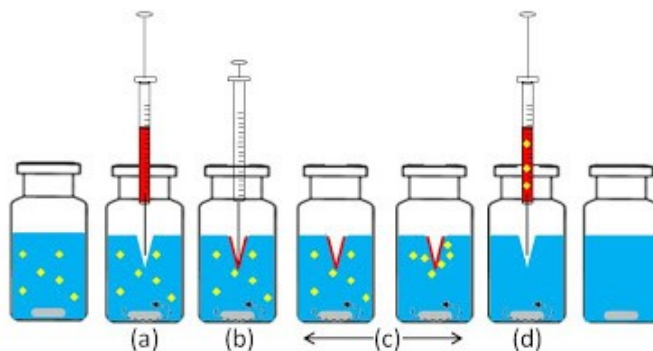
Obr.29: Schéma A) CFME , B) cycle-flow microextraction [96]

Mikroextrakce kapka v kapce (DDME)

Principem této mikroextrakce je vsunutí mikrostříkačky, která je naplněna organickým rozpouštědlem (přibližně 1 μ l), a vytlačení mikrokapky tohoto rozpouštědla do kapky vodného vzorku. Kapka se po ukončení extrakce zatáhne zpět do jehly a extrahovaný vzorek se nastříkne do detekčního systému. Tuto metodu poprvé popsali Liu a Dasgupta [100].

Mikroextrakce přímo suspendované kapky (DSDME)

Roztok vzorku je neustále míchán míchadlem na dně vialky (obr.30a). Na povrch vzorku je přidáno malé množství extrakčního činidla nemísitelného s vodou (obr.30b). Po smíchání vzorku a činidla se začnou vytvářet kapičky činidla, které se díky neustálému míchání shluknou v jedinou kapku na hladině vodného vzorku (obr.30c). Poté se kapka odsaje (obr.30d) a analyzuje v chromatografickém systému [101].

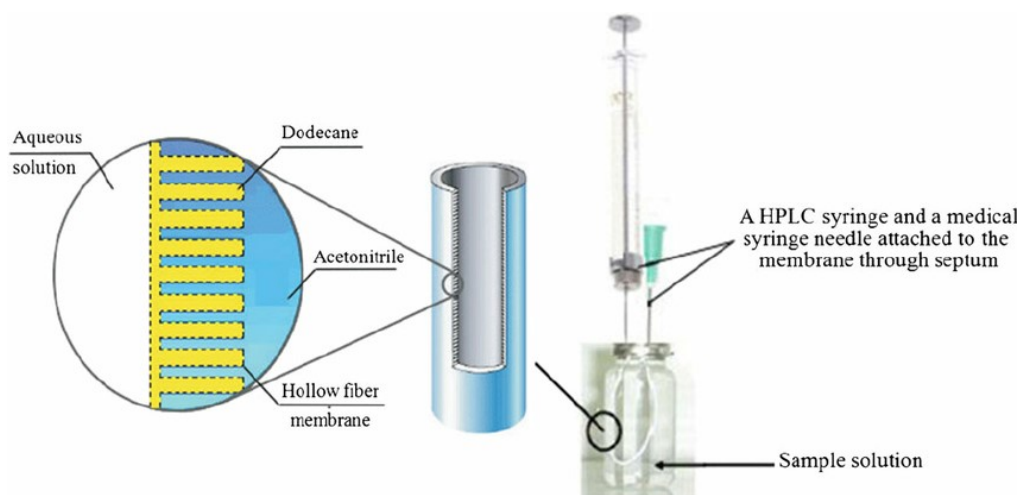


Obr.30: Schéma DSDME [102]

4.3.4.2. Mikroextrakce do kapaln  fáze s využitím dutého vlákna (HF-LPME, hollow fibre liquid phase microextraction)

Při této metodě jsou sledované analyty extrahovány ze vzorku skrz organickou fázi s vodou nemísitelného rozpouštědla imobilizovaného v p rech dutého vlákna, kter  má charakter membrány, do kapaln  fáze uvnitř dutého vlákna. Tato porézní membrána nejen mechanicky chrání a stabilizuje extrakční činidlo, ale i zvětřuje povrch mezi organickou a vodnou fází, a tím zvyšuje činnost extrakce. Existují dva typy mikroextrakce vyuřivaj c  dutého vlákna, a to dvouf zov  a tř f zov  uspořádání. Princip dvoufázového uspořádání spočívá v extrakci analytu z vodn  fáze, ve které je ponořeno dut  vlákno, do fáze organick , kter  tvoří jak lumen membrány tak i samotnou membránu. V př pad  třífázového uspořádání je analyt z vodn  fáze extrahován přís membránu tvořenou organick m rozpouštědlem (tzv. supported liquid membrane - SLM) do vodn ho roztoku, kter m je naplněn lumen dutého vlákna (obr.31). Někdy je tato mikroextrakce nazyv na hollow-fibre supported liquid membrane extraction. Pro následnou analýzu se extrakční činidlo odsaje mikrostříkačkou.

K výhodám této mikroextrakce patří velmi mal  spotřeba rozpouštědel, využitelnosti pro širok  rozsah analytů, získání čistého extrakt, díky malé velikosti p růbr n c m přechodu látek o v tř  molekulo v  hmotnosti, mořnost automatizace [103-104].

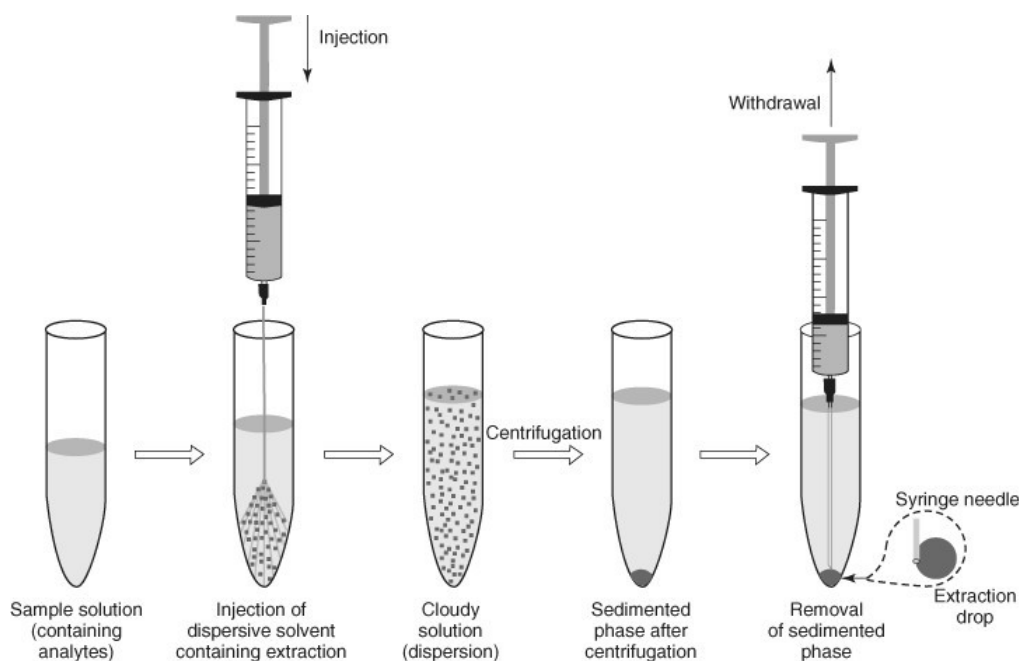


Obr.31: Schéma HF-LPME [105]

4.3.4.3. Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME, Dispersive liquid-liquid microextraction)

Tuto metodu poprvé představili ji Rezaee, Assadi a kolektiv v roce 2006 [106]. Používá se zde tříložkový systém rozpouštědel tvořený vodným roztokem obsahující cílové analyty, extrakčním činidlem a disperzním rozpouštědlem. Zatím co je extrakční činidlo nemísitelné s vodou (chlorbenzen, chloroform, sirouhlík), disperzní činidlo (methanol, acetonitril, aceton) musí být mísitelné jak s vodou, tak s extrakčním činidlem. Směs těchto rozpouštědel je rychle vstříknuta do roztoku vzorku, kde za mírného míchání vzniká oblak rozpouštědel. Směs je poté centrifugována, jemné kapičky extrakční fáze sedimentují na dně zkumavky, odkud jsou odsáty mikrostříkačkou a analyzovány vhodnou separační metodou (obr.32).

Výhodou DLLME je jednoduchost provedení, rychlost, nízké náklady, malá spotřeba organických rozpouštědel, poměrně vysoká výtěžnost a možnost zakoncentrování analytu. Existuje však pouze omezený výběr vhodných rozpouštědel splňující všechny podmínky extrakce [106-108].

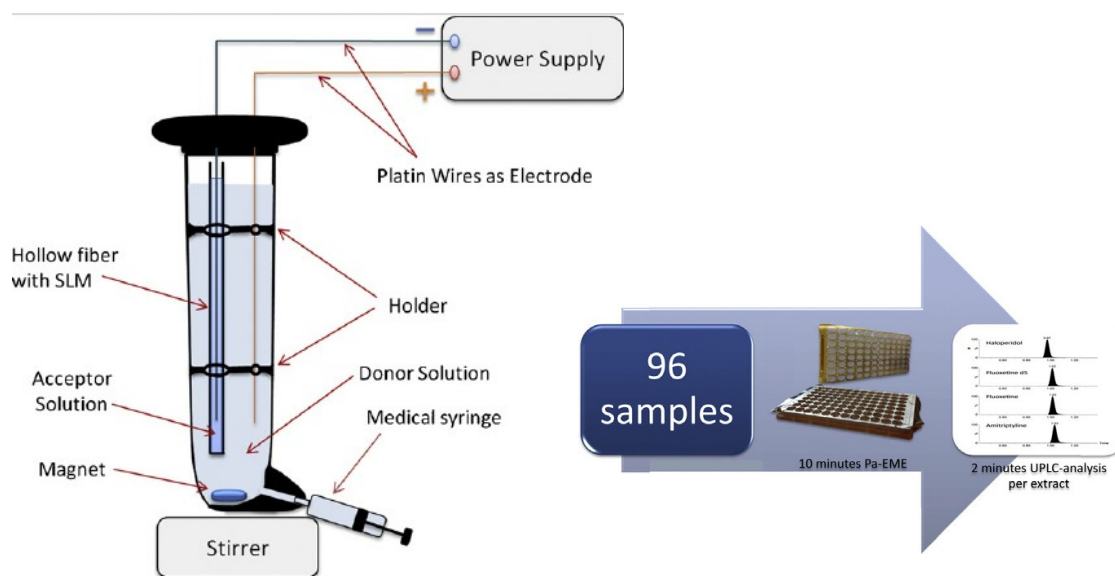


Obr.32: Schéma DLLME [109]

4.3.4.4. Elektromembránová extrakce (EME, Electromembrane extraction)

Tento typ extrakce je odvozen od HF-LPME, kdy je místo pH gradientu použit k přestupu analytů přes podpůrnou kapalnou membránu stejnosměrný elektrický potenciál (1 – 300 V). Jedna elektroda je ponořena ve vzorku a druhá elektroda je umístěna v extrakčním činidle. Nabité analyty nacházející se ve vodném vzorku jsou přitahovány skrz kapalnou membránu obsahující organické rozpouštědlo k opačně nabitě elektrodě ve vodném akceptorovém roztoku umístěném uvnitř dutého vlákna (obr.33).

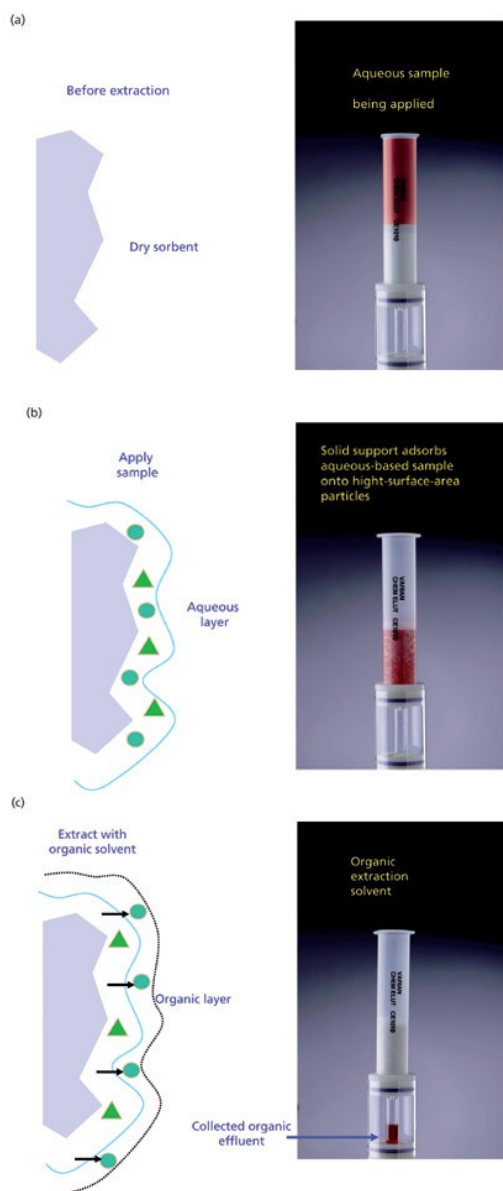
K přenosu nabitých analytů přes organickou membránu dochází v relativně krátkém čase (obvykle méně jak 5 minut). Mezi další výhody EME patří nízká spotřeba organických rozpouštědel, membrána je navíc dobrou bariérou pro extrakci balastních složek matrice, velice vhodná k přečištění a zakoncentrování vzorku, možnost použití pro širokou škálu matric včetně biologického materiálu. K extrakce až 96 vzorků byla vyvinuta paralelní EME (Pa-EME) využívající dutá vlákna v 96 jamkového formátu. Jako elektrody byly použity hliníkové fólie na akceptorové i donorové destičce [110-111].



Obr.33: Schéma EME a možnost využití EME v mikrotitrační destičce s 96 pozicemi tzv. paralelní EME [111,112]

4.3.4.5. Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází (SLE, supported liquid extraction)

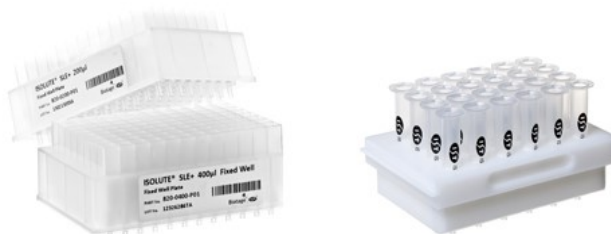
Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází využívá stejné vodné fáze jako u LLE, která je nanesena na inertní křemelinu, ale namísto protřepání obou nemísitelných



fází, organická fáze prochází kolonou. Oproti LLE nabízí SLE mnoho výhod jako vyšší účinnost extrakce, netvoří se emulze, nižší časová náročnost, snadná automatizace, nižší spotřeba organických rozpouštědel.

Pro extrakci se používá kolonka nebo destička až s 96 pozicemi (obr.35), ve kterých je uložena křemelina. Křemelina s velkým množstvím pórů slouží jako inertní nosič pro adsorpci vodných vzorků s obsahem analytů. Vodný vzorek např. plazma je nanesena na suchý sorbent. Poté se přidá organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou, stejně jako v LLE. Vodný vzorek utvoří tenký film po celé délce inertního nosiče, má tak dost velký povrch pro kontakt s organickou fází, do které přecházejí cílové analyty (obr.34). Závěrečným krokem je sběr organické fáze s extrahovanými analyty k následné analýze [87, 113-115].

Obr.34: SLE [115]



Obr.35: Destička a kolonky pro SLE [116]

4.3.5. Extrakce na pevné fázi (SPE)

SPE extrakce je založena na principu rozdělování cílového analytu mezi tuhou a kapalnou fází. Pevnou fází je sorbent, který slouží k zachycení a zakoncentrování analytů z kapalnou fází. V dnešní době může mít sorbent mnoho různých tvarů a velikostí, např. kolonky z polypropylenu nebo ze skla, disky, špičky či miniaturní disky v polypropylenové destičce (obr.36) využívajících různých mechanismů retence analytů. Kapalnou fází je nanášený vzorek se sledovaným analytem. U účinné SPE extrakce musí být splněna podmínka vyšší afinity analytu k pevné fázi neboli sorbetu než k matrici kapalného vzorku. Výběr vhodného sorbetu je tudíž klíčovým krokem při optimalizaci SPE.



Obr.36: Různá provedení SPE sorbetů [117]

Mezi běžně používané SPE sorbenty patří silikagel modifikovaný dlouhými uhlíkatými řetězci (C8, C18), iontově výměnné materiály, imunosorbenty, polymery, nebo vysoce specifické sorbety jako materiály s omezeným přístupem (RAM) či molekulárně vtištěné polymery (MIP).

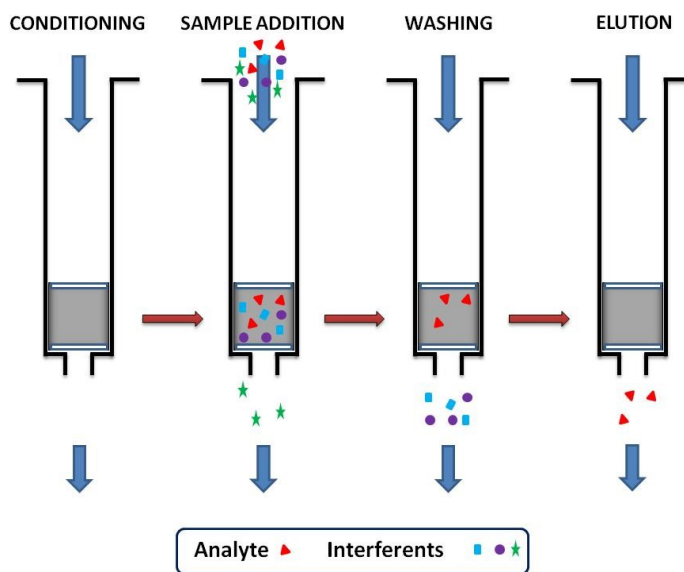
Hlavní výhodou oproti LLE je menší spotřeba organických rozpouštědel, potřeba menších objemů vzorků, jednoduchost provedení, možnost zakoncentrování a přečištění extraktu, selektivita a snadná automatizace.

Technika má však i své nevýhody, mnohakrokový proces, relativní časová náročnost, jednorázové použití kolonek (cenově náročné), nutnost instrumentálního vybavení (SPE manifold a vakuová pumpa), snížená reprodukovatelnost výroby kolonek

mezi šaržemi, matricové efekty. Při modernizace postupu SPE extrakce byly některé tyto nedostatky odstraněny.

Postup SPE lze rozdělit na několik jednotlivých kroků (obr.37):

1. kondicionace (smočení a aktivaci sorbetu) – provádí se nanesením doporučeného rozpouštědla o definovaném objemu na extrakční sorbent
2. aplikace vzorku - vzorek se sledovanými analyty je nanesen na pevnou fázi, při průchodu vzorku touto fází dochází k zachycení cílového analytu na sorbent
3. promytí sorbetu – při nanesení vhodného rozpouštědla na sorbent se mají odstranit kontaminanty matrice, zatímco analyt zůstává vázaný na pevnou fázi
4. eluce analytu - poslední krok extrakce, izolovaná látka se desorbuje, uvolňuje se z pevné fáze vhodným elučním činidlem, ve kterém se analyt dobře rozpouští



Obr.37: Jednotlivé kroky SPE [118]

Extrakce pomocí SPE může být prováděna jednak automaticky, manuálně či on-line umožňující přímé spojení s kapalinovým chromatografem.

SPE nachází využití zejména v přípravě kapalných vzorků, k extrakci a zakoncentrování netěkavých analytů, používá se však také k před-extrakci pevných vzorků do rozpouštědla.

I když má mnoho nevýhod, je SPE extrakce nejspíše nejpoužívanější metodou k úpravě vzorku před konečnou analýzou [71,87,118, 119].

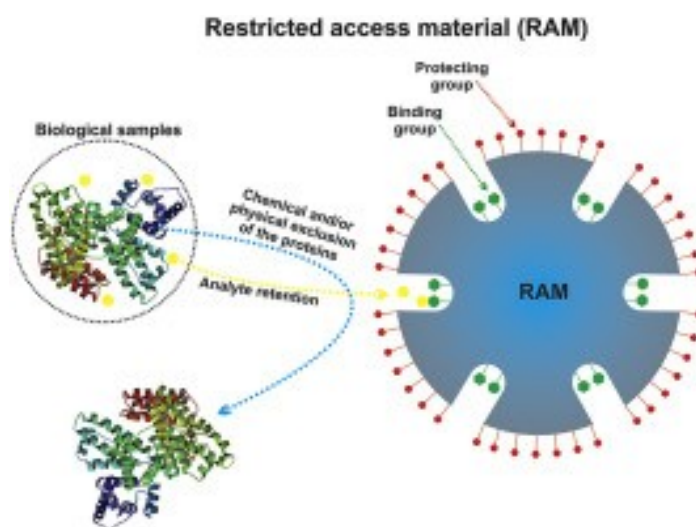
4.3.5.1. Moderní přístupy SPE

Materiály s omezeným přístupem (RAM, restricted access material)

Tato technika využívá materiály s omezeným přístupem k zachycení nízkomolekulárních analytů uvnitř pórů, zatímco makromolekuly jako např. proteiny jsou odstraněny. Tyto materiály umožňují přímý nástřik biologického materiálu do chromatografického systému bez jeho předchozí úpravy.

Vnitřek pórů je přístupný pouze pro malé molekuly, kde jsou zadrženy díky tradičním retenčním mechanismům, jako např. hydrofobní a elektrostatické interakce. Makromolekuly nemohou vstoupit do pórů základě svých fyzikálně-chemických vlastností (velikost, povrchové interakce), tím jsou brzy eluovány z kolony ven (obr.38). Často jsou jimi naplněny předklonky, chránící vlastní analytickou kolonu před poškozením.

Tyto materiály lze použít k purifikaci a zakoncentrování stanovovaných analytů, často jsou využívány v bioanalýze léčiv [67,120].



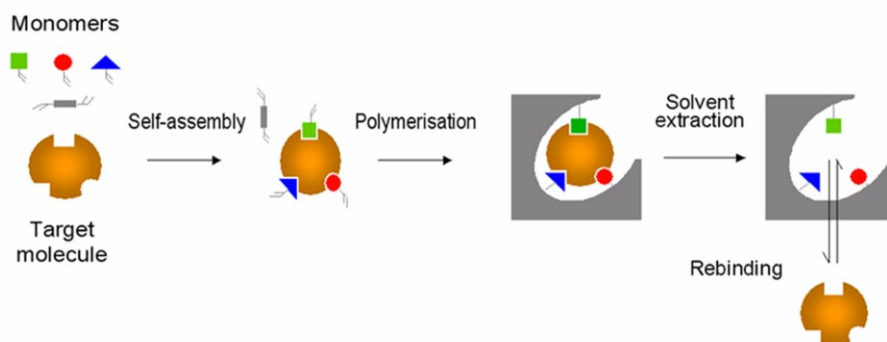
Obr.38: RAM sorbent [120]

Molekulárně vtištěné polymery (MIPs, molecularly imprinted polymers)

Jedná se o vysoce selektivní materiály připravené na míru daného analytu. Ze speciálních syntetický polymerů se mnohokrokovým procesem vyrobí dle konkrétních molekul pro které mají být použity a to tak, že jim dané molekuly vytvářejí tzv. předlohu – templát. Nejprve dojde ke vtisknutí jednoho či více monomerů, které polymerují, poté se templát odstraní. Vzniklý stabilní polymer obsahuje dutiny, které jsou sféricky (velikostně a tvarově) a chemicky odpovídající molekulám templátu (obr.39).

SPE extrakce využívající tyto sorbenty mohou být prováděny jak v off-line, tak on-line režimu. Hlavní výhoda oproti klasické SPE je samozřejmě vysoká selektivita extrakce, dále pak stabilita a možnost opakovaného použití. Nevýhodou je nízká kapacitu sorbentu díky malému počtu specifických vazebných míst.

Tyto vysoce selektivní SPE sorbenty MIPs jsou v současnosti používány zejména k extrakci léčiv a jejich metabolitů z biologického materiálu [122-123].



Obr.39: Příprava MIPs [124]

Imunoafinitní SPE

U této techniky je SPE kolonka naplněna vysoce selektivním imunosorbentem s navázanými protilátkami proti cílovému analytu. Extrakce z matrice (nejčastěji biologické) probíhá na základě reakce antigen-protilátka.

Princip extrakce je shodný s SPE. Na imunosorbent se nanese vzorek, cílové analyty jsou zadrženy vazbou na specifickou protilátku, poté se sorbent promyje vhodným rozpouštědlem, čímž se odstraní balastní látky a nakonec se eluuje zadržovaný analyt z vazby na protilátku vhodným rozpouštědlem [125].

4.3.6. Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)

Byla vyvinuta v roce 1990 Arturem a Pawliszynem [126]. MEPS je jednoduchá a efektivní technika adsorpce a desorpce polárních i nepolárních analytů z různých typů matric bez použití organických rozpouštědel.

Rozlišujeme 2 základní módy SPME:

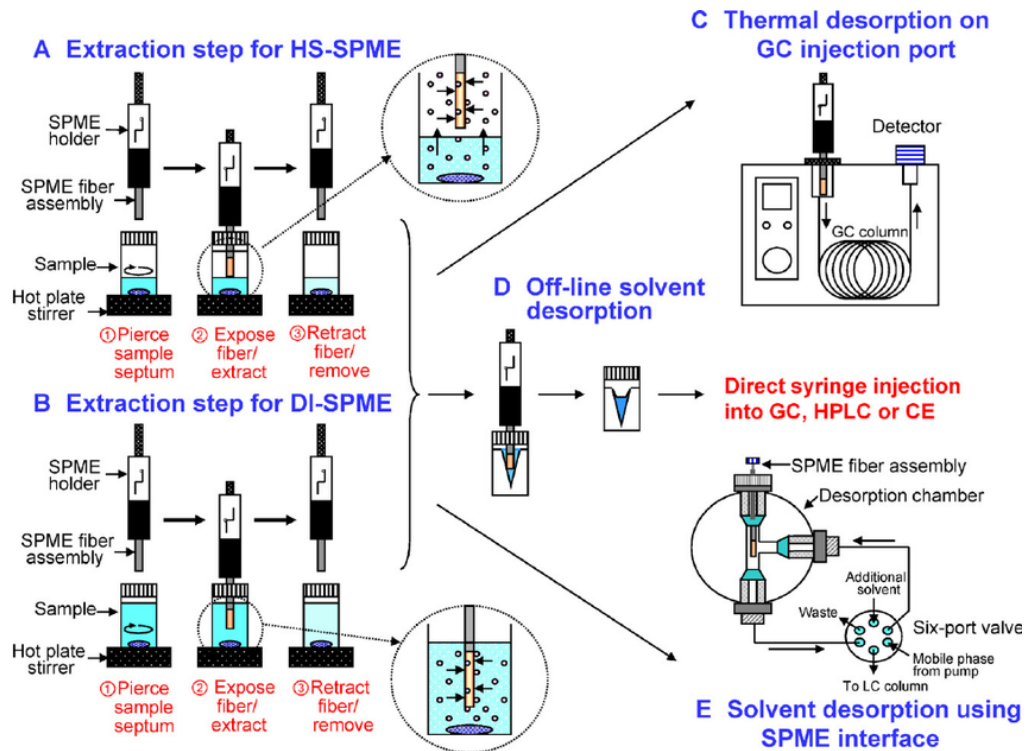
- SPME pomocí vlákna (fiber SPME)
- SPME v kapiláře (in tube SPME)

4.3.6.1. Fiber SPME

V prvním kroku mikroextrakce na pevné fázi se analyty z matrice vzorku adsorbují na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno. Toto vlákno je na povrchu pokryto organickým polymerem (obvykle polydimethylsiloxanem). Aby nedošlo k mechanickému poškození je chráněno kovovou jehlou. Jehla s vláknem se ponoří do prostoru se vzorkem. Existují dvě možnosti provedení. Pokud je vlákno ponořeno přímo do vzorku, jedné se o direct immersion SPME (DI-SPME), a nebo probíhá extrakce těkavých analytů z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě jde o headspace variantu (HS-SPME). Po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno zatáhne do jehly a přesune do chromatografu. V nástřikovém prostoru se vlákno opět vysune z jehly ven a nastává desorpce zadržených sledovaných analytů do separačního systému. Na obr. 40 jsou znázorněny obě možnosti provedení SPME.

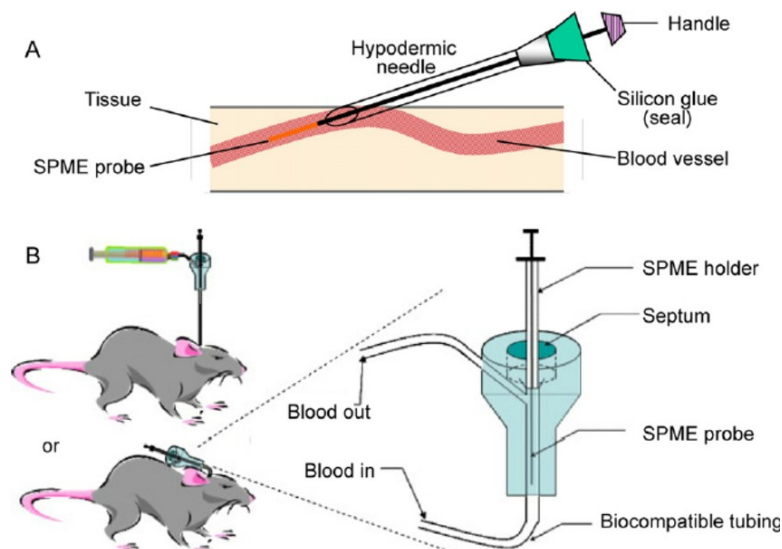
Klíčová složka celé extrakce je stacionární fáze pokrývající křemenné vlákno. Nejčastěji je pokryta polydimethylsiloxanem (PDMS) pro extrakci nepolárních analytů, polyakrylátem (PA) pro extrakci polárních analytů, polydimethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS-DVB) pro extrakci polárních analytů, dále se nově využívají nanomateriály či vysoce selektivní sorbety MIPs,

Tato technika přináší výhody jako je jednoduché a rychlé provedení, vysoká citlivost a snadná automatizace.



Obr.40: Extrakční mechanismus A) HS-, B) DI-SPME s možnostmi C) termální desorpce D) off-line desorpce rozpouštědlem E) desorpce rozpouštědlem [127]

Dalším trendem ve vývoji SPME je *in vivo* SPME, která umožňuje studii dynamických chemických procesů přímo v živém systému. Existuje také ve dvou uspořádání buď HS- nebo DI- SDME. SDME sonda může být zavedena přímo do žíly k monitorování koncentrace léčiv (obr.41). Po vyjmutí z žíly je jehla napojena na chromatografický systém. Je tedy zabráněno přímému kontaktu s biologickým materiálem [127-129].



Obr.41: *In vivo* SPME s aplikací sondy přímo do žíly [127]

4.3.6.2. In-tube SPME

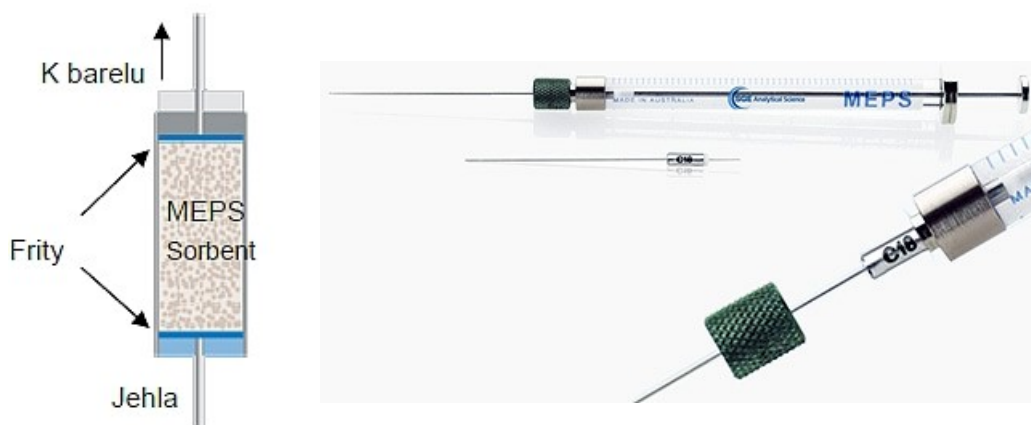
Tato technika využívá místo vlákna otevřenou křemíkovou kapiláru, čímž je zjednodušeno napojení na chromatografický systém. Vniřní povrch těchto kapilár je pokryt sorbentem z různých materiálů, záleží na konkrétní aplikaci. Vzorek je během extrakce několikrát nasáván a vypouštěn skrz kapiláru, kde dojde k zadržení analytů na stacionární fázi. Mobilní fáze poté desorpuje zachycené analyty z kapiláry na separační kolonu HPLC.

Dříve byly pro extrakci používány GC kolony, dnes je dostupné kapiláry naplněné různými sorbety, pro širokou škálu analytů. Kapilára může být plněna částicovým sorbentem, který je však postupně vytlačován monolitickým sorbentem generující nižší zpětný tlak než částicová fáze dále MIP částicemi či imunoafinitním sorbentem.

Využívá se hlavně v bioanalýze (léčiva), v analýze potravin, pro monitoring životního prostředí, ve forenzní analýze, farmaceutickém průmyslu, kde vyniká zejména velmi snadnou automatizací, rychlou extrakcí, vyšší přesností a selektivitou než off-line techniky a nízkou cenou [130,131].

4.3.7. Mikroextrakce tuhým sorbentem umístěným v mikrostríkačce (MEPS, microextraction by packed sorbent)

Poprvé byla tato metoda představena v roce 2004 Abdel-Rehimem a jeho spolupracovníky. Jedná se vlastně o miniaturizovanou verzi klasické SPE, která pracuje s objemy v řádech mikrolitrů. Extrakční sorbent je ve formě cartridge umístěn přímo na jehle, která je připevněna na mikrostríkačku o objemu 100 – 500 μ l (obr.42). Mikrostríkačka může být ovládána ručně, automatickou pipetou či online napojena na vhodnou separační techniku. V současnosti je poměrně široký výběr extrakčních fází zahrnující materiály na bázi silikagelu (C_2 , C_8 , C_{18} a SCX), polymerní, RAM či MIPs sorbenty.



Obr.42: Zařízení pro MEPS – mikrostríkačka a jehla se sorbentem [134,135]

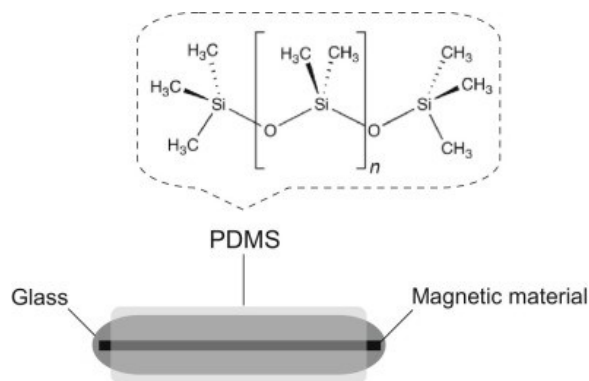
Postup extrakce na MEPS je shodný s extrakcí SPE. Vzorek s analyty je mikrostríkačkou natažen přes cartridge se sorbentem, kde dojde k adsorpci analytů. Pomocí vhodných promývacích rozpouštědel jsou z pevné fáze odstraněny kontaminanty. V posledním kroku dojde k vymytí adsorbovaných analytů z pevné fáze vhodným elučním činidlem. Získaný eluát může být přímo dávkován do chromatografického systému. Vzorek může být opakovaně nasáván a vypouštěn, což umožňuje jeho zakoncentrování.

Vzhledem k tomu, že MEPS mikrostríkačky jsou určeny pro opakované použití, je nutné mezi jednotlivými extrakcemi jehlu se sorbetem účinně promýt, aby se zabránilo kontaminaci následujících upravovaných vzorků. Jedna cartridge se sorbentem může být použita, dle typu matrice, na desítky až stovky extrakcí.

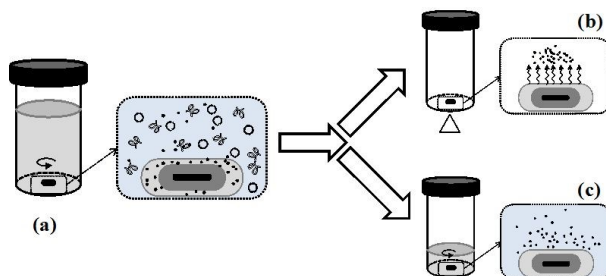
Hlavními přednostmi MEPS techniky oproti SPE jsou zkrácení času přípravy vzorku (1 – 2 min.), výrazné snížení spotřeby organických rozpouštědel i spotřeby vzorku (v řádech mikrolitrů), dále vysoká citlivost, selektivita, přesnost, možnost plné automatizace i on-line spojení se separačním zařízením. Úprava vzorku touto metodou je vhodná pro komplexní biologické matrice jako je plazma či moč [67,71,132-133].

4.3.8. Sorpční extrakce míchadlem (SBSE, stir bar sorptive extraction)

Tato extrakční technika využívá stejný princip jako SPME, s tím rozdílem, že vrstva extrakčního sorbetu není nanesena na vlákne, ale na magnetickém míchadle. Magnetické míchadlo, které je ponořené přímo ve vzorku s analyty, je pokryto vrstvou sorbentu (nejčastěji PDMS, polydimetylsiloxan – obr.43). Tato vrstva sorbetu je oproti vrstvě extrakční fáze u SPME mnohem silnější (0,3-1 mm silná, 50-250x silnější), díky tomu má tato technika vyšší extrakční účinnost.



Podmínky extrakce závisí zejména na Obr.43: Míchadélko potažení PDMS [137] objemu vzorku, rychlosti míchání, velikosti míchadla (resp. množství sorbentu), na extrahovaném analytu, typu matrice vzorku, proto musí být metoda pro každý typ použití optimalizována. Po zadržení sledovaných analytů na míchadle probíhá desorpce buď termálně (u GC analýzy, obr. 44 b) nebo rozpouštědlem (u HPLC analýzy, obr. 44 c).



Obr.44: Schéma SBSE a) sorpce analytů na míchadélko, b) termální desorpce c) desorpce rozpouštědlem [140]

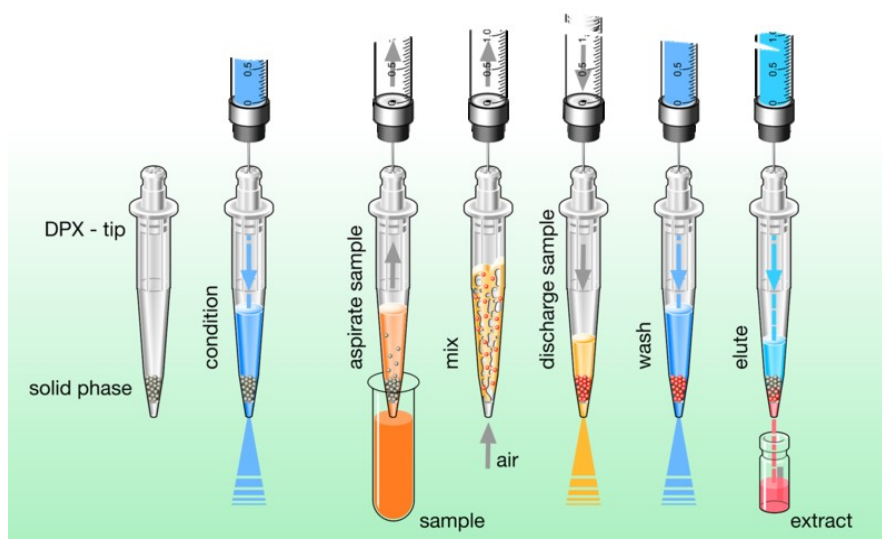
Mezi hlavní výhody SBSE techniky patří jednoduchost provedení a malá spotřeba organických rozpouštědel, vyšší citlivost oproti SPME. Naopak nevýhoda je pomalejší proces desorpce (30 – 150 minut), omezené množství cílových analytů, kdy tuto techniku nelze použít pro polární analyty. V tomto případě musí být provedena in-situ derivatizace.

Nachází využití zejména v analýze životního prostředí, potravin a bioanalýze např. léčiv z krve a moči [67,136-139].

4.3.9. Extrakce pomocí naplněných špiček pipet (DPX, disposable pipette tip extraction)

Další modifikací klasické SPE je extrakce, kdy je sorbent umístěný mezi dvěma fritami v pipetovací špičce. Extrakční proces je shodný s SPE. V prvním kroku se sorbent ve špičce aktivuje, poté se nasaje vzorek s analyty, který prochází sorbetem. Díky opakovanému kontaktu vzorku se sorbetem je tato extrakce mnohem účinnější než SPE. Poté se extrakční špička promyje a odstraní se nežádoucí balastní látky. Cílový analyt je zachycen sorbetem, ze kterého je vhodným elučním rozpouštědlem uvolněn. Rozpouštědlo s extrahovanými analyty může být injikováno do chromatografického systému nebo odpařeno a rekonstituováno jiným rozpouštědlem. Dostupné jsou různé typy sorbentů jako např. monolitické sorbenty, C8 a C18, polymerní či iontově-výměnné fáze.

DPX představuje jednoduchou, efektivní, s malou spotřebou rozpouštědel, finančně nenáročnou metodu pro separaci a extrakci analytů z různých matric, kterou lze automatizovat. Špička je ale na rozdíl od MEPS sorbentu použitelná pouze jednou. Limitující je omezené množství druhů extrakčních sorbentů [71,141].



Obr.45: Schéma DPX [142]

4.4. CHROMATOGRAFICKÉ METODY

4.4.1. Historie chromatografie

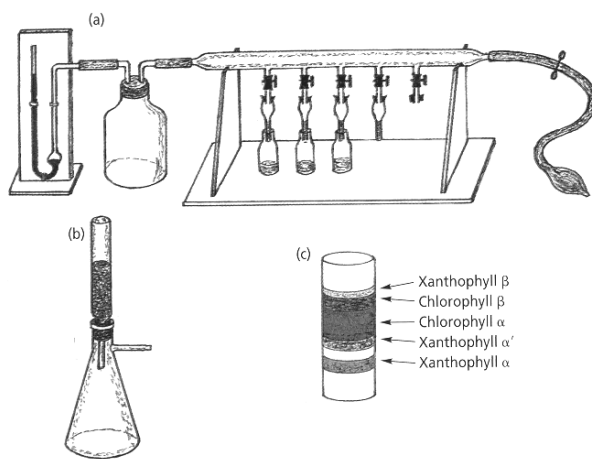
Již je to přes sto let, kdy byla poprvé popsána separační technika chromatografie. Tuto metodu objevil ruský botanik Michail Semjonovič Cvět (obr.46), který oddělil z rostlinných extraktů různě barevné pigmenty – chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Termín chromatografie vznikl spojením dvou řeckých slov: chroma = barva (cvět znamená v ruštině také barva) a graphein = psaní.

Postupoval tak, že velmi pomalu filtroval roztok látek určených k dělení (směs listových barviv) ve vhodném rozpouštědle sloupcem (kolonkou) obsahujícím jeden z vybraných nerozpustných práškových adsorbentů (např. uhlíčan vápenatý). Směs látek se adsorbovala ve formě úzkého proužku v horní části sloupce (obr.47). Pak sloupec



promýval vhodným rozpouštědlem (eluentem), přičemž se jednotlivé složky směsi vymývaly skrz sloupec různou rychlostí podle své adsorbovatelnosti. Tak vznikla

Obr.46: MICHAIL SEMJONVIČ CVĚT (1872–1919) [145]



řada od sebe oddělených barevných vstev. Po rozdělení byl sloupec vytlačen z nádobek, nařezán podle barvy a látky adsorbované na pevné fázi vyextrahovány do roztoku. Tato metoda byla na svou dobu velice inovativní a po dlouhou dobu zůstávala zapomenuta.

Obr.47: První kapalinový chromatograf sestavený Cvětem v roce 1903 pro dělení chlorofylů [143]

Teprve roku 1931 začíná pozvolný nástup objevů, které vyvrcholily vypracováním metodiky papírové chromatografie jako jedné z forem rozdělovací chromatografie. Při své práci Martin a Synge použili pro udržení vodné fáze celulózu, která ji na sebe naváže. Za zavedení rozdělovací chromatografie obdrželi v roce 1952 Nobelovu cenu [143-144].

4.4.2. Rozdělení chromatografických metod

Chromatografie je separační metoda použitelná k analytickým i preparativním účelům, při které se dosahuje rozdělení směsi na základě rozdílné distribuce dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze - nepohyblivé (stacionární) a pohyblivé (mobilní). Při této metodě se využívá mnohokrát opakované ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Stacionární fázi může tvořit pevná látka nebo kapalina zachycená v pevném porézním materiálu (nosiči). Přehled chromatografických metod je znázorněn v tabulce 4.

Chromatografické metody můžeme klasifikovat dle různých kritérií:

A) Podle uspořádání stacionární fáze se rozlišuje chromatografie

- Sloupcová (kolonová) – stacionární fází je sorbent, kterým je naplněna kolona a skrz ní protéká mobilní fáze.
- Plošná (planární), která je reprezentována chromatografií papírovou a chromatografií tenkovrstvou, stacionární fáze je nanášena na tenkou vrstvu, pohyb mobilní fáze je způsoben nejčastěji vztlínáním.

B) Podle typu interakcí se rozlišuje chromatografie

- Adsorpční – stacionární fáze je sorbent, nejběžnějšími používanými sorbenty jsou silikagel, oxid hlinitý a křemelina. Povrch těchto látek obsahuje polární skupiny schopné interakce s různými skupinami. Separace je založena na různé afinitě složek ve vzorku k povrchu stacionární fáze.
- Rozdělovací – stacionární fází je zakotvená kapalina, k dělení látek dochází na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů, který udává poměr rozpustnosti látky mezi dvěma kapalinami.
- Gelová - stacionární fází jsou zrnka gelu s různě velkými póry, která fungují jako molekulární síto pro molekuly do určité velikosti, látky se dělí dle velikosti a tvaru, malé molekuly vstupují do dutin gelu, tím zůstávají déle na koloně, zatímco velké makromolekuly tato zrna obtékají, nedochází k jejich zadržování a proto se eluují jako první.

- Iontově výměnná - stacionární fázi je iontoměnič, je založena na interakci nabitých analytů s opačně nabitými ionty ve stacionární a mobilní fázi.
- Afinitní - stacionární fázi je zakotvená liganda s vysokou afinitou k jednomu typu molekul, jsou založeny na specifických sorpcích, afinitní molekuly se zachytí na stacionární fázi a molekuly bez afinity projdou kolonou bez jakékoliv interakce.

C) Podle skupenství mobilní fáze:

- Kapalinová chromatografie – mobilní fáze je kapalina (organická rozpouštědla, voda a jejich směsi, pufr), základem separace látek kapalinovou chromatografií lze považovat různou afinitu složek vzorku k mobilní a stacionární fázi. Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC, využívající vysokých tlaků. Do proudu mobilní fáze je pomocí vysokotlaké pumpy dávkován vzorek se sledovanými analyty, který je dále unášen do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány.

Dle polaritý fází se LC dělí na:

- a) chromatografii na normálních fázích – stacionární fáze je polární, mobilní fáze je nepolární.
 - b) chromatografii na reverzních fázích – stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární. Jedná se o nejpoužívanější LC techniku.
- Plynová chromatografie - mobilní fáze je plyn (argon, helium, dusík), vzorek s těkavými analyty se nastříkne do temperované nástřikové komory, kde se odpaří a ve formě par je pak unášen nosným plynem až do kolony, kde dojde rozdělení vzorku na jednotlivé složky.
 - Fluidní chromatografie – mobilní fáze je látka v nadkritickém stavu (nejčastěji CO₂ s přídavkem nebo bez přídavku organických

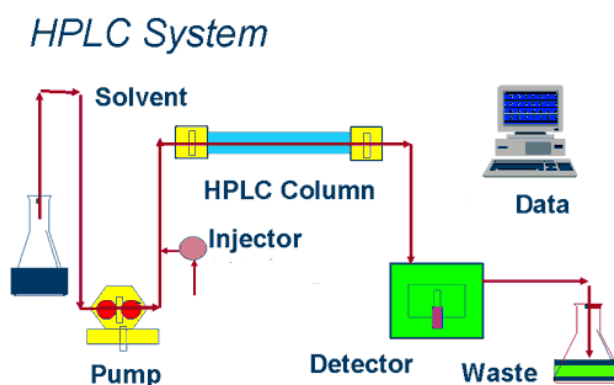
rozpouštědel), kdy tlak a teplota látky dosáhnou vyšších hodnot než je kritická teplota a kritický tlak [136,146-150].

Tab.4: Přehled chromatografických technik [151]

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)
planární	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
		rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
	pevná látka	adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)

4.4.3. Instrumentace kapalinové chromatografie

U klasické kapalinové kolonové chromatografie protéká mobilní fáze samospádem. U HPLC se mobilní fáze pohybuje díky čerpadlům, ta pumpují mobilní fázi kolonou pod vysokým tlakem, aby mohl být překonán zpětný tlak kolony. Dojde tím k výraznému urychlení analýzy. Schéma základních částí kapalinového chromatografu jsou uvedeny na obrázku 48.



Obr.48: Základní části kapalinového chromatografu [152]

Mobilní fáze se čerpá ze zásobníku mobilní fáze (při HPLC se používají toxická rozpouštědla, proto by zásobníky mobilní fáze měly být uzavřené nádoby) přes degaser do vysokotlakého čerpadla (kolony s částicovou náplní 10 μm a menší kladou velký odpor a k dosažení optimálních průtoků jsou proto nutné vysoké vstupní tlaky). Odplynění je důležité proto, aby se v detektoru v důsledku velkého tlakového spádu v systému netvořily bubliny. K odplynění se používá podtlak, ultrazvuk či probublávání heliem, popř. kombinace těchto postupů.

Z čerpadla protéká mobilní fáze do dávkovacího zařízení. Téměř výhradně se používají dávkovací ventily se smyčkou. Nejčastěji jsou to šesticestné ventily s vyměnitelnou smyčkou, která se plní injekční stříkačkou. Objem smyčky se pohybuje od desítek nanolitřů po mikrolitry. Nadávkované vzorky jsou vedeny do kolony. Z kolony, kde dojde k separaci nadávkovaného vzorku, je eluát veden do detektoru a nakonec do odpadní lahve. Záznam z detektoru se vyhodnocuje počítačem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením.

Odezva analytu z detektoru tvaru gausovské křivky se nazývá pík (eluční křivka). Doba od nástřiku vzorku po vrchol píku je charakterizována veličinou retenční čas. Tato veličina je kvalitativní charakteristikou stanovované látky, zatímco kvantitativní charakteristikou je plocha pod píkem nebo výška píku. Záznam píků různých analytů vycházející z detektoru se nazývá chromatogram (časová závislost na intenzitě odezvy detektoru).

Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou propojeny spojovacími kapilárami vyrobenými z odolných materiálů, obvykle z nerezové oceli nebo PTFE. Musí mít co nejmenší vnitřní objem, aby jejich příspěvek k rozmývání elučních křivek byl co nejmenší. Materiál používaný v HPLC musí splňovat určitá kritéria jako je mechanická a chemická odolnost a nesmí být povrchově aktivní (to splňuje nerezová ocel, sklo a některé plasty) [136,152].

4.4.4. Stacionární fáze

4.4.4.1. Účinnost chromatografické kolony

Účinnost separace v kolonové chromatografii charakterizujeme bezrozměrnou veličinou N - počtem teoretických pater. Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve

kteřé dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Složky vzorku unášené tokem mobilní fáze vstupují do 1. patra kolony nerozdělené. Zde se ustavuje rovnováha mezi stacionární fází 1.patra a mobilní fází. Po ustavení rovnováhy se změří koncentrace složek v mobilní fázi a roztok dělených látek v mobilní fázi vstupuje do 2.patra, kde se opět ustavuje rovnováha mezi fázemi. Celý proces se mnohonásobně opakuje.

Na počtu pater kolony je závislá účinnost separace. Čím je separace účinnější, tím lépe dokážeme od sebe složky směsi oddělit. N není konstantní veličinou, je ovlivněna historií kolony a také retenčním faktorem látky použité pro výpočet. Délka této části kolony se nazývá výškový ekvivalent teoretického patra H. Pro kolonu o délce L je výškový ekvivalent teoretického patra

$$H = L/N.$$

Účinnost kolony udává míru rozmývání elučních zón. Podle van Deemterovy teorie vedou k rozšiřování zón v koloně, a tím k růstu výškového ekvivalentu teoretického patra tyto děje:

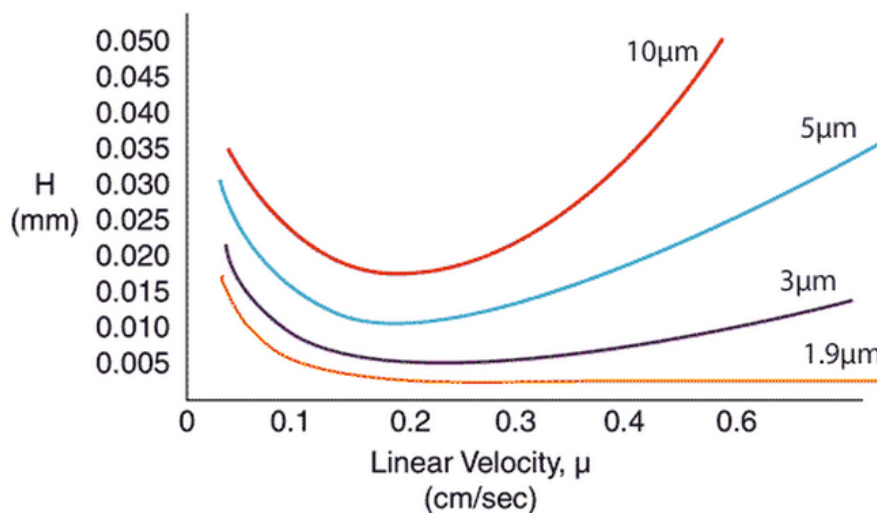
1. Vířivá difuze - různé molekuly urazí různé vzdálenosti
2. Podélná molekulární difuze - molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci
3. Odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi - různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze
4. Odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi - rychlostní profil mobilní fáze uvnitř kolony je parabolický

Tyto vlivy popisuje van Deemterova rovnice:

$$H=A+B/u+Cu$$

A - vířivé difuzi, B - podélné difuzi, C - odpor proti převodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází, u - lineární průtoková rychlost mobilní fáze.

Z teorie vyplývá, že zmenšení velikosti částic ve stacionární fázi vede ke zvýšení rychlosti separace a zvýšení účinnosti kolony (obr. 49). Zvýšení průtoků vede ke snížení podélné difuze, a tím ke zvýšení separační účinnosti [136,147,152-154].

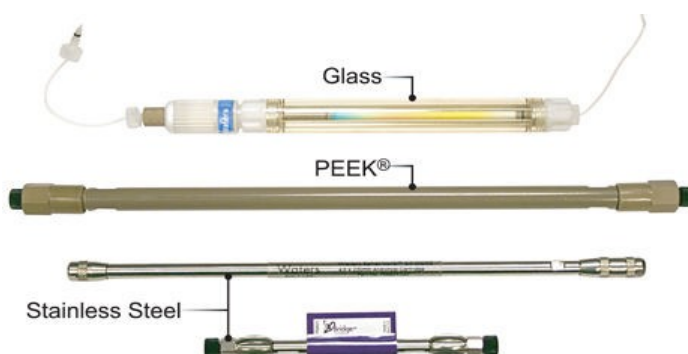


Obr.49: Porovnání van Deemterových křivek pro částice o velikosti 10 μm , 5 μm , 3 μm a 1,9 μm [155]

4.4.4.2. Částicové kolony

První částicové kolony byly tvořeny částicemi o velikosti 100 μm , které byly nasypány do skleněné nebo kovové trubice. V posledním desetiletí je patrná silná tendence ke zmenšování rozměrů částic sorbentů. Ještě před dvaceti lety byly nejpoužívanější stacionární fáze 5 μm , před deseti lety byly nejrozšířenější fáze 3 μm a dnes jsou komerčně dostupné sorbenty s velikostí částic pod 2 μm . Použitím kolon s menšími částicemi dochází ke zvýšení jejich účinnosti, což je zřejmé z obrázku 49. Zmenšování sorbentu jde ruku v ruce se zkracováním chromatografických kolon, které vede k podstatnému zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi provedenými na kolonách délky 25 cm plněných 5 μm sorbentem. Doby analýz na krátkých kolonách (2 cm i menších) určených pro tzv. rychlou chromatografii bývají kolem 1 a 2 minut. Tyto kolony jsou vhodné zejména pro laboratoře, kde jsou denně zpracovávány stovky vzorků. Postupně také dochází ke zmenšování vnitřního průměru. S nástupem techniky LC-MS vzrostla popularita kolon o průměru 2 mm a menším.

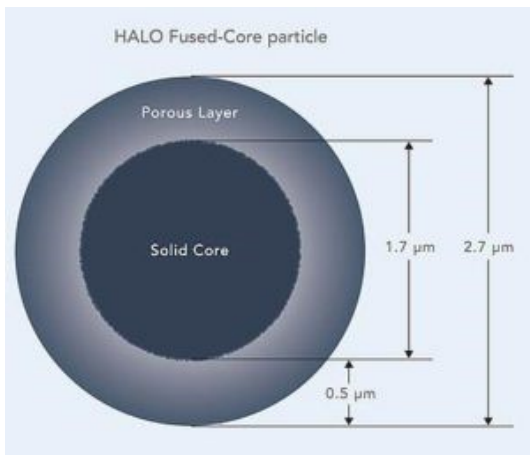
Chromatografie na reverzních fázích je nejrozšířenější technikou a dominantní postavení zde mají partikulární vázané fáze na bázi silikagelu. Ze silikagelových RP jsou dlouhodobě nejpopulárnější C18 modifikace. S velkým odstupem následují modifikace C8, fluorované fáze, alkylované fáze s řetězcí delšími než 18 uhlíků, fenylové fáze, fáze se zabudovanou polární funkční skupinou, C4 modifikace a další. Vedle silikagelových partikulárních sorbentů se v moderní RP-HPLC stále více prosazují materiály, jako např. anorganickoorganické hybridy a modifikované oxidy kovů [156-157].



Obr.50: Kolony různých délek s různou povrchovou úpravou – sklo, PEEK, nerezová ocel [158]

4.4.4.3. Kolony s povrchově porézními částicemi

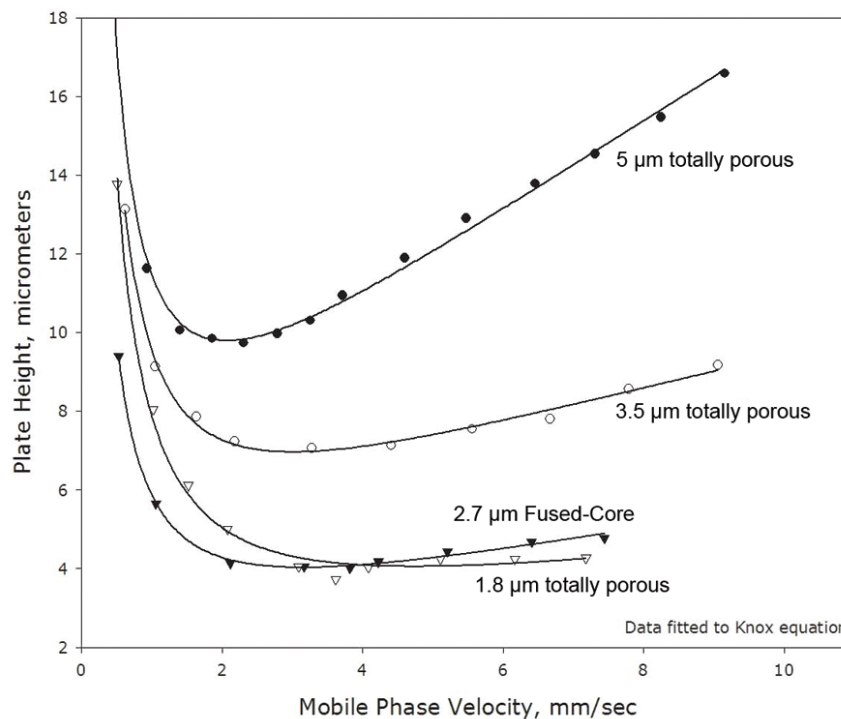
Technologie povrchově porézních částic (porous shell particles, core-shell particles, fused-core particles) byla vyvinuta speciálně pro rychlé analýzy na klasických HPLC systémech, které byly jinak umožněny pouze s využitím částicových kolon s částicemi menšími než 2 μm na UHPLC. Tato technologie byla poprvé popsána v 60. letech a optimalizována J. J. Kirklandem v roce 1992, poté začaly být kolony s tímto sorbentem komerčně vyráběny pod různými názvy. Na rozdíl od klasických plně porézních částic, které jsou v celém svém objemu tvořeny stejnou strukturou, se povrchově porézní částice skládají z pevného neporézního jádra, jenž je obalené porézním sorbentem (obr.51). Pevné jádro je nejčastěji tvořeno silikagelem nebo anorganickými (hliník, uhlík, zlato) či organickými materiály (polymery) a jeho průměr se pohybuje v rozmezí 0,9 – 3,7 μm . Porézní vrstva, která tvoří 60-75 % objemu částice, je tvořena několika vrstvami chemicky modifikovaného silikagelu o přesně dané porositě. Tyto dvě vrstvy společně



tvoří částice kulovitěho tvaru s velice úzkou distribucí velikosti, které jsou dostupné s průměrem od 1,3 do 5 μm. Částice umožňují použití vyšších průtoků za nižšího tlaku systému. Vysoká homogenita velikosti částic zlepšuje účinnost separace a zabraňuje rozmývání elučních zón. Díky pevnému jádru částice dochází k menší podélnou difúzi a snižuje se odpor proti převodu hmoty což

Obr.51: Struktura core-shell částice [161] opět, vede ke zvýšení počtu teoretických pater HPLC kolony oproti kolonám se stejně velkými, plně porézními částicemi (obr. 52).

Nejběžněji jsou core-shell částice využívány v RP-HPLC, ale je možné využít je i pro separace v módu HILIC, pro chirální separace či kapilární HPLC [136,159-160].

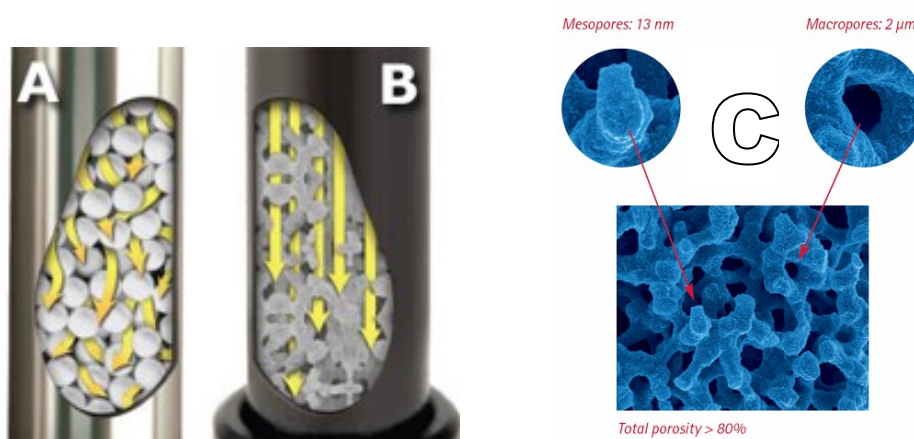


Obr.52: Porovnání účinnosti kolon s plně porézními částicemi o průměru 5 μm, 3 μm, 1,8 μm a kolony s povrchově porézními částicemi pomocí van Deemterových křivek [162]

4.4.4.4. Monolitické kolony

První monolitická separační kolona se zrodila v laboratoři M. Kubína, který se svými spolupracovníky připravil radikálovou polymerací 22% vodného roztoku monomeru 2-hydroxyethyl-methakrylátu ve skleněné trubce pórovitý gel. Ten však vykazoval nízkou účinnost separace. Dále se vývojem zabývali prof. Švec a Fréchet, kteří vyvinuli "kontinuální separační médium" skládající se z jednoho kusu porézního organického polymerního materiálu později nazývaného "monolitická stacionární fáze".

Monolity jsou separační média s vyjimečnou strukturou, kterou je jeden blok pórovitého materiálu zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Oproti kolonám plněným drobnými částicemi, monolity neobsahují mezičásticové prostory. Typickým pro monolitické kolony jsou dvojí póry (makro- a mezopóry) (obr.53 C). Makropóry (1-2 μm) vytváří hustou síť pórů umožňujících použití vyšších průtoků mobilní fáze za nízkých tlaků čímž se značně zrychluje separace látek (obr.53 B). Mezopóry (přibližně 12 nm) vytváří velký aktivní povrch pro interakci s analytem a tím zvyšují separační účinnosti těchto kolon [156, 163-165].



Obr.53: Tok mobilní fáze A - částicovou kolonou, B – monolitickou kolonou, C - struktura monolitického sorbentu s makro a mezopóry [166-167]

Monolitické kolony na bázi organického polymeru

Tyto monolity se získávají radikálovou polymerizací. Polymerizační směs obsahuje monovinylový monomer s funkční či reaktivní skupinou jako je butyl- či glycidyl-methakrylát, síťovací činidlo (typický monomer se dvěma či více dvojnými vazbami např.

divinylbenzen a ethylendimethakrylát), iniciátor, a porogenní rozpouštědlo. Tato směs se nasype přímo do prázdné kolony či kapiláry, kde po zahřátí zpolymeruje.

Pro širší využití monolitů v chromatografii je potřeba modifikovat povrch organických monolitů vhodnými funkčními skupinami. Nejjednodušší způsob je použití základního monomeru, který požadovanou funkční skupinu obsahuje. Takto lze připravit monolity, které obsahují např. skupinu hydroxylovou, amidovou, fosfátovou, sulfonovou či karboxylovou. Druhou možností kontroly funkčních skupin je příprava monolitu s reaktivními skupinami a modifikace vzniklého polymeru.

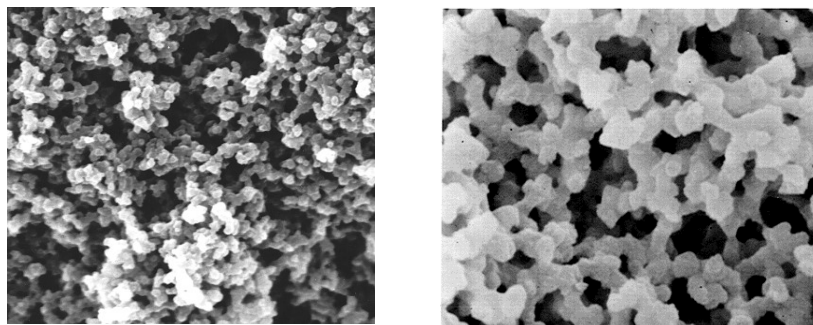
Jedním z hlavních směrů využití monolitických kolon ve výzkumu jsou kapilární separační metody (CLC, CEC). Křemenné kapiláry vyplněné organickou monolitickou stacionární fází však zatím nejsou komerčně dostupné a příprava těchto kolon se tedy musí uskutečňovat přímo v laboratoři [156, 163-165].

Monolitické kolony z anorganických materiálů

Začátkem 90. let Nakanashi a Soga představili postup přípravy spojitého porézního materiálu (novou sol-gel technologií) z oxidu křemičitého s bimodálními póry. První HPLC aplikaci na porézní tyčince z oxidu křemičitého provedl Tanaka a spol., kteří použili toto separační médium v reverzním módu jak pro separaci malých, tak velkých molekul. V současnosti jsou dostupné komerčně vyráběné monolitické kolony na bázi silikagelu od firmy Merck, Německo (obchodní název Chromolith™) a od firmy Phenomenex, USA (obchodní název Onyx™).

Proces výroby silikagelových monolitů je doprovázen snížením objemu, proto nemohou být připravovány in situ (tyčinka o průměru 4,6 mm se získá z formy o průměru 6mm). Nejčastěji se připravují takzvaným sol-gel procesem, kdy dochází k polykondenzaci tetraalkoxysilanů (např. tetramethoxysilanu (TMOS), tetraethoxysilanu (TEOS) nebo methyltrimethoxysilanu (MTMS)) doprovázené oddělením fází v přítomnosti ve vodě rozpustného porogenu, např. poly(ethylenoxidu) (PEO), nebo polyakrylové kyseliny. Poté se tyčinka ztuhlého gelu promyje destilovanou vodou a působením hydroxidu amonného dochází k vytvoření mezopórů. Následuje fáze vysušení vzniklého gelu a vložení do vhodné formy, čímž vznikla nová kolona. Silikový monolit umístěný v koloně je možné dále dle použití modifikovat navázáním různých funkčních

skupin, např. C18 na jejich povrch. Anorganické monolity se liší od organických monolitů svoji pórovitou strukturou. Zatímco struktura organických polymerů se skládá z pospojovaných skupin málo uspořádaných mikroglobulí s makropóry mezi nimi (obr.54a), silikagelové monolity se skládají z dobře uspořádaných skeletů o velmi podobné velikosti, také porézních, prostoupených téměř stejně velkými 1 μm póry (obr.54b).

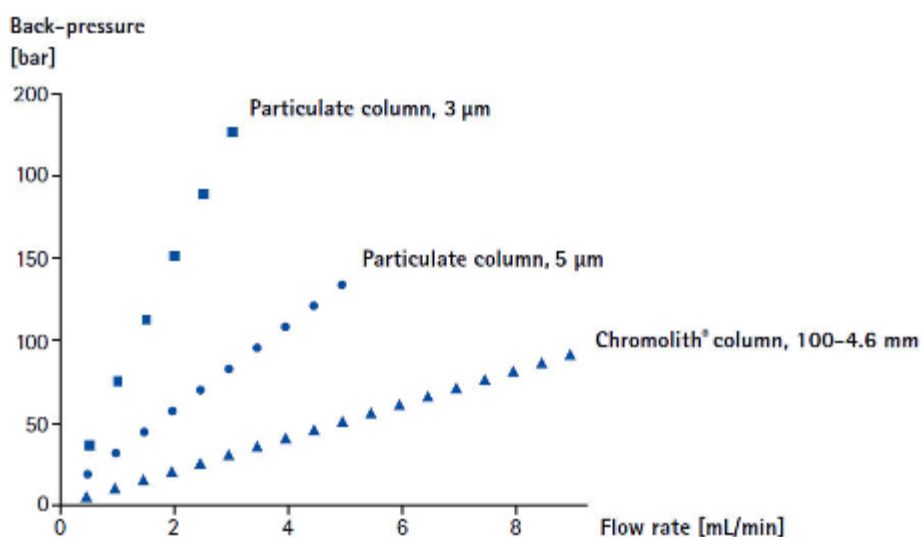


a)

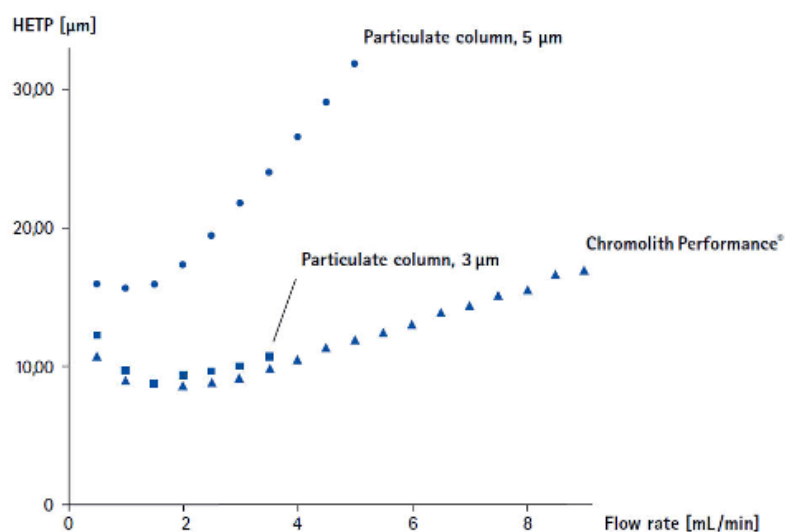
b)

Obr.54: Detail struktury a) polymerního b) silikagelového monolitu [164]

S použitím těchto kolon je umožněno zvýšení průtokových rychlostí bez zvýšení zpětného tlaku (obr.55), urychlení analýzy bez ztráty separační účinnosti (obr.56). Monolitické kolony se s výhodou používají pro rychlé separace malých a středních molekul v klinických laboratořích [156, 163-165].



Obr.55: Závislosti zpětného tlaku na průtoku mobilní fáze částicových HPLC kolon o velikosti částic 5 μm , 3 μm s monolitickou kolonou Chromolith Performance $\text{\textcircled{R}}$ [167]



Obr.56: Porovnání účinnosti HPLC kolon s náplní o velikosti částic 5 μm , 3 μm a monolitické kolony Chromolith Performance[®] pomocí van Deemterových křivek [167]

4.4.5. Detektory používané v HPLC

Detektory jsou umístěné na konci HPLC systému za chromatografickou kolonou. Účelem detektorů je rozpoznat, kdy jím prochází pouze mobilní fáze, a kdy mobilní fáze s eluovaným analytem. Dále pak by mělo být zajištěno, že odezvu detektoru při eluci analytu bude možné kvantifikovat.

Detektory můžeme dělit na selektivní a univerzální. Selektivní detektory vykazují odezvu na některou z fyzikálně-chemických vlastností analytu, zatímco univerzální detektory vykazují odpověď na všechny analyty nezávisle na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Z jiných pohledů je možné detektory dělit na destrukční a nedestrukční. Na rozdíl od destrukčních detektorů, nedochází u nedestrukčních k chemické změně sledovaného analytu. Dále je lze rozdělit na koncentrační a hmotnostní.

Ideální detektor by měl být univerzální a vysoce citlivý, nedestruktivní, měl by mít široký lineární rozsah a jeho signál by neměl být ovlivňován změnami teploty, průtoku a složení mobilní fáze a měl by mít nulový mimokolonový příspěvek k rozmývání elučnicích zón. Také je od něj očekávána spolehlivost a snadná obsluha. Žádný z detektorů však nemůže disponovat všemi těmito vlastnostmi.

Nejpoužívanější jsou UV-VIS detektory, avšak v posledním desetiletí dochází k výraznému nárůstu využití hmotnostně-spektrometrických detektorů [85,147,153,167-168].

4.4.5.1. Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou nejčastěji používané detektory v HPLC analýze. Pracují na principu měření absorpce záření (190 – 800 nm) analyzovaného vzorku. Eluát z kolony je veden skrz průtokovou celu, kam také dopadá UV záření. Záření prošlé celou je detekováno senzorem, na který dopadá. Cela je srdcem detektoru a závisí na ní správnost výsledku. Musí pokud možno eliminovat mísení separovaných zón a musí mít minimální mimokolonový příspěvek. Při změně koncentrace absorbující látky dochází ke změně hodnoty absorbance A. Vztah lze vyjádřit pomocí Lambert-Beerova zákona.

$$A = l \times c \times \epsilon$$

kde ϵ je molární absorpční koeficient (charakteristický pro každou látku), l je tloušťka vrstvy a c je koncentrace.

Tyto detektory jsou poměrně citlivé a mají široký lineární rozsah.

Spektrofotometrické detektory lze rozdělit na detektory:

- s fixní vlnovou délkou (zpravidla 253,7 nm) - zdrojem záření o této vlnové délce je rtuťová výbojka.
- s volitelnou vlnovou délkou - zdrojem záření je deuteriová nebo xenonová lampa a záření o požadované vlnové délce je izolováno pomocí monochromátoru. Vlnovou délku lze nastavit v rozmezí 190-800 nm. Některé typy mohou měřit při dvou až čtyřech vlnových délkách či dokáží snímat i spektra látek
- s měnitelnou vlnovou délkou, s předem danými vlnovými délkami
- s diodovým polem (DAD, diode-array detector, PDA, photodiode-array) - tyto detektory mohou sbírat data současně v celém spektru bez přerušení analýzy. Na každou fotodiodu dopadá světelný tok o určité vlnové délce,

který byl spektrálně rozložen holografickou mřížkou. DAD poskytuje velké množství spektrálních údajů bez ovlivnění citlivosti. Naměřená spektra mohou být porovnána s knihovnou spekter. Tento detektor umožňuje rovněž určit čistotu píku (tzn. zda nedochází ke koeluci analytů) [85,147,153,167-168].

4.4.5.2. Fluorescenční detektory

Při použití fluorescenčního detektoru dochází při průchodu eluované látky celou k absorpci primárního elektromagnetického záření, po kterém přecházejí molekuly analytu do excitovaného elektronového stavu. Při návratu do základního elektronového stavu vydává analyt sekundární (emisní) záření, které je detektorem měřeno. Absorbovaná energie poté může být emitována ve formě fluorescenčního záření o stejné či častěji vyšší vlnové délce, než jakou má primární excitační záření. Zdrojem excitačního záření bývá rtuťová nebo xenonová výbojka.

Pozornost musí být věnována výběru vhodné mobilní fáze, jelikož některá vysoce polární rozpouštědla nebo jiné složky mobilní fáze mohou způsobit pokes výtěžku fluorescence tzv. zhášet. Často jako zhášedlo působí kyslík, proto je vhodné zbavovat roztoky kyslíku. Tyto detektory jsou selektivní a velmi citlivé, ale lze je použít pouze na analyty vykazující fluorescenci [85,147,153,167-168].

4.4.5.3. Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze). I když těchto látek není mnoho, reprezentují velké množství důležitých léčiv, polutantů a přírodních produktů.

Amperometrický detektor

Tento detektor je založen na měření limitního proudu, který je vyvolán průchodem oxidovatelné nebo redukovatelné látky měrnou celou. V měrné cele jsou elektrody, na které je vloženo pracovní napětí potřebné k průběhu elektrochemické detekce.

Coulometrický detektor

Coulometrický detektor je založen na měření náboje potřebného ke kvantitativní elektrochemické přeměně analyzované látky při průchodu měrnou celou.

Mezi nevýhody použití elektrochemických detektorů patří vysoké nároky na čistotu rozpouštědel a aditiv mobilní fáze z důvodu stability základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Ve vodně–organických fázích by neměl být příliš vysoký obsah organické fáze, který vede ke snížení vodivosti [85,147,153,167-168].

4.4.5.4. Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory jsou nejstaršími používanými univerzálními detektory. Zaznamenávají změny v indexu lomu mobilní fáze v referenční cele a eluované látky v měrné cele. Jedná se o univerzální detektory, avšak méně citlivé než UV detektory. Nevýhodou zde je nemožnost využití gradientové eluce, z důvodu nutného udržení stabilního indexu lomu mobilní fáze. Další nevýhodou je závislost odezvy detektoru na teplotě. Její změny zapříčiní změny v indexu lomu mobilní fáze. Z toho důvodu je zapotřebí udržovat konstantní teplotu měřící cely [85,147,153,167-168].

4.4.5.5. Detektor nabitého aerosolu – CAD

Tento detektor patří mezi univerzální detektory. Je schopen detekovat látky bez ohledu na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, detekuje kladně nabitě částice, které se liší hmotností. Tento citlivý, univerzální detektor umožňuje detekci netěkavých látek, dále vykazuje relativně široké dynamické rozmezí a jednoduché použití. Jeho velkou nevýhodou je závislost odezvy na složení mobilní fáze. Své uplatnění nachází v analýze lipidů, proteinů, peptidů, polymerů a jiných látek, které postrádají chromofor ve své struktuře. Využívají se v analýze potravin a léčiv [85,147,167-168].

4.4.5.6. Odpařovací detektor rozptylu světla – ELSD

ELSD patří stejně jako Corona detektor do skupiny univerzálních detektorů na bázi aerosolu. Princip detekce látek je v počátečních fázích stejný jako u CAD, liší se konečnou detekcí vzniklých částic. Jeho aplikace i omezení jsou stejná jako u CAD [85,147,167-168].

4.4.5.7. Hmotnostně-spektrický detektor - MS

Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z). Základními kroky v hmotnostní spektrometrii jsou:

1. Převedení vzorku do plynné fáze

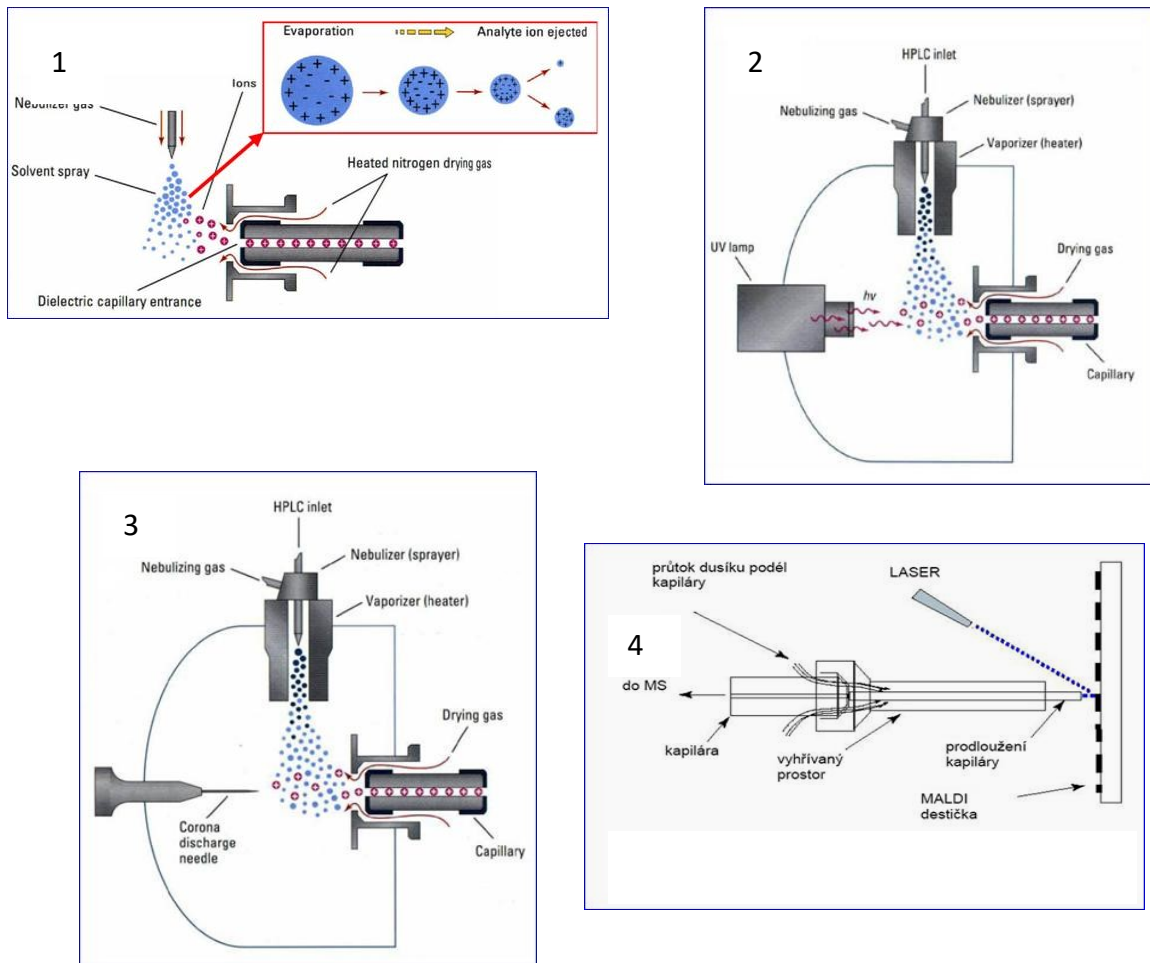
Separace iontů probíhá ve vakuu, proto je nutné, aby před vlastní separací byl analyzovaný vzorek převeden do plynné fáze. V případě spojení hmotnostního detektoru s kapalinovou chromatografií je do prostoru iontového zdroje mimo analytů vystupující z chromatografické kolony přiváděna také mobilní fáze. Z toho důvodu jsou tyto látky přiváděny buď přímo, anebo přes vhodné rozhraní, které částečně eliminuje podíl mobilní fáze.

2. Ionizace

Ionizační zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice, existuje široké spektrum ionizačních technik lišících se konstrukcí pro určitý účel použití.

Podle množství dodané energie je obvyklé ionizační techniky dělit na:

- měkké – přebytek dodané energie je malý a fragmentace poměrně nízká, vznikají při ni protonované $[M+H]^+$ nebo deprotonované $[M-H]^-$ molekuly, patří sem nejpoužívanější ionizační techniky ve spojení s HPLC jako je ionizace elektrosprejem (ESI, obr. 57-1), fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI, obr. 57-2), chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI, obr. 57-3), dále také ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI, obr. 57-4), která se používá v off-line spojení.



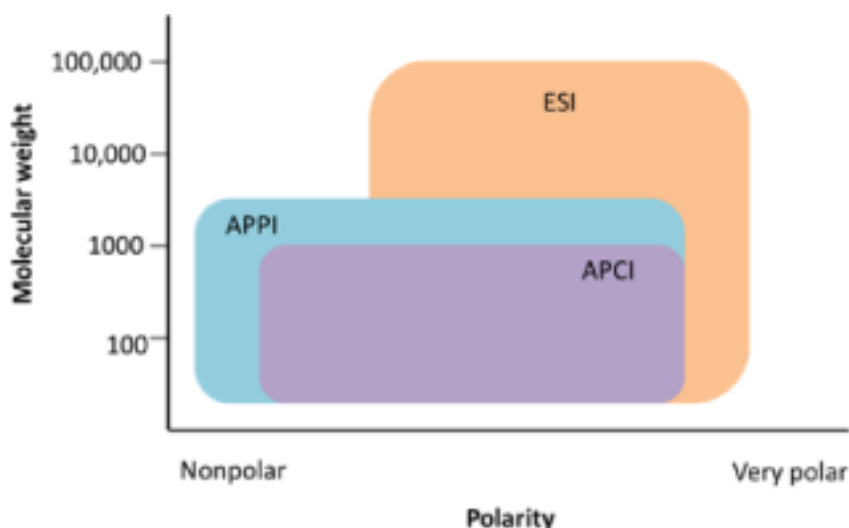
Obr.57: Schématické znázornění „měkkých“ ionizačních technik [170]

1 – ESI - rozpuštěný analyt je přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí, intenzivní pole na konci kapiláry tvoří kónický meniskus (Taylorův kužel), ze kterého se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček, odpařováním rozpouštědla dojde k zvýšení hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů až k uvolnění iontů.

2 – APPI – eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky. Kryptonová výbojka je zdrojem fotonů (energie ~10 eV), které jsou absorbovány molekulami analytu. Analyt ztrácí elektron a vznikají molekulární ionty M^+ . Do zdroje se může přivádět dopant s nízkou ionizační energií (toluen, aceton) ke zvýšení koncentrace ionizovaných molekul a tím i ke zvýšení účinnosti ionizace analytu.

3 – APCI - eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky, na výbojovou elektrodu (jehlu) je vloženo vysoké napětí (3-4 kV), čímž vzniká koronový výboj - zdroj elektronů, které ionizují plyny ve zdroji, ty kolidují s molekulami rozpouštědla a následně jsou ionmolekulárními reakcemi ionizovány molekuly analytu, vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru, protiproud sušícího plynu (dusík) slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů.

4 – MALDI - vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčik, matrice přijme energii krátkého laserového pulsu, následuje lokální desorpce matrice a analytu (vznikají klastry matrice a analytu), excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu, které jsou poté urychleny do hmotnostního analyzátoru [85,170-172].



Obr.58: Aplikace ionizačních technik za atmosferického tlaku pro látky dělené na základě jejich polaroty a molekulové hmotnosti [171]

- tvrdé – přebytek dodané energie je dostačující k fragmentaci iontů vznikajících ve spektrech prvního řádu, vzniká molekulární iont $M^{+\bullet}$ a dochází k rozsáhle fragmentaci molekuly, patří sem elektronová ionozace (EI), která je používána pro těžké analyty ve spojení s GC [172].

3. Separace iontů v hmotnostního analyzátoru

Slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Dělení iontů dle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:

1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor)

2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)

3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu – TOF)

4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu

5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR) [85,172].

4. Detekce iontů

Slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů. Detektory využívané v hmotnostní spektrometrii lze dělit do dvou kategorií:

1) detektory pro přímá měření, jež detekují elektrický proud vzniklý přímým dopadem iontů;

2) detektory násobičové, jež využívají efektu násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a jsou schopny poskytnout měřitelné signály i pro jednotlivé ionty. Jedná se o elektronnásobičové a fotonásobičové detektory.

Protože je hmotnostní spektrometr zařízení pracující za velmi nízkých tlaků, je jeho nedílnou součástí i výkonný, nejčastěji dvoustupňový vakuový čerpací systém. Ten umožňuje udržet dostatečně nízký tlak za všech provozních podmínek.

Pro lepší identifikaci a kvantifikaci látek ze složitých matric je trendem spojení dvou hmotnostních analyzátorů stejného druhu tzv. tandemová spektrometrie (MS/MS) či dvou odlišných typů analyzátorů tzv. hybridní analyzátor a využít tak jejich nejlepších vlastností.

Existuje mnoho kombinací analyzátorů pro tandemovou spektrometrii. Ve spojení s LC se hojně využívá konstrukce založené na trojitým kvadrupólu (QqQ), složené

ze tří analyzátorů. První a třetí analyzátor pracují jako hmotnostní kvadrupólové analyzátoři, zatímco druhý slouží jako urychlovač iontů.

Mezi hybridní analyzátoři patří např. spojení kvadrupólu s analyzátořem doby letu (Q-TOF), kvadrupólu s ICR (Q-FT-ICR) či lineární iontové pasti s orbitrapem [85].

4.4.6. Spojení LC s MS detekcí

V uplynulých letech byl také zaznamenán značný pokrok právě ve sféře přímých spojení separačních metod se spektrálními. Vhodnou separační technikou se v prvním kroku rozdělí směs látek obsažených ve vzorku a poté se v kroku druhém získají informace o struktuře jednotlivých sloučenin. V ideálním případě je možno identifikovat jednotlivé složky směsi o neznámém složení či alespoň přibližně odvodit jejich strukturu.

Spojením kapalinové chromatografie, jakožto metody s velmi vysokou a účinnou schopností separace jednotlivých složek analyzovaného vzorku s hmotnostní spektrometrií, kterou lze považovat za velmi citlivou a spolehlivou identifikační techniku. Umožňuje v jedné analýze od sebe látky separovat a následně identifikovat, i když se jedná o složitou matici. Výhodou je časově nenáročná a méně pracná analýza, oproti metodám využívající tyto komponenty zvlášť. Jako komplikaci metody lze uvést užití rozdílných tlaků v obou komponentech, tedy přechod z atmosférického tlaku do vakua, což bylo vyřešeno zavedením ionizačních technik za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI), které slouží jako rozhraní nebo vysoké průtoky analytu v separačních technikách.

Důležité je také výběr a složení mobilní fáze. Ta se přímo účastní ionizačního procesu, proto jsou vhodná těkavá rozpouštědla (acetonitril, methanol) s malým přídatkem těkavých aditiv jako např. kyselina mravenčí či kyselina octová aj. Přídavek těchto aditiv by měl být o nízké koncentraci (pod 1%), jinak dochází při ionizaci k souboji o náboj a tím k poklesu signálu [173-174].

4.4.7. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Se zmenšováním velikosti částic v kolonách dochází ke zvýšení rychlosti separace a zvýšení účinnosti kolony, to ale také vede ke zvyšování zpětného tlaku, který HPLC přístroje nejsou schopny zvládnout. Proto je jedním z nejvýznamnějších trendů v HPLC technice zavedení kolon obsahující částice menší než 2 μm a s tím spojený vývoj ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie či ultra-vysokotlaké kapalinové chromatografie

(UHPLC) odolávajícím mnohem vyšším tlakům. Tento termín byl poprvé použit Jorgensonem v roce 1997, kdy se svými spolupracovníky použil kolony se silikagelovými částicemi o velikosti 1,0-1,5 μm na přístroji zvládající tlaky až do 4100 bar. Komerční přístroje odolávající tak vysokým tlakům nebyly zatím dostupné a na jejich vývoji se pracovalo. Až v roce 2004 byl firmou Waters dodán na trh první sériově vyráběný přístroj odolávající takto vysokým tlakům pod ochranou známkou Ultra-performance liquid chromatography (UPLC).

Pro dosažení účinné separace musí UHPLC systémy splňovat i další podmínky, nejenom odolnost na vysoké tlaky, musí mít dávkovací systém s přesným a rychlým dávkováním, široký rozsah průtoků, minimální mimokolonové objemy (kapiláry s vnitřním průměrem až 0,12 mm) a detektor s rychlým sběrem dat a nízkou objemovou detekční celou (v rozsahu nl). Nejvíce využívanými detektory ve spojení s UHPLC jsou UV/VIS detektory a MS detektor s velmi malou časovou prodlevou sběru dat dále lze využít i fluorescenční či odpařovací detektor rozptylu světla.

Jak již vyplývá z obrázku 49 při použití částic menších než 2 μm je optimální separační účinnosti (nejnižší hodnoty H) dosaženo i za vyšších průtoků mobilní fáze. Tato účinnost je zachována v širším rozsahu lineárních průtokových rychlostí, a to díky nízkému odporu proti převodu hmoty. Zvýšením průtokové rychlosti mobilní fáze dojde ke zkrácení doby analýzy a zvýšení počtu změřených vzorků. Došlo také ke zmenšení kolon – zkrácení a zmenšení vnitřního průměru, díky kterému je potřeba menší množství organických rozpouštědel.

Vzhledem k výše uvedeným výhodám se UHPLC technika rychle rozvíjela a v poslední době se stala široce používanou analytickou technikou ve většině laboratoří výzkumných center i rutinních laboratořích. Nachází využití především pro separace na reverzních i normálních fázích, ale i pro chirální separace či HILIC separace [85,175-176].

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výsledky prezentované v předložené disertační práci byly naměřeny ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. V experimentální části této práce jsou uvedeny jednotlivé oblasti výzkumu, kterými jsem se v rámci doktorského studia zabývala - kap. 5.1. - 5.7., většina z nich vyústila v publikaci v impaktovaném odborném časopise.

Publikované práce jsou rozděleny do dvou tematických celků. První se věnuje stanovení vitamínu D v různých biologických matricích – sérum, mateřské mléko a zahrnuje jednak práce na vývoji nových analytických metod pro stanovení vitamínu D a také přehled analytických metod pro stanovení v mléku, které byly publikovány v odborných časopisech.

Druhý tematický celek se zabývá využitím validovaných analytických metod pro stanovení vitamínů A, E a markerů zánětu v klinické praxi při řešení výzkumných projektů ve spolupráci s různými pracovišti nejen FN HK.

5.1. STANOVENÍ VITAMINU 25-OH D₃ A 25-OH D₂ POMOCÍ UHPLC MS/MS S VYUŽITÍM STANDARDNÍHO REFERENČNÍHO MATERIÁLU NIST SRM 972

5.1.1. Úvod

Vitamin D je v tuku rozpustný prekurzor steroidního hormonu, který je produkován hlavně v kůži po vystavení slunečnímu světlu, nebo je dodáván potravou. Existují dvě formy vitamínu D – D₂ (ergokalciferol), vyskytující se v rostlinách a D₃ (cholecalciferol), která se tvoří v pokožce při vystavení slunečnímu záření. V krvi se vitamin D váže na specifický protein (tzv. vitamin D binding protein; DBP) nebo albumin a je transportován do jater. Zde dochází působením specifické hydroxylázy k jeho hydroxylaci na 25-hydroxyvitamin D [25-OH-D₂ nebo 25-OH-D₃]; tzv. kalcidiol, hlavní zásobní formu vitamínu D, jejíž koncentrace je považována za primární ukazatel dostupnosti vitamínu v organismu. Místem další hydroxylační reakce jsou hlavně ledviny, kde je po svém transportu 25-hydroxyvitamin D metabolizován působením 1 α -hydroxylázy za přítomnosti parathormonu na biologicky aktivní 1,25-dihydroxyvitamin D

(tzv. kalcitriol). Vzhledem k tomu, že 25-hydroxyvitamin D se nachází v krvi v koncentracích až 1000x vyšších než 1,25-dihydroxyvitamin D (a je tedy hlavní formou vitamínu D v cirkulaci) a jeho biologický poločas je 2–3 týdny (ve srovnání s cca 4 hodinami u 1,25-dihydroxyvitamínu D), je 25-hydroxyvitamin D analytem nejčastěji používaným ke stanovení hladiny vitamínu D v organismu.

Vitamin D a jeho deriváty se nejčastěji stanovují v lidském séru a plazmě pomocí imunochemických metod – RIA, ELISA. Vzhledem k tomu, že imunoanalytické metody nedovedou ve většině případů rozlišit 25-hydroxyvitamin D₂ a D₃, prosazuje se pro stanovení těchto látek stále častěji spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Zvýšený zájem o vitamin D a jeho stanovení souvisí s poznáním, že vitamin D ovlivňuje nejen kostní metabolismus, ale má i účinky protinádorové a imunomodulační. Důsledkem výrazně zvýšené úrovně vědomostí o klinickém a diagnostickém významu vitamínu D v posledních letech je prudký nárůst počtu požadavků na jeho vyšetření v rutinních klinických laboratořích. Současně s tímto enormním nárůstem vyšetření se objevila řada indicií potvrzujících existenci významných systematických diferencí mezi metodami a laboratořemi. Ty vedou k závažným klinickým rozpakům při interpretaci výsledků a následně k pocíťování naléhavé potřeby urychlené standardizace stanovení. Klíčem ke standardizaci je využití kalibrátoru s návazností na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 972.

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat jednoduchou a rychlou LC-MS/MS metodu pro stanovení hladin hydroxyderivátů vitamínu D v séru s využitím referenčního materiálu, jako kalibračního materiálu obsahujícího sérovou matici. Při vývoji této metody jsem se podílela na přípravě a úpravě mobilní fáze, kalibračních a standardních roztoků, extrakci kontrolních, kalibračních i patientských vzorků s jejich vyhodnocením.

5.1.2. Přístrojové vybavení a chemikálie

5.1.2.1. Laboratorní vybavení

Metoda úpravy vzorku před UHPLC/MS/MS stanovením byla vyvinuta za použití stolní třepačky Vortex-Genie® 2T (Scientific Industries, Inc., New York, USA), centrifugy 5810R a mikrocentrifugy Minispin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo) a vakuového

manifolds (Pall Life Science, Michigan, USA) na mikrotitrační destičky s vakuovou pumpou VAC Space-50 (Chromservis, Praha, ČR) (obr.60) k závěrečné filtraci vzorků přes destičkový filtr AcroPrep 96 filter Plate 0.2 μm /350 μL (Pall Corporation, Ann Arbor, USA), k měření pH mobilní fáze byl používán pH metr Sentron Argus, sonda ISFET Sentron, Sentron (AC Rodhen, Nizozemí).

Analýza metabolitů vitamínu D byla provedena na systému UHPLC Nexera s tandemovou hmotnostní detekcí LCMS-8030 od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko). Na obr. 59 je tento systém zobrazen přímo v HPLC laboratoři ve Výzkumné laboratoři GMK. Vysokotlaký systém Nexera je vybaven degaserem DGU-20A, dvěma pumpami LC30-AD) s automatickou korekcí pulzace, autosamplérem SIL/30 AC na vialky a rack changerem – autosamplérem pro mikrotitrační destičky dovolující analyzovat až tisíc vzorků v jedné sekvenci, s kontrolou teploty (4 - 40°C) zamezující degradaci vzorků. Systém je dále vybaven selekčním ventilem, kolonovým termostatem CTO-20 AC, citlivým fluorescenčním detektorem a centrální řídicí jednotkou CBM-20A komunikující s počítačem prostřednictvím programu LC Solution. Jako detektor byl použit LCMS-8030 detektor Shimadzu (Kyoto, Japonsko) s trojitým kvadrupólem a s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu ve spojení s generátorem dusíku NM32LA (Peak Scientific, Frankfurt, Německo) a vakuovou pumpou E2M28 (Edwards, Crawley, UK).



Obr.59: UHPLC NEXERA systém s LC-MS 8030 hmotnostním detektorem

5.1.2.2. Použité chemikálie

Roztoky standardů vitaminů 25-OH D₃ a 25-OH D₂ a precipitačního činidla monohydrátu síranu zinečnatého a LC-MS metanol byly dodány od Sigma Aldrich (Praha, ČR). Pro přípravu mobilní fáze byl použit acetonitril, voda (Sigma Aldrich, Praha, ČR) a kyselina mravenčí od Merck KgGa (Darmstadt, Německo) vše LC-MS kvalita. Kontrolní séra a kalibrátory se standardní referenční maticí 972 z National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, USA) byly zakoupeny od Chromsystems (Mnichov, Německo).

5.1.3. Úprava séra před analýzou

V Eppendorf zkumavce bylo smícháno 200 μ l lidského séra s 50 μ l 4% monohydrátu síranu zinečnatého a 400 μ l metanolu. Poté byla směs míchána 20 vteřin na stolní třepačce. Následovala inkubace 10 minut při 4°C. 300 μ l supernatantu bylo odebráno po předchozí centrifugovaci (5 minut při 21°C a 14 000 \times g) do mikrotitrační destičky s 0,2 μ m filtrem a před analýzou filtrováno.

5.1.4. Podmínky analýzy

Stacionární fáze byla tvořena kolonou s povrchově porézními částicemi Kinetex C₁₈ (1,7 μ m; 3 \times 100 mm), která byla chráněna předklonkou security guard ultra cartridge C₁₈. (obojí Phenomenex, Aschaffenburg, Německo). Teplota kolony byla udržována kolonovým termostatem na 50 °C. Mobilní fáze byla tvořena 72% acetonitrilu a 28% LC-MS vody s přidavkem kyseliny mravenčí na pH 2,58 s průtokem 0,5 ml/min. Tyto podmínky byly nastaveny do 6. minuty analýzy. Po eluci cílových analytů byl přepnut ventil a kolona s předkolonou byly promývány po dobu 3 minut 90% acetonitrilu a 10% vody se zvýšeným průtokem 0,8 ml/min. Objem nastříkovaného vzorku byl 20 μ l a celkový čas analýzy byl 9 minut.

Při vývoji metody bylo velkou pomocí použití automatické optimalizace v softwaru Shimadzu LabSolution 5.41 SP1. Tento systém nám umožnil optimalizovat MS podmínky jako např. napětí na prvním, třetím kvadrupólu, v kolizní cele či nalezl a vyhodnotil 5 nejintenzivnějších MRM přechodů metabolitů 25-OH D₃ a 25-OH D₂ viz tabulka 5.

Tab.5: Optimalizované MRM parametry

Analyt	Prekurzorový iont [m/z]	Produktový iont [m/z]	Q1 [V]	CE [V]	Q3 [V]
25-OH D ₃	401,4	383,2	-16	-10	-30
	401,4	107,1	-16	-25	-23
	383,3	365,2	-20	-15	-27
	383,3	105,0	-20	-50	-22
	383,3	69,1	-20	-35	-16
25-OH D ₂	413,2	395,2	-16	-10	-29
	413,2	83,1	-16	-25	-16
	395,2	69,1	-30	-40	-28
	395,2	119,0	-30	-25	-12
	395,2	55,0	-30	-45	-25

5.1.5. Vývoj metody

Při vývoji metody byly testovány různé kolony - stacionární fáze. Byly porovnávány tyto kolony s plně porézními nebo povrchově porézními částicemi:

- Acquity HSS T3 (1,8 μm; 2,1 × 50 mm)
- Ascentis Express amide (2,7 μm; 3 × 75 mm)
- Kinetex C18 (1,7 μm; 3 × 100 mm)

Chromatografické podmínky pro testování kolon: teplota na koloně 25 °C, mobilní fáze s gradientovou elucí byla tvořena 50% acetonitrilu a 50% LC-MS vody s přidavkem kyseliny mravenčí v t=0 min po 90% acetonitrilu a 10% LC-MS vody v t=10 min s průtokem 0,5 ml/min. Nejlepších výsledků jako je dobrá opakovatelnost, nejrychlejší separace hydroxyderivátů vitamínu D (5,9 min) spolu s nízkou spotřebou mobilní fáze bylo dosaženo s kolonou Kinetex C₁₈.

Optimalizovány byly všechny kroky úpravy biologického vzorku. K úpravě vzorků séra se nejdříve používaly skleněné zkumavky, které byly později nahrazeny Eppendorf zkumavkami, pro jejich běžné používání v rutinních laboratořích, jednorázovému použití a možnosti rychlejší centrifugace v Minispin centrifuze. Dále byla testována různá precipitační činidla jako acetonitril, n-hexan, ethanol či síran zinečnatý v různém poměru.

Jako vhodné precipitační činidlo byl vybrán methanol s 4% roztokem síranu zinečnatého. Optimalizován byl také čas inkubace, kdy se ukázalo, že inkubace delší než 10 minut nemá žádný vliv na výtěžnost cílových analytů.



Obr.60: Vakuový manifold na mikrotitrační destičky

5.1.6. Validace metody

Každá nová metoda, aby mohla být používána pro diagnostické účely, musí být validována. Validace metody je proces, který vede k posouzení kvality analytického postupu a to díky stanovení požadavků jako je přesnost, preciznost, selektivita, limit detekce, limit kvantifikace, linearita a rozsah, robustnost. Validace metody byla provedena podle směrnice pro validaci bioanalytických metod EMEA z roku 2011 a také dle doporučení FDA.

a) Linearita je definována rovnicí regresní přímky. Pro oba analyty byly použity 3PLUS1 Chromsystem kalibrátory připravené z lidské plazmy o předem známých koncentracích. Kalibrační křivka byla vytvořena ze čtyř koncentračních úrovní pro 25-OH D₃ a tří úrovní pro 25-OH D₂. Každý bod kalibrační křivky byl tvořen průměrem ze tří samostatných extrakcí. Determinační faktor byl 0,9998 pro 25-OH D₃, 0,9999 pro 25-OH D₂. Kalibrační křivka splňuje podmínky linearity v rozsahu 9,9 nmol/l – 174 nmol/l pro 25-OH D₃ a 37,5 nmol/l – 146 nmol/l pro 25-OH D₂.

b) K vyhodnocení **správnosti** bylo použito kontrolní sérum MassCheck 25-OH D₃ / D₂ (level 1 + 2) o známých koncentracích s návazností na standardní referenční materiál. Obě úrovně byly extrahovány třikrát. Limit výtěžnosti pro biologický materiál je stanoven na 100 ± 15%. U obou měřených analytů se výtěžnost pohybovala v rozmezí od 95,8 - 102% a splnila stanovený limit.

c) **Přesnost** byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka plochy píku a prokázána na třech úrovních vzorků séra o známé koncentraci. Přesnost v sérii (intra-assay precision) byla hodnocena pomocí šesti jednotlivě extrahovaných vzorků z jednoho zdroje. Přesnost mezi sériemi (inter-assay precision) byla hodnocena v průběhu čtyř dnů a každý den ze tří individuálně extrahovaných vzorků z jednoho zdroje. Přesnost v sérii a mezi sériemi nepřekročila 6,5%.

d) **Limit detekce (LOD)** je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale ne kvantifikováno na přesnou hodnotu. LOD byl vyjádřen jako koncentrace analytu odpovídající poměru signálu k šumu (3:1). LOD pro 25-OH D₃ = 0,22nmol/l (0,09 ng/ml), pro 25-OH D₂ = 0,67nmol/l (0,29 ng/ml).

e) **Limit kvantifikace (LOQ)** je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s vhodnou přesností a správností. LOQ byl vyjádřen jako koncentrace analytu odpovídající poměru signálu k šumu (10:1). LOQ pro 25-OH D₃ = 0,73nmol/l (0,28 ng/ml), pro 25-OH D₂ = 2,24nmol/l (0,92 ng/ml).

f) **Robustnost** je míra schopnosti analytické metody dávat přesné a správné výsledky při záměrné změně postupu mírnými odchylkami. Bylo hodnoceno několik změn jako např. změna zastoupení organické složky mobilní fáze o ± 2%, změna teploty kolonového termostatu o ± 2°C nebo změna průtoku mobilní fáze o ± 0,2 ml/min. Dále byl posouzen vliv různé koncentrace kyseliny mravenčí v mobilní fázi.

g) **Selektivita** byla definována jako schopnost metody rozlišit sledované analyty od ostatních složek vzorku. Požadovaný limit 2% RSD retenčních časů nebyl překročen ani u šesti různých vzorků lidského ani kontrolního séra.

5.1.7. Využití metody

5.1.7.1. Sběr patientských vzorků

Nově vyvinutá metoda byla použita k měření hladin 25-OH D₃ a 25-OH D₂ v séru u tří skupin pacientů z Fakultní nemocnice Hradec Králové. Celkem bylo monitorováno 79 pacientů:

skupina A) 35 gerontologických pacientů –

podskupina A1 – pacienti nad 90 let věku, bez závažných chorob, kontrolováni ambulantně v poradně pro gerontologické pacienty na III. interní gerontometabolické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové

skupina A2 – kontrolní skupina, pacienti jako ve skupině A1, ale o 10 let mladší

skupina A3 – pacienti nad 90 let věku z LDN Hradec Králové, mentálně zdraví, bez demence (kontrolováno Critch testem)

skupina B) 26 pacientů s familiární hypercholesterolemií - léčení LDL aferézou

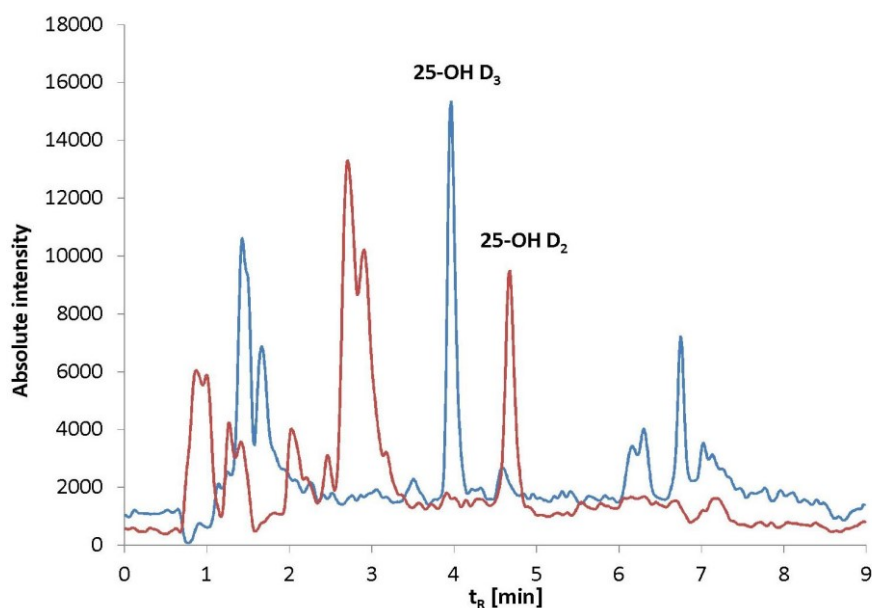
skupina C) 18 pacientů trpících věkem podmíněnou makulární degenerací - léčení hemorheoferézou

Postup této studie schválila Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky použité ve studii byly získány na základě informovaného souhlasu od všech zúčastněných pacientů.

5.1.7.2. Statistické vyhodnocení

K vyhodnocení změn hladin vitaminů 25-OH D₃ a 25-OH D₂ před a po léčbě LDL aferézou a hemorheoferézou byla provedena statistická analýza softwarem NCSS 2004 (Kaysville, USA). Rozdíly mezi podskupinami ve skupině A byly vyhodnoceny Mann-Whitney U testem. Pro porovnání středních hodnot možných změn hladin sledovaných vitaminů před a po extrakorporální eliminaci u skupin B a C byl proveden neparametrický test Wilcoxon Signed-Rank. Hladina statistické významnosti byla zvolena na úrovni $p < 0,05$.

Chromatogram patientského vzorku séra je znázorněn na obrázku 61.



Obr.61: Chromatogram patientského séra
 25-OH D₃: RT = 3,96 min, c = 19,9 nmol/l,
 25-OH D₂: RT = 4,67 min, c = 33,5 nmol/l

5.1.7.3. Výsledky a diskuze

Střední hodnota koncentrace 25-OH D₃ a 25-OH D₂ v séru pacientů se směrodatnými odchylkami před a po léčebném procesu je znázorněna v tabulce 6. Bohužel u 93,4 % byly hodnoty hladin metabolitu 25-OH D₂ pod limitem kvantifikace, proto nebyl tento parametr dále posuzován. V tabulce 6 je zobrazena hladina 25-OH D v séru pacientů dle jejich % zastoupení. Analýza vitaminů v séru sledovaných pacientů ukázala statisticky významný rozdíl mezi podskupinou A2 a A3 a také statisticky významné rozdíly v hladině 25-OH D₃ mezi skupinami A2 a A3 před a po extrakorporální eliminaci ve skupinách B a C.

Tab.6: Statistické vyhodnocení 25-OH D₃ a 25-OH D₂ v séru pacientů

Skupina	N	Průměr	SD	Statistická významnost p
A1	11	12,57	11,41	1 vs 2 = 0,35316 (n.s.)
A2	13	16,91	13,42	2 vs 3 = 0,045159 (s.)
A3	11	10,53	22,85	1 vs 3 = 0,146263 (n.s.)

		Před aferézou		Po aferéze		
		Průměr	SD	Průměr	SD	
B	26	53,34	29,33	46,56	29,57	0,002963 (s.)
C	18	26,11	13,13	23,07	11,03	0,001715 (s.)

Tab.7: Hladina 25-OH D v séru pacientů dle četnosti

Status vitamínu D	Rozmezí konc. 25-OH D (nmol/l)	Pacienti v %
dostatečná hladina	75-150	12,7
mírný nedostatek	50-74	6,3
nedostatek	25-49	27,8
těžký nedostatek	< 25	53,2

5.1.8. Závěr

Byla vyvinuta a plně validována nová, rychlá a jednoduchá metoda pro stanovení 25-OH D₃ a 25-OH D₂ v lidském séru s tandemovou hmotnostní detekcí. Díky použití standardizovaného materiálu NIST SRM 972 jako kalibrátoru a kontrolního séra (již obsahuje sérovou matici) předchází tato metoda problémům s nestandardizovaným materiálem a matricovým efektům.

Úprava vzorků lidského séra před analýzou vitamínů se skládá ze tří jednoduchých kroků: precipitace – centrifugace – filtrace. Díky použití mikrotitračních destiček, které obsahují 96 pozic, je možné zpracovávat velké série vzorků. Tato nová metoda pro stanovení hydroxy derivátů vitamínu D byla využita k monitorování hladin těchto vitamínů v séru u gerontologických pacientů, pacientů trpících familiární hypercholesterolemií a věkem podmíněnou makulární degenerací. Nově vyvinutá metoda je vhodná jak pro klinický výzkum, tak i pro použití v rutinních laboratořích.

Popsaná metoda s klinickou aplikací byla publikována v časopise Journal of Separation Science v roce 2013, roč. 36, s. 3702-3708. (IF₂₀₁₆ = 2,557), počet citací bez autocitací 6.

5.2. STANOVENÍ 25-HYDROXYDERIVÁTŮ VITAMINU D V MATEŘSKÉM MLÉCE

5.2.1. Úvod

Mateřské mléko – velmi cenná, nenahraditelná tekutina, která se přizpůsobuje svým složením potřebám každého jednotlivého dítěte. Obsah vitaminů a minerálů je částečně závislý na stravě matky a jejím výživovém stavu. Některé prvky se do mléka dostávají z tělních zásob matky (jde především o vápník, železo, kyselinu listovou, zinek). Další ale mohou v mléce chybět, pokud má matka nedostatečnou výživu (především vitaminy skupiny A, B, D, jód). Koncentrace vitaminu D v mateřském mléce je mnohonásobně nižší než v plazmě matky. Tento nedostatek vitaminu může ohrozit správný růst a vývoj nejen kostí a i mnoha dalších orgánů a negativně ovlivnit jejich funkci.

Přehled o možnostech jeho stanovení v mateřském mléce s vhodnými extrakčními postupy nalezneme v kap. 5.3.

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat jednoduchou a rychlou úpravu mateřského mléka před LC-MS/MS analýzou pro stanovení 25-hydroxyderivátů vitaminu D v mateřském mléce, navázat tak na předchozí metodu a rozšířit soubor metod vhodných pro použití v rutinním provozu i v klinických studiích.

5.2.2. Použité chemikálie

Pro přípravu standardních roztoků byly použity následující látky:

- 25-OH D₂ (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- 25-OH D₃ (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Pro přípravu standardních roztoků, k úpravě vzorků mateřského mléka před analýzou byla použita tato rozpouštědla:

- n-hexan 96%, multisolvent HPLC grade (Scharlau Chemie, Sentmenat, Španělsko)
- Hydroxid draselný – peletky, pure Ph. Eur (AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo)

- Kyselina L-askorbová p. a. (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Pyrogallol $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Monohydrát síranu zinečnatého (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Ethanol absolute (Merck, Darmstadt, Německo)
- Voda, LC-MS grade (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Rozpouštědla pro mobilní fázi:

- Methanol, LC-MS grade (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Acetonitril, LC-MS grade (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Voda, LC-MS grade (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Kyselina mravenčí (Merck KgGa, Darmstadt, Německo)
- Mravenčan amonný (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

5.2.3. Chromatografická metoda

Analýza vitaminů probíhala na systému UHPLC Nexera s tandemovou hmotnostní detekcí LCMS-8030 od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko) na koloně Kinetex C18 (1,7 μm ; 3 \times 100 mm) tvořenou povrchově porézními částicemi. Analytická kolona byla chráněna předklonkou security guard ultra cartridge C₁₈ (obojí Phenomenex, Aschaffenburg, Německo). Teplota kolony byla udržována kolonovým termostatem na 50 °C. Mobilní fáze byla tvořena 72 % acetonitrilu a 28 % LC-MS vody s přidavkem kyseliny mravenčí na pH 2,58 s průtokem 0,5 ml/min. Detekce byla provedena pomocí ESI-MS/MS (MRM) s trojitým kvadrupólem. Nástřik byl 20 μl vzorku a celkový čas analýzy byl 9 minut.

Tato metoda již byla optimalizována Výzkumnou laboratoří III. interní gerontometabolické kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové pro stanovení vitaminů 25-OH D₃ a 25-OH D₂ pomocí UHPLC MS/MS s využitím standardního referenčního materiálu NIST SRM 972 [177]. Vhodnost metody pro stanovení vitaminů v mateřském mléce byla ověřena.

Vyzkoušeli jsme záměnu kyseliny mravenčí za mravenčan amonný, avšak se neprokázal vhodnější než kyselina mravenčí.

5.2.4. Vývoj postupu pro přípravu vzorku

Při vývoji vhodné úpravy vzorku mléka jsme čerpali informace z odborných článků [177-180]. Tyto postupy byly vyzkoušeny a upravovány s cílem vyvinout jednoduchou a časově nenáročnou úpravu vzorku mléka s využitím v rutinní laboratoři ke stanovení větších počtů vzorků. Vzorky byly dodávány Mléčnou bankou od dárců ve sterilní lahvičce, poté rozděleny do menších objemů a následně zamrazeny.

Vzhledem k velmi nízkým hladinám vitamínu D v mateřském mléce jsme využili k zakonzentrování vzorků lyofilizaci. Při lyofilizaci se jedná o odstraňování vody ze zmrazeného mléka za pomoci sublimace ve vakuu. Podstata lyofilizace je v tom, že se látka zmrazí a vytvořený led se mění přímo na vodní páry v prostředí vakua. Je realizována v hermetické komoře, kde se udržuje absolutní tlak nižší než je napětí par ledu ve zmrazené hmotě. Teplo potřebné k vypařování se však musí neustále dodávat a vznikající páry odvádět. Sublimací je v komoře odpařeno až 60 % celkové vody při teplotě 40 – 60 °C.

Výhodou lyofilizace je, že nedochází k žádným enzymatickým změnám a bakteriálním procesům a také nejsou patrné téměř žádné fyzikálně-chemické změny.

Přes noc jsme nechali po malých objemech (10 ml) MM zmrznout, ráno vložili do lyofilizačního přístroje, kde docházelo k postupnému vysušování, po odpaření veškeré vody jsme získali 2,6 g sušiny, kterou jsme rozpustili v 5 ml LC-MS vody.

5.2.4.1. Optimalizace deproteinace

Pro optimální efekt uvolnění analytů z proteinových nosičů byly jako deproteinační činidla testovány různé chemikálie. K 200 µl mateřského mléka bylo nepipetováno deproteinační činidlo a směs důkladně promíchána. Jako deproteinační činidlo byl testován ethanol, methanol, acetonitril a monohydrát síranu zinečnatého. Deproteinace probíhala 5-15 minut za laboratorní teploty.

5.2.4.2. Optimalizace saponifikačního procesu

Saponifikace slouží k odstranění neutrálních lipidů, hlavně triglyceridů. Dělí se na saponifikaci za tepla a za chladu. Pro odstranění lipidů ze vzorku byl zvolen hydroxid draselný. Pro optimalizaci saponifikačního procesu byly testovány různé koncentrace KOH (5, 10 a 15 mol/l), s různým objemem hydroxidu (1, 1,5 a 2 ml), délka saponifikace

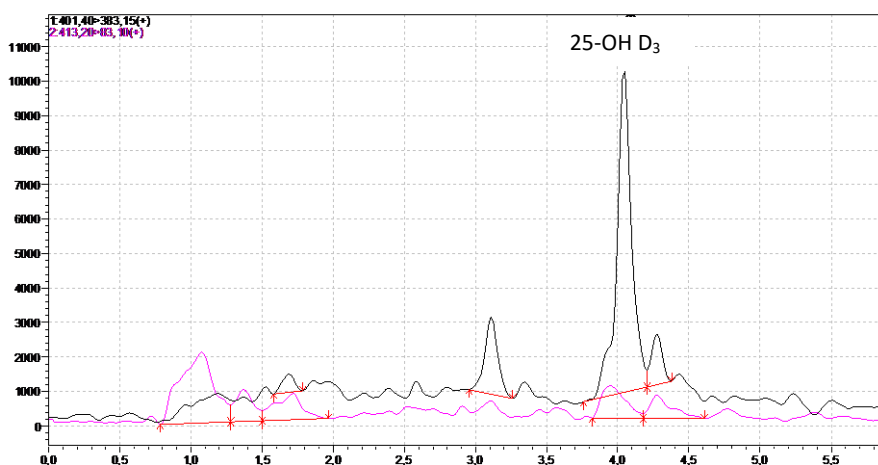
se pohybovala od 30 do 120 minut. Jako antioxidační činidlo jsme použili kyselinu askorbovou či pyrogallol k zabránění rozkladu sledovaných vitaminů.

5.2.4.3. Optimalizace LLE

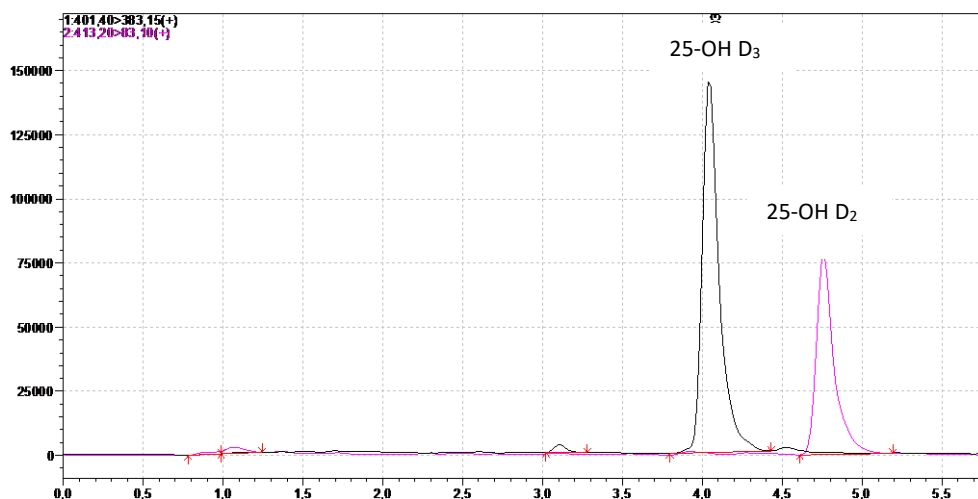
Základním postupem, ze kterého jsme vycházeli, byla extrakce vyvinutá Kašparovou a kol. [178]. Po vychladnutí saponifikované směsi na laboratorní teplotu jsme vitaminy extrahovali do organického rozpouštědla (hexan). Po dobu 5 – 20 minut byla směs intenzivně třepána na laboratorní třepačce. Po oddělení organické vrstvy centrifugací, byla tato vrstva odebrána a odpařena do sucha a znovu rozpuštěna v LC-MS methanolu.

Vyzkoušeli jsme extrakce bez předchozí saponifikace. Nejlepších výsledků jsme dosáhli s lyofilizovanými vzorky mateřského mléka. 200 μ l mateřského mléka bylo intenzivně promícháváno s 400 μ l methanolu a s 50 μ l 4% síranu zinečnatého jako precipitačního činidla. Po 10 minutové inkubaci byla směs centrifugována (5 minut, 3 220 g), odebraný supernatant byl filtrován přes filtrační mikrotitrační destičku a filtrát použit k analýze. Chromatogram této extrakce je na obr. 62. Vzhledem k omezenému skladovanému objemu mateřského mléka a velmi malému počtu vzorků, kde byl vitamin D detekován, nebylo možno validovat tuto metodu.

Většina vyzkoušených postupů extrakce nedosáhla pozitivních výsledků. Po přidání standardů hydroxy derivátů vitaminu D ke vzorkům mateřského mléka na počátku extrakce byly očekávané koncentrace naměřeny (obr. 63).



Obr.62: Chromatogram lyofilizovaného vzorku mateřského mléka za optimálních podmínek, 25-OH D₃: RT = 4,15 min, c = 4,15 nmol/l



Obr.63: Chromatogram lyofilizovaného vzorku mateřského mléka za optimálních podmínek s přidavkem standardů

25-OH D₃: RT = 4,05 min, c = 120 nmol/l

25-OH D₂: RT = 4,75 min, c = 115 nmol/l

5.2.5. Závěr

Cílem bylo vyvinout jednoduchou metodu úpravy mateřské mléka před konečnou analýzou hydroxyderivátů vitamínu D pomocí UHPLC-MS/MS. Bohužel se nepodařilo dosáhnout dostatečné citlivosti a naměřené hladiny vitamínu D se nacházely pod limitem detekce. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po extrakci, kdy bylo použito lyofilizované mateřské mléko, které bylo důkladně promícháno s LC-MS methanolem a síranem zinečnatým. Vitamin 25-OH D₃ byl detekován pouze u velmi omezeného množství vzorků mateřského mléka. U většiny vzorků se koncentrace vitamínu D nacházely pod limitem detekce a kvantifikace.

5.3. STANOVENÍ VITAMINU D V MLÉCE – PŘEHLED

I přes ohromný zájem o vitamin D v posledním desetiletí, neexistoval žádný kompletní přehled o možnostech jeho stanovení v mateřském mléce. Cílem této publikované práce, která je rešeršního charakteru, bylo podat podrobné, ucelené informace o všech možnostech stanovení vitaminu D a jeho metabolitů v mateřském mléce, ale také o úpravě vzorků mléka. Vzhledem k malému počtu publikovaných prací, které se touto problematikou zabývají, byly do tohoto přehledu zahrnuty i práce zabývající se analýzou vitaminu D a jeho metabolitů ve velice podobném biologickém materiálu - mléce kravském. Publikace zahrnuje celkem 30 citací zabývajících se touto tematikou z období let 1981 – 2012.

5.3.1. Úvod

Vitamin D je hormonový prekurzor vyskytující se ve dvou formách, jako vitamin D₂ nebo vitamin D₃. Aby mohly obě tyto formy aktivně působit na tkáně v těle, musí podstoupit řadu metabolických přeměn. Podrobný metabolismus vitaminu D v těle nalezneme v kap. 3.4.1. Metabolismus vitaminu D.

Kojené děti mohou být ohroženy nedostatkem vitaminu D v mateřském mléce. Obsah vitaminu D je v mateřském mléce 3x nižší než v plazmě matky a obsah 25-OH D je dokonce 100x nižší. Tento nedostatek vitaminu může ohrozit správný růst a vývoj kostí a způsobit onemocnění zvané křivice. Koncentrace liposolubilních vitaminů závisí na mnoha faktorech jako např. výživa a věk matky, stádium laktace atd. Specker a kol. [181] studoval vliv rasy a výživy na koncentraci vitaminu D a 25-OH D v mateřském mléce. Bylo zjištěno, že hladiny vitaminu D jsou nižší u matek s pigmentovanější kůží. Také byl popsán rozdíl koncentrace vitaminu D a jeho metabolitů u matek, které předčasně porodily oproti ženám s porody v termínu. U matek předčasným porodem byly prokázány vyšší hladiny 25-OH D vitaminu v mléce, ale hladina 1,25-(OH)₂-D zůstala neovlivněna.

Bylo publikováno několik přehledových článků o analýze vitaminu D. Higasi a kol. [182] sepsali přehled stanovení tohoto vitaminu v lidské plazmě/séru. Extrakcí v tuku rozpustných vitaminů v potravinách, tělních tekutinách a farmaceutických preparátech se zabývá článek Musteata a kol. [183] a Luque-Garcia [184].

V tomto review je prezentován přehled stanovení vitamínu D a jeho derivátů v mateřském a kravském mléce, jsou zde probrány všechny možnosti úpravy vzorku mléka před analýzou a následného chromatografické stanovení.

5.3.2. Úprava vzorku mléka před analýzou

Před analytickým stanovením je důležitá úprava vzorku. Optimalizace tohoto kroku hraje významnou roli ve zvýšení citlivosti a snížení matricových efektů v biologickém materiálu.

Vitamin D a jeho metabolity mají nepolární a neiontový charakter, chemickou strukturou jsou podobné steroidním hormonům. Nejčastěji užívanou technikou k předúpravě vzorku mléka je saponifikace, extrakce do kapaliny následovaná preparativní chromatografií k eliminaci nečistot.

K eliminaci analytických chyb kvůli ztrátám vitamínu D během úpravy vzorku se často do vzorku přidává interní nebo externí standard. Pro kvantifikaci je mnohem důležitější použití interního standardu kvůli reverzibilní izomerizaci s odpovídajícím previtaminem D. Alternativně může být přidán do vzorku jeden z vitamínu D₂ nebo D₃ ke kvantifikaci toho druhého. Pro MS detekci je ideální použít izotopicky značený standard.

5.3.2.1. Extrakce do kapaliny (LLE)

LLE patří mezi první a nejběžněji používané postupy přečištění vzorku mléka pro stanovení vitamínu D.

Prvním krokem LLE je saponifikace. Slouží k odstranění neutrálních lipidů, hlavně triglyceridů. Dělí se na saponifikaci za tepla a za chladu. Za tepla se používá roztok hydroxidu draselného v rozmezí teplot 60 – 100 °C po dobu 20 – 45 minut. Roztok hydroxidu draselného za pokojové teploty se přidává při saponifikaci za chladu. Kyselina askorbová, pyrogallol nebo butylhydroxytoluen se používají jako antioxidanty k zabránění rozkladu cílového analytu. Během saponifikace se může objevit tepelná izomerizace vitamínu D na provitamin D, která stěžuje LC/MS analýzu.

Jako extrakční činidlo se nejvíce používá hexan, dále pak diethyl ether, methanol-chloroform, metanol-metylen chlorid. Velice dobré výtěžnosti 85-110 % dosáhl Blanco a kol. [185] a Gomis a kol. [186] při použití hexanu jako extrakčního činidla a promytím směsí metanol-voda. Dobré výtěžnosti 91 – 105 % s hexan-etylacetátem dosáhl ve své

studii také Kamao a kol. [179] pro vitamin D₂, D₃ a jejich hydroxy metabolity. Nevýhoda této extrakce je velká časová náročnost.

Zakoncentrování vzorku probíhalo nejčastěji ve vakuové odparce nebo pod proudem dusíku. Aby se zabránilo rozkladu vitaminu D a jeho metabolitů používala se teplota do 50 °C.

Před rokem 2000 bylo navrženo mnoho komplikovaných a časově náročných postupů úpravy mléka. Další jejich nevýhodou byla nízká výtěžnost cílových analytů nebo nebyl tento parametr vůbec poskytnut.

Mezi nejvhodnější extrakční metody s vynikající výtěžností, nízkou spotřebou vzorků a rozpouštědel patří metody navržené Abernethy [180], i když kritickým bodem této studie je pomalá reakce derivatizačního činidla se vzorkem, a metoda dle Kaushik [187].

5.3.2.2. Extrakce na tuhé fázi (SPE)

Sep-pak silika a C-18 jsou nejčastěji používanými sorbety pro SPE náplně. Eluce vitaminů ze sep-pak siliky proběhla většinou pomocí hexanu s přídavkem izopropylalkoholu.

K dosažení čistějšího extraktu použilo mnoho autorů vícekrokové extrakce. Trenerry a kol. [188] využili pro MS detekci po silika SPE ještě další přečištění pomocí LLE. Zatímco Kunz a kol. [189] použili nejdříve LLE a poté SPE, nakonec k oddělení vitaminu D od balastních látek s podobnou polaritou využili preparativní chromatografii. I přes takto komplikovanou úpravu vzorku dosáhly výtěžnosti pouze 54 – 72%.

Pouze jediná studie aplikovala on-line SPE ve spojení s chromatografickým stanovením (Delgado-Zamarreno a kol. [190]). Celková analýza cílového vitaminu i s úpravou vzorku mléka vyžadovala pouhých 25 minut. I výtěžnost byla velice dobrá, v rozmezí 88 – 105%. Tato metoda poskytuje dobré validační parametry, nízkou spotřebu vzorku a je vhodná pro rutinní zpracování vzorků mléka, bohužel pouze pro vitamin D₃. Vhodná metoda pro stanovení vitaminu D₂ a D₃ a jejich prekurzory je stanovení dle Blanco a kol. [185].

5.3.2.3. Přímá extrakce

V několika studiích použili autoři přímou extrakci vitamínu D bez předchozí saponifikace. Nejužívanějším extrakčním rozpouštědlem byl hexan. K lepšímu rozrušení membrán tukových částic byl použit ultrazvuk spolu s přidáním ethanolu ke vzorku mléka. Výtěžnosti po přímé extrakci dosahovaly stejných hodnot jako po extrakci se saponifikací (89 – 107%).

5.3.3. Analytické metody

Současně používané techniky pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů se mohou rozdělit do dvou velkých skupin na imunochemické (CPBA - analýza kompetitivní vazby na proteiny, EIA – enzymoimunoanalýza, RIA – radioimunoanalýza) a neimunochemické techniky (chromatografické – HPLC, LC-MS). Rutinně jsou používané imunochemické metody, jsou poměrně levné, ale nejsou schopny kvantitativně rozlišit metabolity vitamínu D kvůli zkřížené reaktivitě protilátek.

Koncentrace vitamínu D v mléku je velice nízká obvykle v rozmezí $\mu\text{g/l}$ nebo ng/l , proto je vyžadována co nejcitlivější detekce. V současnosti jsou stále populárnější metody založené na kapalinové chromatografii ve spojení s UV detekcí, hmotnostní detekcí a tandemovou hmotnostní detekcí.

5.3.3.1. HPLC – normální fáze

Chromatografie na normálních fázích byla používána před rokem 2000. Jako mobilní fáze se používal hexan nebo směs hexanu s malým množstvím více polárního rozpouštědla jako např. isopropylalkohol nebo metyldichlorid. Téměř ve všech studiích byla použita izokratická eluce. Měření vitamínu D a jeho metabolitů v mléce probíhalo v několika krocích, zahrnovaly počáteční separaci cílového analytu za použití preparativní chromatografie, další přečištění na normální nebo reverzní HPLC a konečná kvantifikace pomocí imunochemických metod nebo UV-HPLC. HPLC na normální fázi sloužila hlavně k izolaci specifické frakce vitamínu D.

Metody založené na tomto postupu byly velice komplikované, časově náročné s velkou spotřebou rozpouštědel a s nedostatečnou citlivostí a účinností.

5.3.3.2. HPLC – reverzní fáze

V současnosti je kapalinová chromatografie na reverzních fázích nejpoužívanější chromatografická technika. Využívá nepolární stacionární fáze jako např. kolonu s oktadecylovým uhlíkovým řetězcem (-C18), používanou téměř ve všech studiích a polární mobilní fázi. Velikosti částic v analytické koloně se pohybovaly od 2,6 μm do 10 μm . K ochraně analytické kolony byla v některých případech použita předkolona.

Autoři Barba a kol. [191] porovnávali 3 různé kolony pro kvantifikaci vitamínu D₂ a D₃. Dvě kolony s náplní C18 o různé délce (150 mm a 250 mm) a kolonu s náplní C8. Zatímco kolona s náplní C8 nedostatečně rozlišila sledované vitamíny, kolona C18 o délce 150 mm dosáhla nejlepšího rozlišení.

Mobilní fáze byla nejčastěji tvořena směsí vody a methanolu, ethanolu nebo acetonitrilu. Byla použita i mobilní fáze ve složení acetonitril-methanol nebo 100 % methanol. Ve většině případu s gradientovou elucí.

Ve studii publikované od Kaushik a kol. [187] byla optimalizována mobilní fáze. Nejlepší rozlišení bylo získáno s mobilní fází ve složení acetonitril:methanol:chloroform (88:8:4) s průtokem 1 ml/min. Tato metoda nabízí nízký limit detekce a kvantifikace, dobrou reprodukovatelnost, ale pouze pro jeden analyt – vitamin D₂.

5.3.3.3. LC-UV

UV detekci je možné použít pro kvantifikaci vitamínu D a jeho metabolitů díky schopnosti těchto látek absorbovat UV záření v rozmezí 250 nm – 265 nm. Vitamin D₂ a D₃ byly detekovány při různých vlnových délkách – 264 nm, 250 nm, 265 nm či 254 nm.

Jakobsen a kol. [192] ve své studii použili detektor diodového pole a UV detektor. Detekční limity pro vitamin D a jeho hydroxy deriváty byly pro DAD detektor 2x nižší než pro UV detektor.

Citlivá metoda s užitím LC-UV dle Barba a kol. [191] měla limity detekce 0,82 – 1,57 ng/100ml pro vitamin D₂ a D₃.

Ve studii Kaushik a kol. byly porovnávány 3 různé vlnové délky – 228,254,265 nm pro stanovení vitamínu D₂ v mléku. Nejvyšší pík byl naměřen při vlnové délce 254 nm.

Použití chromatografické metody s UV detekcí řeší problém spojený se separací těchto vitamínů a umožňuje jejich individuální kvantifikaci.

5.3.3.4. LC-MS

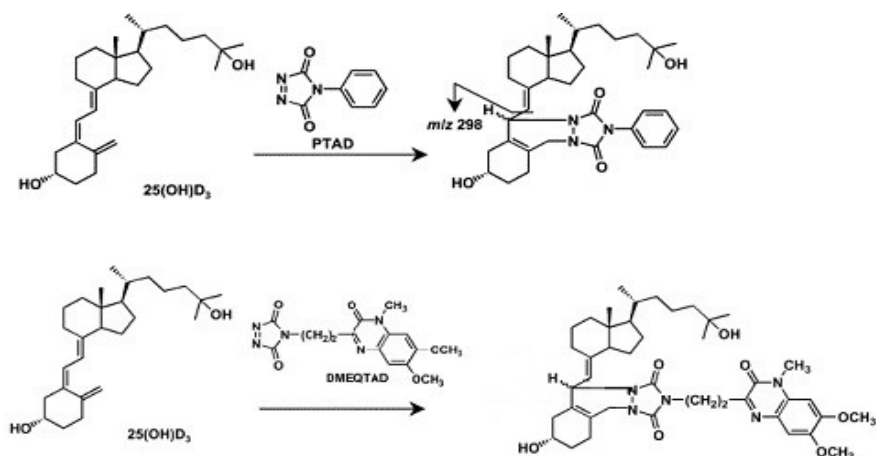
V posledním desetiletí je vzrůstající zájem o užívání kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS). S touto metodou se můžeme stále častěji setkat i v klinických laboratořích, kde poskytuje doplňující stanovení k tradičním rutinním metodám. Velkou výhodou oproti imunochemickému stanovení je možnost stanovit více analytů během jedné analýzy.

Ke stanovení vitamínu D a jeho metabolitů byly použity dva typy ionizace – ESI (ionizace elektrosprejem) a APCI (ionizace za atmosferického tlaku). Ve většině případů byly použity v pozitivním módu, pouze Careri a kol. [193] použil i negativní mód. Nejběžněji používaným detektorem v LC-MS analýze vitamínu D byl trojitý kvadrupól (QqQ) a iontová past (IT).

Metoda publikována dle Kamao a kol. [179] zahrnuje dvě metody extrakce a citlivou LC-APCI-MS/MS detekci s využitím izotopicky značených vnitřních standardů pro stanovení vitamínu D a jeho hydroxy metabolitů v mateřském mléce. Ke zvýšení ionizační účinnosti proběhla derivatizační reakce těchto analytů s DMEQ-TAD (4-[2-(3,4 –dihydro-6,7-dimethoxy-4-metyl-3-oxo-2quinoxaliny)etyl]) obrázek 64. Citlivost byla zvýšena 40x oproti formě vitamínu. Výhoda této metody je výtěžnost, která byla mezi 91-105%, ale díky zdoluhavé přípravě vzorku, délce analýzy (retenční čas 36 min pro vitamin D, 22 min pro 25-OH D) a velké spotřebě rozpouštědel, není tato metoda pro rutinní měření vhodná.

Mnohem rychlejší analýza (RT = 3,5 min) s malou spotřebou rozpouštědel a produkce odpadu (<45 ml - extrakce + chromatografie) a dobrou výtěžností (103,2% pro vitamin D₃) byla navržena Abernethy [180]. Ke zvýšení ionizace měřeného analytu byla provedena Diels-Alderova derivatizační reakce s PTAD (4-fenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion) viz obrázek 64. Podmínky detekce: (+)ESI – MS/MS.

V současnosti se LC-MS/MS stala nejpoužívanější chromatografickou metodou pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů. Jediná nevýhoda je vysoká pořizovací cena přístrojového vybavení a odborná kvalifikace personálu.

Obr.64: Derivatizace 25-OH D₃ s PTAD a DMEQTAD

5.3.4. Závěr

V této publikaci jsou shrnuty a kriticky rozebrány metody pro úpravu a analýzu vitamínu D a jeho metabolitů ve vzorku mateřského a kravského mléka.

V úpravě vzorku mléka k analýze je dáována přednost LLE před SPE. Nejběžněji používaný postup extrakce s uspokojujivými validačními parametry je saponifikace pomocí KOH a poté extrakce hexanem. Nejlepších výsledků v rozlišení a kvantifikaci sledovaných analytů bylo dosaženo za použití LC-MS metody. Ke zlepšení LC-MS detekce se používají izotopicky značené standardy.

Trendy v úpravě vzorku jsou zaměřeny hlavně na automatizaci extrakčního kroku, aby se zabránilo chybám a omezila se manipulace s nebezpečným biologickým materiálem. Také snížení objemu vzorku a používaných rozpouštědel sníží náklady na analýzu a zmenší množství odpadu. I když imunochemické metody budou stále rutinně používány v laboratořích, protože jsou poměrně levné a automatizované, chromatografické stanovení bude díky své přesnosti a správnosti jedna z nejdůležitějších metod pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů. Metody založené na LC-MS se stanou zlatým standardem stanovení vitamínu D.

Tento článek byl publikován v časopise Food Chemistry v roce 2015, roč. 171, s. 177–190. (IF = 4,529), počet citací 7

5.4. VLIV PASTERIZACE A NÁSLEDNÉHO SKLADOVÁNÍ NA HLADINY RETINOLU A ALFA-TOKOFEROLU V MATEŘSKÉM MLÉCE

Tato studie vznikla ve spolupráci s Mléčnou bankou Tkáňové ústředny Fakultní nemocnice Hradec Králové, která odebírá, zpracovává a skladuje mateřské mléko dárkyň pro potřeby novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzhledem k důležitosti této tekutiny, hlavně pro nedonošené kojence, jsme na základě požadavků Tkáňové ústředny sledovaly možnost ovlivnění v tuku rozpustných vitaminů retinolu a α -tokoferolu metodou pasterizace a následného skladování po dobu 12 ti týdnů. Byly zpracovány vzorky mateřského mléka, extrahovány sledované vitaminy a analyzovány pomocí HPLC, nakonec bylo provedeno statistické vyhodnocení naměřených dat.

5.4.1. Úvod

Mateřské mléko obsahuje všechny potřebné živiny a je jedinou přirozenou a nenahraditelnou výživou pro novorozence pro správný růst a vývoj dítěte. Světová zdravotnická organizace doporučuje plné kojení během prvních 6-ti měsíců života. Kojené děti jsou v průměru odolnější k infekcím a alergiím oproti nekojeným dětem. Pokud, ale novorozenec nemůže být z jakéhokoliv důvodu kojen, je důležité poskytnout mu plnohodnotnou náhradu. K tomuto účelu začaly ve světě při nemocnicích vznikat banky mateřského mléka. Mléčné banky uchovávají, zpracovávají a distribuují mateřské mléko jako optimální výživu pro novorozence, zejména nedonošené děti na oddělení JIP. Většinou jde o mléko od jejich matek, dále matek z oddělení šestinedělí, ale i od dárkyň. V České republice se může nepasterizované mléko dávat pouze vlastním dětem. Exspirace čerstvého mléka je 24 hodin. Aby se zabránilo přenosu viru HIV a jiným patogenům, musí se mléko od dárkyň pasterizovat. Metoda používaná k pasterizaci mateřského mléka v mléčných bankách se nazývá Holderova pasterizace. Tato metoda využívá teploty 62,5°C po dobu 30-ti minut. Takto zpracované mléko má expiraci 12 týdnů. I když může docházet při této úpravě ke snížení důležitých biologických složek jako jsou imunoglobuliny, laktoferrin či některé vitaminy. Holderova pasterizace je kompromisem mezi mikrobiologickou bezpečností a uchováním všech potřebných látek.

α -Tokoferol (hlavní izomer vitamínu E) je jedním z nejdůležitějších antioxidantů v mateřském mléce. Chrání tkáň před chromozomálním poškozením a oxidací DNA tím, že eliminuje volné radikály. Retinol (vitamin A) také patří k antioxidantům. Dále je nepostradatelný pro správný zrak, růst a diferenciaci buněk a embryogenezi.

Cílem této práce bylo zjistit, zda dochází k ovlivnění hladin liposolubních vitaminů retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce po procesu pasterizace a následném skladování mléka po celou dobu jeho trvanlivosti (12 týdnů). Dosud publikované práce zabývající se touto problematikou mají rozporuplné výsledky. Také to byl jeden z důvodů, proč tato studie ve spolupráci s Mléčnou bankou Tkáňové ústředny Fakultní nemocnice Hradec Králové vznikla.

5.4.2. Sběr vzorků a pasterizace

25 vzorků mateřského mléka (50 ml) pocházelo od zdravých matek ve věku 26 – 39 let, období laktace se pohybovalo v rozmezí 7 až 53 dní.

Vzorky mateřského mléka byly doručeny do Mléčné banky, kde z každého vzorku byly odebrány 2 ml mléka pro stanovení hladin vitaminů před pasterizací. Mléko poté prošlo dlouhodobou pasterizací za nízké teploty (Holderova metoda), která je popsána v kap. 3.2.1. Ihned poté byly odebrány opět 2 ml pro stanovení obsahu vitaminů po pasterizaci. Zbytek vzorku mléka byl rozdělen na 5 alikvotů po objemu 4 ml a skladován při teplotě $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tyto alikvoty byly použity pro sledování změn koncentrace retinolu a α -tokoferolu v 1., 2., 4., 8. a 12. týdnu skladování. 12 týdnů je maximální doba použitelnosti mateřského mléka v Mléčné bance Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Po této době dochází k likvidaci nevyužitého mléka. Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

Postup této studie schválila Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky použité ve studii byly získány na základě informovaného souhlasu od všech zúčastněných dáreků.

5.4.3. Přístrojové vybavení a chemikálie

5.4.3.1. Laboratorní vybavení

Pro přípravu standardních roztoků a k úpravě vzorků mateřského mléka byly použity analytické váhy Sartorius ME5-OCE (Sartorius AG, Goettingen, Německo), k míchání vzorků před deproteinizací a saponifikací byla použita stolní třepačka LabDancer IKA (Staufen, Germany). Termostat Stericell BMT (Brno, ČR) byl využit k zahřívání vzorků během saponifikace. K extrakci vitaminů, separaci a odpaření organické vrstvy byly použity horizontální laboratorní třepačka LT1 Kavalier (Votice, ČR), centrifuga Eppendorf 5810-R (Hamburk, Německo) a laboratorní vakuová odparka Eppendorf concentrator 5301 (Hamburk, Německo).

K analýze retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce byl využit HPLC systém Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) vybavený autosamplérem Rack changer II pro mikrotitrační destičky, autosamplérem na vialky SIL/20AC a degaserem DGU-20A5. Součástí systému jsou dvě pumpy LC20-AB (rozsah průtoku 0,0001 – 10,0 ml), kolonový termostat CTO-20A (rozsahu teplot -10 až 85 °C). Analyty byly detekovány pomocí DAD detektoru SPD-M20A. Komunikaci s počítačem zajišťuje komunikačním modul CBM-20AC.

5.4.3.2. Použité chemikálie

Pro přípravu standardních roztoků byly použity následující látky:

- Retinol, $\geq 97,0\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- (\pm)- α -Tocopherol, synthetic, $\geq 96\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Pro přípravu standardních roztoků, k úpravě vzorků mateřského mléka před analýzou byla použita tato rozpouštědla:

- n-hexan 96%, multisolvent HPLC grade (Scharlau Chemie, Sentmenat, Španělsko)
- Hydroxid draselný – peletky, pure Ph. Eur (AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo)
- Kyselina L-askorbová p. a. (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

- Ethanol absolute (Merck, Darmstadt, Německo)
- Deionizovaná voda (Goro, Praha, ČR) – připravena čerstvá v laboratoři metodou reverzní osmózy a filtrace

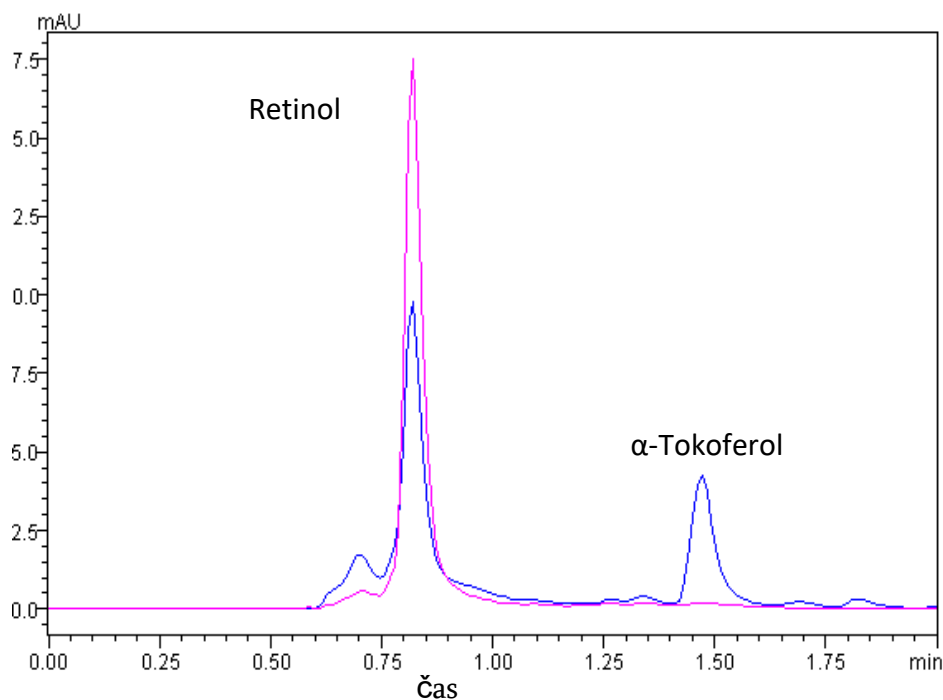
Rozpouštědla pro mobilní fázi:

- Methanol, HPLC grade (Merck, Darmstadt, Německo)

5.4.4. Analýza vitaminů

Metoda pro extrakci retinolu a α -tokoferolu z mateřského mléka byla vyvinuta ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky FN HK [178]. Vzorky mateřského mléka byly rozmrazeny a ohřáty ve vodní lázni na 37 °C za stálého míchání. K odstranění proteinů byly k 0,5 ml vzorku přidány 2 ml chlazeného ethanolu. Dále byl přidán 1 ml kyseliny askorbové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$), aby nedocházelo k oxidaci sledovaných vitaminů. Po přidání 1 ml 10 M hydroxidu draselného následovala saponifikace po dobu 30 minut při 80°C ve tmě. Extrakce vitaminů probíhala do 2 ml hexanu na horizontální třepačce po dobu 5 min. Pro oddělení hexanové vrstvy následovala centrifugace (3 220 x g, 10 minut, 4 °C). Před HPLC analýzou bylo 1,5 ml hexanové vrstvy odpařeno ve vakuové odparce (45 °C) a odparek rozpuštěn v 375 μl methanolu.

Koncentrace α -tokoferolu a retinolu byla stanovena HPLC metodou vyvinutou Krčmovou a kol. (2010) ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky FN HK. Separace analyzovaných vitaminů probíhala na monolitické koloně Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Objem nástřiku byl 20 μL . Jako mobilní fáze byl použit methanol při průtoku 2,5 ml/min a 25 °C. Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru při vlnové délce 325 nm pro retinol a 295 nm pro α -tokoferol. Celkový čas analýzy byl 1,8 minuty. Na obrázku 65 je znázorněn chromatogram vzorku mateřského mléka.



Obr.65: Chromatogram vzorku mateřského mléka

Retinol: RT=0,81 min, c=1,04 $\mu\text{mol/l}$

α -Tokoferol: RT=1,47 min, c=14,74 $\mu\text{mol/l}$

5.4.4.1. Statistické vyhodnocení

K zhodnocení změn hladin vitaminů před a po pasterizaci a během skladování po dobu 12 týdnů byla provedena statistická analýza softwarem NCSS 2007 (Kaysville, USA). Rozdíly mezi vzorky čerstvého mléka, zpracovaných vzorků a vzorků během skladování byly vyhodnoceny jednocestnou analýzou ANOVA. Pro porovnání středních hodnot možných změn hladin sledovaných vitaminů byl proveden neparametrický test Wilcoxon Signed-Rank. Hladina statistické významnosti byla zvolena na úrovni $p < 0,05$.

5.4.5. Výsledky a diskuze

Průměrné hodnoty koncentrace retinolu a α -tokoferolu se směrodatnými odchylkami před a po pasterizačním procesu a během skladování jsou uvedeny v tabulce 8. Mateřské mléko obsahuje přibližně 1,8 $\mu\text{mol/l}$ retinolu a 13,8 $\mu\text{mol/l}$ α -tokoferolu. Doporučená denní dávka vitaminu A pro děti do 6-ti měsíců je 400 μg (1,4 $\mu\text{mol/l}$), vitaminu E je 3 mg (7 $\mu\text{mol/L}$) (National Research Council) nebo 4 mg (9 $\mu\text{mol/L}$). Tato

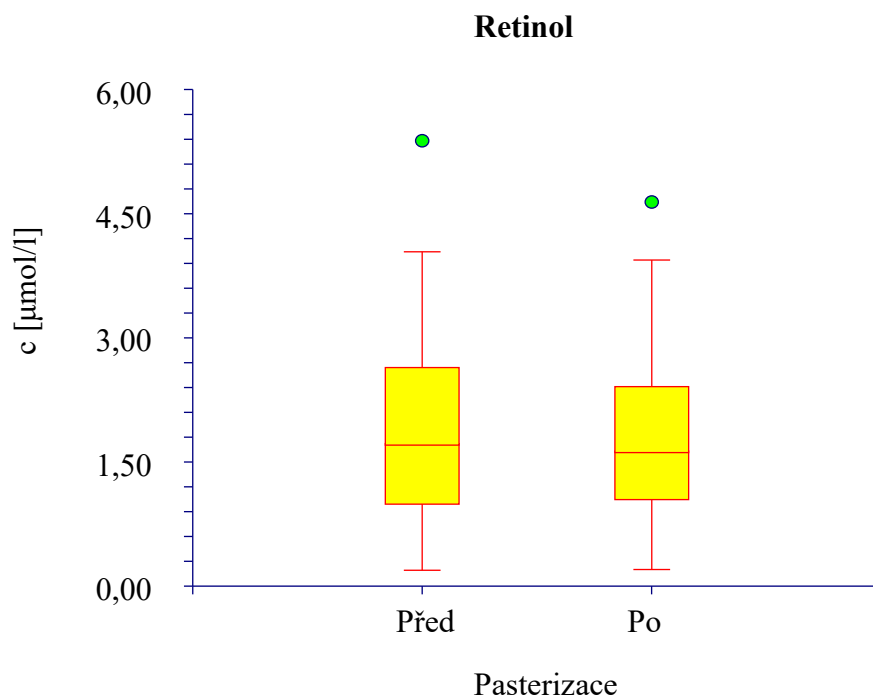
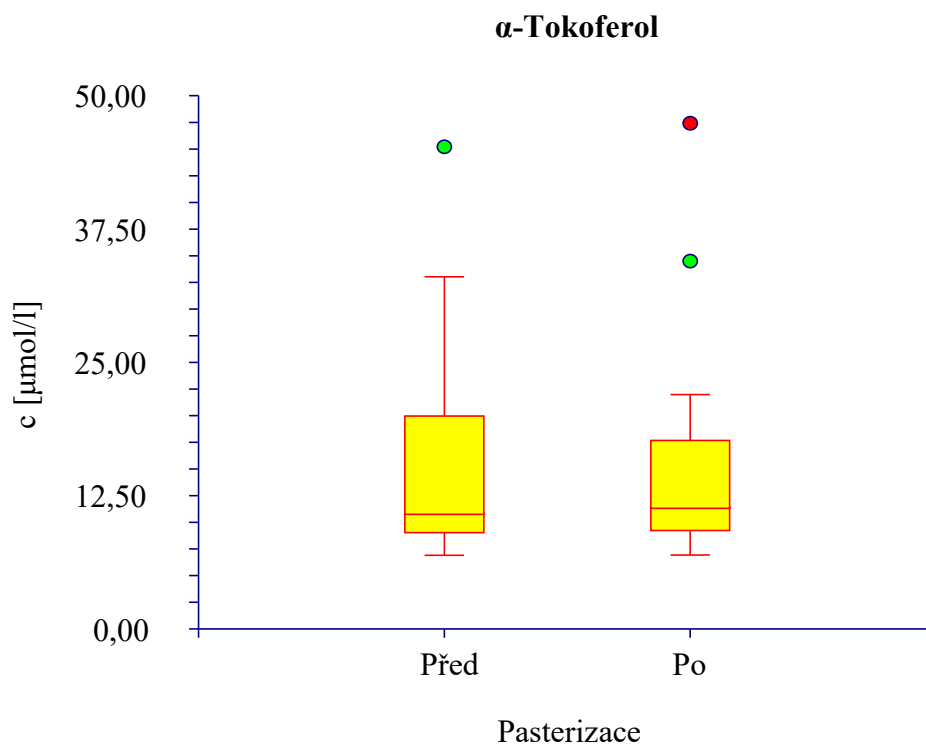
doporučení jsou splněna pro hladiny vitamínu i po pasterizaci i po 12-ti týdenním skladování při $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nebyl zaznamenán statisticky významný pokles koncentrace retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce z Mlečné banky ani po tepelném zpracování mateřského mléka ani po skladování v mrazu. I když došlo k nepatrnému snížení hladiny retinolu u vzorků mateřského mléka po pasterizaci oproti nepasterizovaným vzorkům, nebyl tento pokles statisticky významný. Grafické znázornění změn hladin retinolu a α -tokoferolu před a po pasterizaci a v průběhu skladování je uvedeno na obrázku 66 a na obrázku 67 (mediány se směrodatnými odchylkami a rozsah koncentrací).

Tab.8: Srovnání průměru (\pm směrodatná odchylka) koncentrací α -tokoferolu a retinolu v mateřském mléce ovlivněných pasterizací a skladováním

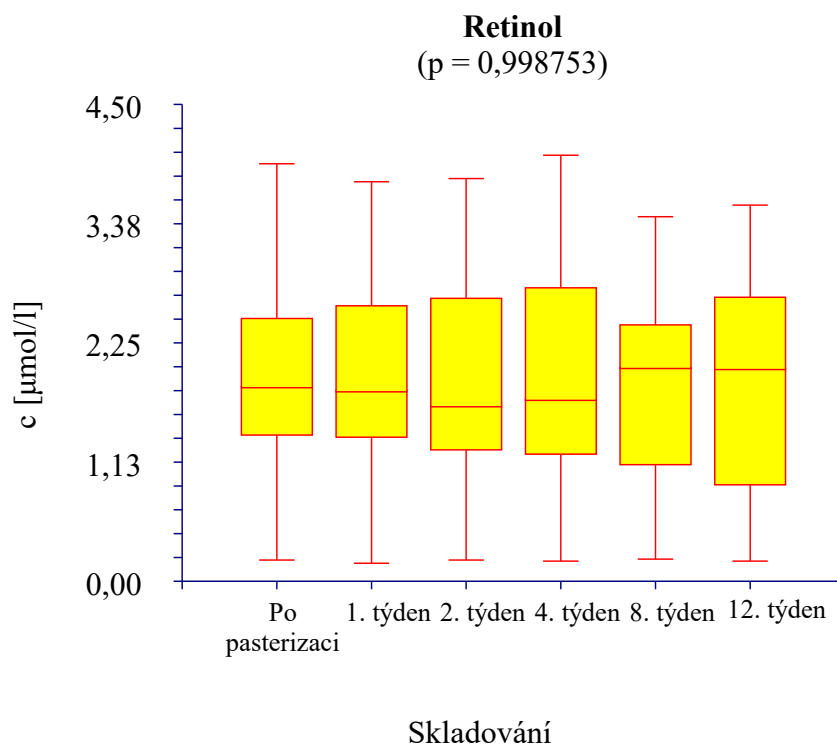
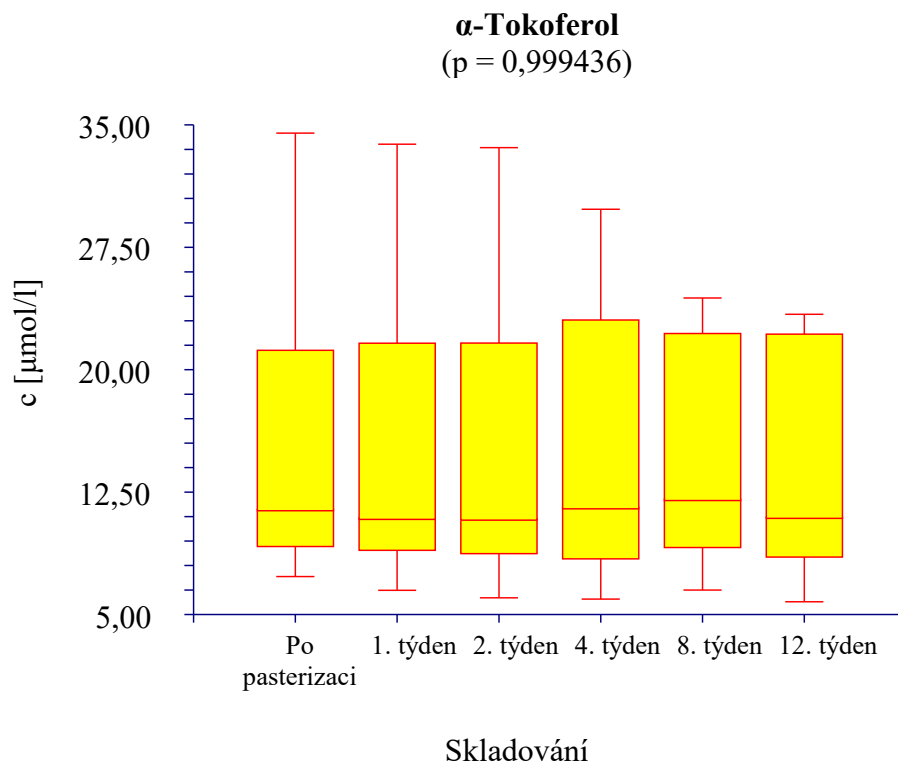
Analyt ($\mu\text{mol/l}$)	α -Tokoferol				Retinol			
	N ^a	Průměr	SD ^b	Hladina významnosti	N ^a	Průměr	SD ^b	Hladina významnosti
Čerstvé vzorky	25	14,91	10,88		25	1,95	1,31	
Po pasterizaci	25	14,58	11,44	0,969039	25	1,88	1,14	0,084765
1. týden skladování	19	13,63	7,08	0,136299	19	1,88	1,04	0,30422
2. týden skladování	19	13,49	7,20	0,055816	19	1,90	1,08	0,951818
4. týden skladování	19	13,97	7,41	0,793568	19	1,96	1,15	0,397202
8. týden skladování	15	13,94	6,31	0,211016	15	1,82	0,99	0,255124
12. týden skladování	15	13,17	6,38	0,292993	15	1,82	1,06	0,292603

^a počet vzorků mateřského mléka

^b směrodatná odchylka



Obr.66: Změny koncentrace retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce před a po Holderově pasterizaci



Obr.67: Změny koncentrace retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce v průběhu skladování při $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.4.6. Závěr

Během této studie byl sledován vliv zpracování mateřského mléka pomocí Holderovy pasterizace a následného uskladnění po dobu 12-ti týdnů v Mléčné bance Tkáňové ústředny FN HK na hladinu liposolubilních vitaminů retinolu a α -tokoferolu. Výsledky neprokázaly statisticky významné snížení koncentrace retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce ani po pasterizaci ani po celé době skladování při teplotě $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bylo zjištěno, že zpracováním a uchováváním dárcovského mateřského mléka v Mléčné bance FN HK není ovlivněna jeho kvalita a že je zachován dostatečný příjem liposolubilních vitaminů A a E pro novorozence a kojence hospitalizované na Dětské klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Tato práce významně přispěla k objasnění stále nevyřešené otázky, zda zpracování mateřského mléka Holderovou pasterizací ovlivňuje hladiny významných antioxidantních vitaminů.

Výsledky studie jsou odeslány do odborného časopisu *Analytical Letters* pod názvem „The effect of processing and storage on α -tocopherol and retinol levels in human breast milk“.

5.5. ZMĚNY KREVNÍCH ANTIOXIDANTŮ BĚHEM LÉČBY VĚKEM PODMÍNĚNÉ MAKULÁRNÍ DEGENERACE RHEOHEMAFERÉZOU

Tato publikace vznikla ve spolupráci se IV. interní hematologickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové, kde se dlouhodobě zabývají léčbou pacientů pomocí metody extrakorporální eliminace lipidů – aferézy a rheohemaferézy. Nově byla tato metoda úspěšně využita pro pacienty s věkem podmíněnou makulární degenerací (AMD). Tato práce byla součástí rozsáhlé klinické studie, která měla zhodnotit vliv rheohemaferézy na různé krevní antioxidační parametry u pacientů s AMD. V této studii jsem se podílela na zpracování přijatých vzorků krve, často už od oddělení séra z plné krve, přes ultracentrifugaci lipoproteinových frakcí, následnou extrakci vitaminů až po konečnou HPLC analýzu a kvantifikaci α -tokoferolu a retinolu.

V rámci studie byly monitorovány změny hladin krevních antioxidantů vitamínu E (α -tokoferolu), vitamínu A (retinolu) v séru a lipoproteinových frakcích (HDL, LDL, VLDL) během léčby věkem podmíněné makulární degenerace (AMD – age-related macular degeneration) extrakorporální eliminací – rheohemaferézou (RH). α -Tokoferol byl rovněž analyzován v erytrocytární membráně. Dalšími sledovanými markery antioxidační aktivity byly glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza a malondialdehyd jako marker lipidové peroxidace. Také byly měřeny koncentrace cholesterolu a triglyceridů. Ačkoliv má tato metoda mnoho pozitivních účinků, je zde podezření, že může snižovat hladiny antioxidantů jako je vitamin A a E v krvi.

Onemocnění AMD způsobuje závažné poškození retiny, které může vést až ke ztrátě vidění. Přibližně 30% seniorů nad 75 let má nějaké příznaky této nemoci a 10% z těchto pacientů má pokročilé či pozdní stádium AMD. Klinicky lze rozdělit AMD na dvě formy – suchá forma (80-90%) a vlhká forma.

Lečba rheohemaferézou, která filtrací plazmy odděluje vysokomolekulární komponenty, snižuje viskozitu krve a zlepšuje metabolismus v postižených očních oblastech. Touto metodou dochází k separaci vysokomolekulárních látek jako např. fibrinogenu, imunoglobulinů, LDL cholesterolu a jiných z krevního řečiště.

Do studie bylo zahrnuto 23 pacientů (9 mužů, 14 žen, ve věku 41-85 let) s non-neovaskulární (suchá) formou AMD. Pacienti prodělali celkem 8 procedur RH (2x týdně

jednou za 3 týdny). Postup této studie schválila Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky použité ve studii byly získány na základě informovaného souhlasu od všech zúčastněných pacientů.

Vzorky krve byly odebírány před a po procesu léčby metodou extrakorporální eliminace. Po odběru byly ihned dopraveny do Výzkumné laboratoře III. Interní gerontometabolické kliniky, kde bylo po centrifugaci odděleno sérum, které bylo následně zamraženo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lipoproteinové frakce byly získány z čerstvého séra pomocí gradientové ultracentrifugace. K 0,5 ml séra bylo přidáno 0,5 ml 0,9 % roztoku NaCl s 0,1 % EDTA a po 1. ultracentrifugaci séra (65 minut při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1\ 000\ 000\ \times\ g$) byla oddělena spodní vrstva s HDL a LDL frakcí od vrchní vrstvy s VLDL frakcí, která byla odebrána do nové zkumavky a následně zamražena. Zbytek nerozděleného séra byl napipetován do nové ultracentrifugační zkumavky, přidáno 0,5 ml 16,7 % roztoku NaCl, směs promíchána a následovala 2. ultracentrifugace (65 minut při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1\ 000\ 000\ \times\ g$), po oddělení HDL a LDL frakce, byly tyto frakce odebrány do nových zkumavek a zamraženy při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po shromáždění dostatečného počtu vzorků byly rozmrazeny a dále zpracovány k analýze pomocí HPLC.

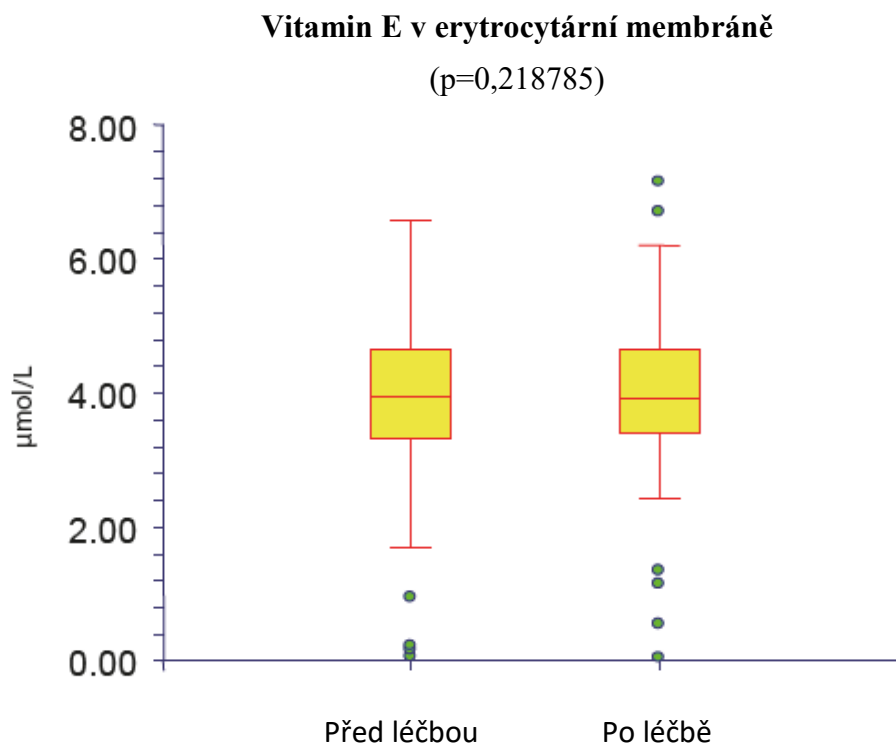
Extrakce a analýza α -tokoferolu a retinolu v séru, lipoproteinových fracích a erytrocytární membráně probíhala ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky dle metod zde vyvinutých Urbánkem a kol. [194]. Ostatní analyty byly analyzovány na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK na biochemických analyzátoch s komerčně dostupnými kity. Statistická analýza naměřených dat byla provedena softwarem NCSS 2007 (Kaysville, USA). Rozdíly mezi vzorky před a po léčbě byly vyhodnoceny neparametrickým testem Mann-Whitney U a Wilcoxon Signed-Rank. Hladina statistické významnosti byla zvolena na úrovni $p \leq 0,05$.

Z naměřených výsledků je patrný výrazný pokles sérových hladin cholesterolu a triglyceridů. Jejich hodnoty klesly o 31 – 65 %, což dokazuje účinnost odstranění vysokomolekulárních látek z krve pacienta léčbou rheohemaferézou a zlepšení mikrocirkulace v poškozených orgánech. Sérové hladiny vitamínu A zaznamenaly také statisticky významný pokles, avšak toto snížení nebylo pod fyziologickou hodnotou. K nepatrnému snížení, statisticky nevýznamnému, došlo u glutathion peroxidázy a superoxid dismutázy. Naopak zvýšená sérová hladina (o 17 %) byla pozorována u markeru lipidové peroxidace malondialdehydu, která byla statisticky významná. O 2 %

vyšší hladina vitamínu E byla zaznamenána po léčbě v erytrocytární membráně (obr. 68), léčba RH nemá vliv na buněčný oxidační stres. Zatímco v séru a lipoproteinových frakcích hladiny vitamínu E klesly (Tab. 9). Důležitějším parametrem než koncentrace samotného α -tokoferolu je poměr vitamín E/cholesterol v séru a lipoproteinových frakcích. Studie prokázala, že relativní obsah vitamínu E, který je charakterizován právě poměrem vitamín E/cholesterol, byl dokonce vyšší a že nedošlo při léčbě rheohemaferézou ke ztrátě vitamínu E (Tab. 10). Tento závažný fakt potvrzovala i klinická fakta, pacienti po léčbě extrakorporální eliminací neprokazovali žádné známky nedostatku vitamínu E.

Závěrem lze říci, že léčba věkem podmíněné makulární degenerace rheohemaferézou nemá negativní vliv na antioxidační kapacitu, což je velice významný a zcela nový poznatek, který přinesla tato klinická studie.

Tato klinická studie byla publikována v časopise Biomedical papers v roce 2015, roč. 159(3), s. 400-406.



Obr.68: Změny koncentrace α -tokoferolu v erytrocytární membráně před a po léčbě RH

Tab.9: Koncentrace vitamínu E v séru a lipoproteinových frakcích před a po rheohemaferéze

Vitamin E	Počet vzorků	Před ($\mu\text{mol/l}$)	Po ($\mu\text{mol/l}$)	Snížení (%)	Hladina významnosti
sérum	68	22,23	11,00	50,52	0,001
VLDL	66	6,31	2,56	59,43	0,001
LDL	66	9,45	3,83	59,47	0,001
HDL	67	6,45	3,88	39,85	0,001

Tab.10: Poměr vitamínu E / cholesterol v séru a lipoproteinových frakcích před a po rheohemaferéze

Vitamin E /cholesterol	Počet vzorků	Před ($\mu\text{mol/L}$)	Po ($\mu\text{mol/L}$)	Zvýšení (%)	Hladina významnosti
sérum	65	5,42	6,28	15,87	0,001
VLDL	64	7,88	9,80	24,37	0,000309
LDL	57	4,16	5,11	22,84	0,000006
HDL	65	6,36	6,48	1,89	0,043457

5.6. VLIV LDL-AFERÉZY A RHEOHEMAFERÉZY NA VITAMIN E

Ve spolupráci se IV. interní hematologickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové byla provedena klinická studie sledující vliv extrakorporálních eliminačních procedur, jako jsou LDL-aferéza a rheohemaferéza k odstranění LDL cholesterolu z krve pacientů s familiární hypercholesterolémií, na koncentrace vitamínu A, E a dalších markerů antioxidační aktivity. V této studii jsem se podílela na zpracování přijatých vzorků krve od oddělení séra z plné krve, přes ultracentrifugaci lipoproteinových frakcí, následnou extrakci vitamínů, až po konečnou HPLC analýzu a kvantifikaci α -tokoferolu a retinolu.

Familiární hypercholesterolémie je onemocnění s autosomálně dominantním typem dědičnosti. Nastává v důsledku mutace genu kódujícího LDL receptor, což zabraňuje vstupu LDL cholesterolu do buněk a dochází ke zvýšení koncentrace LDL cholesterolu v krvi. Toto onemocnění se může vyskytovat ve dvou formách: vzácná homozygotní nebo častější heterozygotní. Pacienti s homozygotní formou nevykazují žádnou nebo nízkou odezvu na farmakologickou léčbu např. statiny. Proto tito pacienti docházejí na LDL-aferézu. Vzhledem k tomu, že tato léčebná procedura odstraňuje z krve LDL částice, které však také obsahují několik typů antioxidantů, může docházet i k jejich eliminaci z těla pacienta.

Sledování změn antioxidačních markerů jako jsou vitaminy (vitamin A, vitamin E) či enzymy (glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza), díky kterým se tělo brání proti volným radikálům během extrakorporální lipoproteinové eliminace, bylo ve středu zájmu této studie. Dalšími monitorovanými parametry byly cholesterol, triglyceridy a malondialdehyd.

Skupinu 12-ti dlouhodobě sledovaných pacientů tvořilo 7 mužů a 5 žen s věkovým rozpětím 21 – 63 let. Z toho měli 4 pacienti homozygotní formu a 8 heterozygotní. Pacienti pravidelně docházeli na léčebné procedury během 3 – 12 let na IV. Interní hematologickou kliniku ve FN HK. Všichni pacienti zahrnutí do studie podepsali informovaný souhlas se studií, kterou schválila Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Vzorky krve byly odebírány před a po léčebné aferéze. Po odběru byly dopraveny do Výzkumné laboratoře KGM k následnému zpracování, uskladnění a analýze. Po

oddělení séra a ultracentrifugaci lipoproteinových frakcí byly vzorky zamrazeny a po soustředění dostatečného počtu vzorků byly rozmrazeny a dále upraveny před konečnou analýzou.

Extrakce vitaminů a jejich analýza na HPLC přístroji probíhala ve Výzkumné laboratoři GMK dle metod zde vyvinutých Urbánkem a kol. [194]. Ostatní analyty jako cholesterol, triglyceridy či enzymy byly analyzovány na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK na biochemických analyzátoch s komerčně dostupnými kity. Statistická analýza naměřených dat byla provedena softwarem NCSS 2007 (Kaysville, USA) za použití neparametrického testu Mann-Whitney U a Wilcoxon Signed-Rank. Hladina statistické významnosti byla zvolena na úrovni $p \leq 0,05$.

U cholesterolu došlo k očekávanému snížení o 77% u LDL aferézy a 66% u rheohemaferézy. U triglyceridů došlo po léčebné proceduře k poklesu hladin zhruba na polovinu oproti počátečním hodnotám. U TAG-HDL frakce došlo po HDL aferéze naopak k navýšení, avšak tento nárůst nebyl statisticky významný. Rheohemaferéza eliminovala tuto frakci o 27%. Také koncentrace vitaminů A a E byly naměřeny nižší. Sérová hladina retinolu klesla přibližně o 20%, ale ne pod fyziologické hodnoty, které se nacházejí u zdravých jedinců. Vitamin E klesl jak v séru, tak v lipoproteinových frakcích po obou léčebných procedurách. Tyto výsledky jsou prezentovány v tabulce 11. U enzymů a malondialdehydu nebyly zaznamenány výraznější změny. Naopak nárůst v rozmezí 5-61 % byl pozorován u poměru vitamin E/cholesterol. Jediné nepatrné snížení (1-6 %) bylo evidováno u poměru vitamin E/cholesterol u HDL frakce. Hodnota tohoto poměru poskytuje nejdůležitější informace o oxidačních procesech. Výsledky jsou prezentovány v tabulce 12.

Tato klinická studie prokázala, že LDL-aferéza a rheohemaferéza jsou bezpečné a účinné metody pro léčbu familiární hypercholesterolemie bez nežádoucích vlivů na oxidační kapacitu.

Výsledky studie byly publikovány v časopise *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* v roce 2015, roč. 61, s. 105-112. (IF₂₀₁₆ = 0,674).

Tab.11: Koncentrace vitamínu E a A v séru, lipoproteinových frakcích a erytrocytní membráně před a po LDL-aferéze (AP) a rheohemaferéze (RH)

Analyt	aferéza	Počet vzorků	Před (μmol/L)	Po (μmol/L)	Hladina významnosti
Vitamin E - sérum (μmol/L)	AP	159	27,00	11,70	p<0,0001
	RH	144	25,36	11,69	p<0,0001
	AP+RH	303	26,22	11,71	p<0,0001
Vitamin E - VLDL (μmol/L)	AP	159	8,88	3,28	p<0,0001
	RH	146	9,07	3,68	p<0,0001
	AP+RH	305	8,97	3,47	p<0,0001
Vitamin E - LDL (μmol/L)	AP	158	12,54	3,37	p<0,0001
	RH	144	10,97	3,90	p<0,0001
	AP+RH	302	11,79	3,62	p<0,0001
Vitamin E - HDL (μmol/L)	AP	160	6,80	4,34	p<0,0001
	RH	146	5,96	3,48	p<0,0001
	AP+RH	306	6,40	3,93	p<0,0001
Vitamin E - ery (μmol/L)	AP	154	3,54	3,62	0,128334
	RH	140	3,02	3,15	0,002414
	AP+RH	294	3,29	3,39	0,001683
Vitamin A - sérum (μmol/L)	AP	158	1,57	1,23	p<0,0001
	RH	145	1,81	1,46	p<0,0001
	AP+RH	303	1,69	1,34	p<0,0001

Tab.12: Poměr vitamínu E a cholesterolu v séru a lipoproteinových frakcích před a po LDL-aferéze (AP) a rheohemaferéze (RH)

Vit.E/cholesterol (10 ⁻³)	aferéza	Počet vzorků	Před (μmol/l)	Po (μmol/l)	Hladina významnosti
sérum	AP	149	5,73	9,25	p<0,0001
	RH	142	5,11	6,22	p<0,0001
	AP+RH	291	5,43	7,77	p<0,0001
VLDL	AP	155	8,62	10,49	p<0,0001
	RH	144	8,42	10,41	p<0,0001
	AP+RH	299	8,50	10,45	p<0,0001
LDL	AP	155	4,29	5,02	p<0,0001
	RH	143	3,97	4,17	p<0,0001
	AP+RH	298	4,14	4,61	p<0,0001
HDL	AP	157	6,85	6,46	0,028095
	RH	146	6,11	6,05	0,007528
	AP+RH	303	6,49	6,26	p<0,0001

5.7. PROGNOSTICKÝ VÝZNAM KONCENTRACE NEOPTERINU V SÉRU A MOČI U PACIENTŮ S KARCINOMEM REKTA LÉČENÝCH CHEMORADIACÍ

Tato práce vznikla z dat naměřených ve Výzkumné laboratoři ve spolupráci s prof. Melicharem a jeho týmem z Onkologické kliniky FN Olomouc, který se zabývá sledováním vybraných analytů u pacientů s nádorovým onemocněním. V této práci jsem zpracovávala přijatý biologický materiál z Olomouce a podílela se na konečné HPLC analýze a kvantifikaci biomarkerů.

Nádor konečníku je spojen s vysokou úmrtností a důležitou roli v jeho léčbě hraje chirurgické odstranění, ozařování postiženého místa a chemoterapie. Vyrůstající roli v onkologii mají laboratorní biomarkery, které jsou spojovány nejen s aktivitou nádorových buněk, ale důležitějšími biomarkery se stavají ty, odrážející odpověď těla na neoplazii. Mezi ně patří i neopterin, pteridinová sloučenina produkovaná makrofágy aktivovanými interferonem gamma. Je to důležitý parametr monitorování aktivity imunitního systému, který doprovází řadu onemocnění jako je nádorové bujení a pomáhá předvídat, nejen jaký bude průběh onemocnění a jakou má pacient šanci na přežití, ale může také včas odhalit relaps nádorového onemocnění. Mezi robustní biomarkery zánětlivé odpovědi patří poměr lymfocytů k ostatním buněčným složkám periferní krve (poměr neutrofilů:lymfocyty (NLR), lymfocyty:monocyty (LMR) či krevní destičky:lymfocyty (PLR)).

Do studie bylo zahrnuto 49 pacientů (32 mužů a 17 žen) s karcinodem rekta ve věku 67 ± 8 let ve stádiu IIA – IIIC. 28 pacientů bylo léčeno neodjuvantní (léčba prováděná před hlavní léčbou např. chirurgické odstranění) a 21 pacientů adjuvantní (následná léčba např. po chirurgickém zákroku) radioterapií. U pacientů byly sledovány parametry jako neopterin v séru a v moči, kreatinin v séru a množství periferních krevních buněk. Všichni pacienti zahrnutí do studie podepsali informovaný souhlas se studií, kterou schválila Etická komise FN Olomouc.

Ke statistickému zhodnocení naměřených dat byl použit software NCSS (Kaysville, USA). Hladina statistické významnosti byla zvolena na úrovni $p = 0,05$.

Kromě zvýšeného poměru lymfocyty:monocyty (LMR) nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v hodnotách měřených parametrů mezi neodjuvantní a adjuvantní

léčbou, jak je ukázáno v tab. 13, a ani nebyly zjištěny rozdíly v těchto parametrech mezi II a III stádiem nemoci. Sérová hladina neopterinu 3 $\mu\text{g/l}$ a více byla významným ukazatelem krátké doby přežití. Byl pozorován statisticky významný vztah mezi koncentrací neopterinu a věkem pacientů, koncentrací hemoglobinu, množstvím leukocytů a krevních destiček. V této studii bylo zjištěno, že prognostický význam u pacientů s karcinomem rekta má pouze koncentrace neopterinu v séru, nikoli v moči a navíc, pouze u pacientů léčených neoadjuvantní léčbou. Je možné, že u adjuvantní léčby může předchozí chirurgické odstranění nádoru mít vliv na zánětlivou reakci.

Studie byla publikována v časopise *Anticancer Research* v roce 2016, roč. 36, s. 287-292.

Tab.13: Biomarkery u pacientů léčených neoadjuvantní a adjuvantní léčbou

Parametr	Neoadjuvantní léčba	Adjuvantní léčba	Hladina významnosti
Neopterin-sérum ($\mu\text{g/l}$)	3,2 \pm 4,2	2,3 \pm 1,2	0,518
Poměr neopterin/kreatinin ($\mu\text{mol/mol}$ kreatininu)	170 \pm 237	120 \pm 59	0,739
Neopterin-moč ($\mu\text{mol/mol}$ kreatininu)	197 \pm 106	196 \pm 98	0,909
Věk (roky)	68 \pm 8	66 \pm 7	0,479
Hemoglobin (g/l)	129 \pm 21	119 \pm 14	0,055
Leukocyty ($10^9/\text{l}$)	8,4 \pm 3,5	7,1 \pm 2,3	0,132
Krevní destičky ($10^9/\text{l}$)	278 \pm 91	277 \pm 89	0,906
NLR	4,0 \pm 2,8	3,1 \pm 1,4	0,193
LMR	2,5 \pm 0,8	3,2 \pm 0,9	0,027
PLR	188 \pm 85	183 \pm 73	0,897

6. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ A PŘÍSPĚVKŮ

6.1. PUBLIKOVANÉ PRÁCE

1. Plíšek Jiří, Kujovská Krčmová Lenka, Aufartová Jana, Morales V. Tanausu, Esponda M. Sarah, Oros Roman, **Kasalová Eva**, Santana-Rodriguez J. Jose, Sobotka Luboš, Solich Petr, Solichová Dagmar
New approach for clinical monitoring of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry based on the Standard Reference Material 972
Journal of Separation Science, 2013, vol. 36, s. 3702-3708. (IF₂₀₁₆ = 2,557)
2. **Kasalová Eva**, Aufartová Jana, Kujovská Krčmová Lenka, Solichová Dagmar, Solich Petr
Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk – a Review
Food Chemistry, 2015, vol. 171, s. 177–190. (IF₂₀₁₆ = 4,529)
3. Solichová Dagmar, Bláha Milan, Aufartová Jana, Kujovská Krčmová Lenka, Plíšek Jiří, Honegrová Barbora, **Kasalová Eva**, Lánská Miriam, Urbánek Lubor, Sobotka Luboš
The effect of LDL-apheresis and rheohaemapheresis treatment on vitamin E
Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2015, vol. 61, s. 105-112. (IF₂₀₁₆ = 0,674)
4. Aufartová Jana, Bláha Milan, **Kasalová Eva**, Honegrová Barbora, Červinková Barbora, Kujovská Krčmová Lenka, Plíšek Jiří, Lánská Miriam, Sobotka Luboš, Solichová Dagmar
Blood levels of antioxidant agents during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis
Biomedical Papers, 2015, vol.159(3), s. 400-406. (IF₂₀₁₆ = 0,894)
5. Zezulova Michaela, Bartousková Marie, Hlidková Eva, Juranová Jarmila, Červinková Barbora, **Kasalová Eva**, Adam Tomáš, Krčmová Lenka Kujovská, Solichová Dagmar, Cwiertka Karel, Vrána David, Melichar Bohuslav
Prognostic Significance of Serum and Urinary Neopterin Concentrations in Patients with Rectal Carcinoma Treated with Chemoradiation
Anticancer research, 2016, vol 36, s. 287-292. (IF₂₀₁₆ = 1,937)

Web of Science 10. září 2017

IF souhrnný: 10,951

Počet citací bez autocitací: 16

6.2. PŘEDNÁŠKY A POSTERY PREZENTOVANÉ NA KONFERENCÍCH

6.2.1. PŘEDNÁŠKY

1. KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, BLÁHA Milan, BLÁHA Vladimír, KAŠPAROVÁ Markéta, PLÍŠEK Jiří, KUČEROVÁ Barbora, **HRŮŠOVÁ Eva**, SOLICH Petr
Hemopheretic extracorporeal techniques connected to modern analytical methods in clinical research
[12TH INTERNATIONAL NUTRITION & DIAGNOSTICS CONFERENCE](#), Praha, Česká Republika, 27.- 30.08.2012
2. KUČEROVÁ Barbora, PLÍŠEK Jiří, **HRŮŠOVÁ Eva**, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Stability of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk
[2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK](#), Hradec Králové, Česká Republika, 31.1. - 1. 2. 2012
3. **KASALOVÁ Eva**, PLÍŠEK Jiří, AUFARTOVÁ Jana, KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, SOBOTKA Luboš, SOLICH Petr
Determination of vitamin D in human breast milk
[3. Postgraduální a 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK](#), Hradec Králové, Česká Republika, 29.1. - 30. 1. 2013
4. AUFARTOVÁ Jana, PLÍŠEK Jiří, KRČMOVÁ Lenka, **KASALOVÁ Eva**, ČERVINKOVÁ Barbora, BLÁHA Milan, SOBOTKA Luboš, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Monitoring of 25-hydroxy vitamin D by UHPLC-ESI-MS/MS method in human serum
[3. Postgraduální a 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK](#), Hradec Králové, Česká Republika, 29.1. - 30. 1. 2013
5. **KASALOVÁ Eva**, HONEGROVÁ Barbora, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Effect of pasteurization and storage on α -tocopherol and retinol in human breast milk
[4. Postgraduální a 2. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK](#), Hradec Králové, Česká Republika, 28.1. - 29. 1. 2014
6. **KASALOVÁ Eva**, AUFARTOVÁ Jana, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, SOBOTKA Luboš, SOLICH Petr
Methods for analysis of vitamin D in milk
[5. Postgraduální a 3. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK](#), Hradec Králové, Česká Republika, 3.2. - 4. 2. 2015

6.2.2. POSTERY

1. KUČEROVÁ Barbora, **HRŮŠOVÁ Eva**, PLÍŠEK Jiří, KRČMOVÁ Lenka, STRAKOVÁ Hana, MĚŘIČKA Pavel, SOLICHOVÁ Dagmar
Stability of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk during its processing and storage in the Milk Bank
12TH INTERNATIONAL NUTRITION & DIAGNOSTICS CONFERENCE, Praha, Česká Republika, 27.- 30.8.2012
2. PLÍŠEK Jiří, KRČMOVÁ Lenka, OROS Roman, MORALES VEGA Tanasú, ESPONDA MONTESDEOCA Sarah, **KASALOVÁ Eva**, SOLICHOVÁ Dagmar, BLÁHA Milan, SOBOTKA Luboš
Utilization of UHPLC in connection with fast MS detector for monitoring of vitamin D in current clinical research
Česká konference hmotnostní spektrometrie, Hradec Králové, Česká Republika, 17. - 19.10.2012
3. PLÍŠEK Jiří, KRČMOVÁ Lenka, AUFARTOVÁ Jana, **KASALOVÁ Eva**, KUČEROVÁ Barbora, ČERVINKOVÁ Barbora, BLÁHA Milan, SOLICHOVÁ Dagmar, SOBOTKA Luboš
Determination of vitamin D by LC-MS/MS method in clinical research
18. Gerontologický kongres, Hradec Králové, Česká Republika, 6. – 7.12.2012
4. KRČMOVÁ Lenka, KUBIŠOVÁ Michaela, VÍŠEK Jakub, ČERVINKOVÁ Barbora, **KASALOVÁ Eva**, SOLICHOVÁ Dagmar, MELICHAR Bohuslav, SOLICH Petr, SOBOTKA Luboš
Determination of neopterin, kynurenin and tryptophan as immune systém activation markers in various biological fluids
XXIX. MEZINÁRODNÍ KONGRES SKVIMP, Hradec Králové, Česká Republika, 7. – 9.3.2013
5. AUFARTOVÁ Jana, PLÍŠEK Jiří, KRČMOVÁ Lenka, **KASALOVÁ Eva**, ČERVINKOVÁ Barbora, KUČEROVÁ Barbora, HEGEROVÁ Petra, DĚDKOVÁ Zuzana, SOLICHOVÁ Dagmar, SOBOTKA Luboš, SOLICH Petr
Importance of vitamin A, E and D monitoring in elderly
XXIX. MEZINÁRODNÍ KONGRES SKVIMP, Hradec Králové, Česká Republika, 7. – 9.3.2013
6. **KASALOVÁ Eva**, PLÍŠEK Jiří, AUFARTOVÁ Jana, KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Determination of 25-hydroxy Vitamin D in Human Breast Milk
39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, Nizozemí, 16. - 20.6.2013
7. SOLICHOVÁ Dagmar, KRČMOVÁ Lenka, PLÍŠEK Jiří, AUFARTOVÁ Jana, **KASALOVÁ Eva**, KUČEROVÁ Barbora, SOLICH Petr
Application of Modern Separation Tools in Clinical Research of Liposoluble Vitamins
9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Maďarsko, 4. - 6.9.2013 - ocenění v kategorii nejlepší poster
8. SOLICHOVÁ Dagmar, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, PLÍŠEK Jiří, AUFARTOVÁ Jana, **KASALOVÁ Eva**, ČERVINKOVÁ Barbora, HONEGROVÁ Barbora, SOLICH Petr, SOBOTKA Luboš
Modern Sample Preparation Tools for Clinical Research

16th edition of ExTech, the International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Chania, Řecko, 25. – 28.5. 2014

9. **KASALOVÁ Eva**, AUFARTOVÁ Jana, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Determination of vitamin D in human breast milk – methods
[9th Aegean Analytical Chemistry Days](#), Chios, Řecko, 29.9. – 3.10.2014
10. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, **KASALOVÁ Eva**, ČERVINKOVÁ Barbora, JAVORSKÁ Lenka, PLÍŠEK Jiří, SOBOTKA Luboš
Modern trends in determination of vitamins in Research Laboratory of 3rd Internal Gerontometabolic Clinic University Hospital Hradec Králové
[20. Gerontologický kongres](#), Hradec Králové, Česká Republika, 26. - 27. 11.2014
11. **KASALOVÁ Eva**, HONEGROVÁ Barbora, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
The effect of Holder pasteurisation and storage on fat soluble vitamins in human breast milk
[XXXI. Mezinárodní kongres SKVIMP](#), Hradec Králové, Česká Republika, 5. - 7.3.2015
12. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, PLÍŠEK Jiří, **KASALOVÁ Eva**, ČERVINKOVÁ Barbora, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Determination of vitamin D metabolites using UHPLC-MS/MS
[4. Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii](#), Hradec Králové, Česká Republika, 15. - 17.4.2015
13. **KASALOVÁ Eva**, AUFARTOVÁ Jana, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Analysis of vitamin D in human breast milk
[42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques](#), Ženeva, Švýcarsko, 21. - 25.6.2015
14. ČERVINKOVÁ Barbora, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, **KASALOVÁ Eva**, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Recent sample preparation techniques for clinical research and routine practise
[42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques](#), Ženeva, Švýcarsko, 21. - 25.6.2015
15. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, JAVORSKÁ Lenka, ČERVINKOVÁ Barbora, **KASALOVÁ Eva**, SOLICHOVÁ Dagmar, SOLICH Petr
Bioanalytical UHPLC-MS/MS methods development – key problems
[42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques](#), Ženeva, Švýcarsko, 21. - 25.6.2015
16. SOLICHOVÁ Dagmar, KUJOVSKÁ KRČMOVÁ Lenka, PLÍŠEK Jiří, AUFARTOVÁ Jana, **KASALOVÁ Eva**, HONEGROVÁ Barbora, SOLICH Petr
Modern Separation of Liposoluble Vitamins in Clinical Research
[9th International Conference on Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications](#), Kalamata, Řecko, 20. – 24.9.2015

6.3. ŘEŠENÉ GRANTY

1. **Řešitel grantu FRVŠ - 121/2013/G6:** Optimalizace extrakce na pevné fázi pro chromatografické stanovení vitaminů A a E v biologickém materiálu - jako úloha do praktického cvičení.
2. **Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NT13566-4/2012 (2012 – 2015):** Tkáňové trauma a pooperační stres u pacientek s chirurgicky léčenými časnými stádii karcinomu endometria.
3. **Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NT14265-3/2013 (2013 – 2015):** Využití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů pro klinickou praxi.

7. ZÁVĚR

Předložená práce se zabývá vývojem nových extrakčních a chromatografických metod pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek – především metabolitů vitamínu D - v různých biologických matricích, dále zahrnuje výsledky klinických sledování, které byly získány na základě využití nových i stávajících separačních metod pro stanovení liposolubilních vitamínů A a E.

V teoretické části předložené práce jsou popsány sledované vitaminy a biologický materiál zaměřený hlavně na mateřské mléko. Dále zde jsou popsány nejčastěji používané tradiční techniky úpravy vzorku biologického materiálu k analýze, velká pozornost je věnována moderním miniaturizovaným extrakčním technikám. Poslední část teoretické části je věnována chromatografii, novým trendům ve stacionárních fázích, popisu detekčních systémů v LC technice a spojení LC s hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část disertační práce je rozdělena do sedmi kapitol zabývajících se všemi oblastmi výzkumu během mého postgraduálního studia.

První okruh výzkumu se zabývá vitamínem D, přehledem a vývojem chromatografických a extrakčních metod pro jeho stanovení v biologickém materiálu jako je sérum a mateřské mléko a jejich využitím v klinickém výzkumu. První dvě kapitoly experimentální části popisují vývoj metody pro stanovení 25-hydroxyvitamínu D₃ a 25-hydroxyvitamínu D₂ pomocí systému UHPLC-MS/MS v séru a mateřském mléce za použití standardizovaného referenčního materiálu NIST SRM 972.

Další kapitoly se zabývají využitím vyvinutých metod v klinické praxi. Stabilitní studie vitamínů A a E v mateřském mléce, která byla řešena ve spolupráci s Mléčnou bankou Tkáňové ústředny FN HK dokázala, že pasterizace (62,5 °C po dobu 20 minut) a ani následné uskladnění (-27 °C) nemá negativní vliv na hladinu sledovaných analytů a tím je zajištěna správná výživa pro nedonošené a předčasně narozené děti hospitalizované na Dětské klinice Fakultní nemocnice HK, pro které je toto darované mateřské mléko určeno.

Další klinické studie se věnovaly změnám antioxidační kapacity při léčbě věkem podmíněné makulární degenerace a familiární hypercholesterolemie. Tyto studie vznikly ve spolupráci se IV. interní hematologickou klinikou. Na základě těchto studií bylo

prokázáno, že léčba těchto onemocnění pomocí rheohemaferézy a LDL-aferézy je bezpečná a nedochází při ní ke snížení antioxidační kapacity séra.

Posledním směrem klinického výzkumu bylo studium neopterinu, jeho významu v diagnostice a léčbě různých druhů rakoviny ve spolupráci s FN Olomouc. Vědecká publikace týkající se neopterinu je zaměřena na sledování hladin tohoto analytu v séru a moči pacientů trpících rakovinou konečníku a jeho prognostickým významem v léčbě této nemoci. Díky této studii byl prokázán prognostický význam neopterinu v séru u pacientů s rakovinou konečníku lečených předoperační chemoradiací.

Nově vyvinuté metody rozšířily spektrum metod Výzkumné laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky a jsou využívány při řešení výzkumných projektů nejen v rámci Fakultní nemocnice Hradec Králové. Výsledky byly úspěšně publikovány v renomovaných mezinárodních časopisech s impakt faktorem.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kono N., Arai H. (2015) Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic* 16, 19-34.
- [2] Combs G.F. (2008) *The Vitamins - Fundamental Aspect in Nutrition and Health*. Elsevier Academic Press, ISBN 13:978-0-12-183493-7.
- [3] D'Ambrosio D.N., Clugston R.D., Blaner W.S. (2011) Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients* 3, 63-103.
- [4] Webová stránka: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2015.00031/full>, listopad 2016
- [5] Webová stránka: <http://www.nexars.com/cs/vitamin-A.php>, listopad 2016
- [6] Webová stránka: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2015.00031/full>, listopad 2016
- [7] Webová stránka: <http://www.internimedica.cz/pdfs/int/2011/12/02.pdf>, listopad 2016
- [8] Nancy B.F., Lopez-Alarcon G.M., Cutberto G. (2002) Nutrient Adequacy of Exclusive Breastfeeding for the Term Infant During the First Six Months of Life. *World Health Organization*.
- [9] Kanis J.A. (1982) Vitamin-D metabolism and its clinical application. *Journal of Bone and Joint Surgery-British* 64, 542-560.
- [10] Webová stránka: <https://www.drhoffmann.cz/vitamin-d3-cholekalciferol-na-nosici-10g-id226.html>, listopad 2016
- [11] Holick F.M., Chen C.T. (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition* 87, 1080-1086.
- [12] Webová stránka: <http://www.topnews.in/health/urbanisation-cuts-people-adequate-sunlight-217896>, listopad 2016
- [13] Greer F.R., Hollis B.W., Napoli J.L. (1984) High concentration of vitamin-D2 in human milk associated with pharmacologic doses of vitamin-D2. *Journal of Pediatrics* 105, 61-64.
- [14] Webová stránka: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2011-0385>, listopad 2016
- [15] Webová stránka: <http://nationalacademies.org/hmd/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRI>, listopad 2016
- [16] Kasalová E., Aufartová J., Krčmová L.K., Solichová D., Solich P. (2015) Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk - A review. *Food Chemistry* 171, 177-190.
- [17] DeLuca H.F. (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 1689S-1696S.
- [18] Holick M.F. (2004) Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 362-371.

- [19] Hewison M., Zehnder D., Bland R. et al. (2000) 1 α -hydroxylase and the action of vitamin D. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 141–148.
- [20] Cantorna M.T. (2000) Vitamin D and autoimmunity: Is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223, 230–233.
- [21] Chan T.Y.K. (2000) Vitamin D deficiency and susceptibility to tuberculosis. *Calcified tissue international* 66, 476–478.
- [22] Lee J.E., Li H., Chan A.T. et al. (2011) Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: The physicians' health study and meta-analysis of prospective studies. *Cancer Prevention Research* 5, 735–743.
- [23] Webová stránka: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/fyziologie-patofyziologie-a-klinicky-vyznam-vitaminu-d-143209>, leden 2017
- [24] Deeb K.K., Trump D.L., Johnson C.S. (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 7, 684-700.
- [25] Webová stránka: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/47533/RemesovaP_Vitamin%20E_LK_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y, leden 2017
- [26] Červinková B., Kujovská K.L., Solichová D., Melichar B., Solich P. (2016) Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 2407-2424.
- [27] Mustacich D.J., Bruno R.S., Traber M.G. (2007) Vitamin E. *Vitamins and Hormones* 76, 1-21.
- [28] Bieri J.G., Evarts R.P. (1974) Gamma tocopherol:metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 27, 980-986.
- [29] Traber M.G., Stevens J.F. (2011) Vitamin C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 1000-1013.
- [30] Niki E. (2014) Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine* 66, 3-12.
- [31] Brigelius-Flohe R., Traber M.G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal* 13, 1145-1155.
- [32] Webová stránka: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065067.html> leden 2017
- [33] Traber M.G., Kayden H.J. (1989) Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma tocopherol in human lipoproteins. *American Journal of Clinical Nutrition* 49, 517-526.
- [34] Wagner K.H., Kamal-Eldin A., Elmadfa I. (2004) Gamma-tocopherol – an underestimated vitamin? *Annals of Nutrition and Metabolism* 48, 169-188.
- [35] Hosomi A., Arita M., Sato Y. et al. (1997) Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Letters* 409, 105-108.

- [36] Traber M.G., Atkinson J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 4-15.
- [37] Herrera E., Barbas C. (2001) Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry* 57, 43-56.
- [38] Berman K., Brodaty H. (2004) Tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs* 18, 807-825.
- [39] Lee I.M., Cook N.R., Gaziano J.M., Gordon D. et al. (2005) Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer – the women's health study: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 294, 56-65.
- [40] Taylor S.N., Wagner C.L., Hollis B.W. (2008) Vitamin D supplementation during lactation to support infant and mother. *Journal of the American College of Nutrition* 27, 690-701.
- [41] Ballard O., Morrow A.L. (2013) Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America* 60, 49-74.
- [42] Matos C., Ribeiro M., Guerra A. (2015) Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk. *Journal of Applied Biomedicine* 13, 169-180.
- [43] Webová stránka: <http://www.breastfeeding-problems.com/foremilk-hindmilk-imbalance.html>, leden 2017
- [44] Lonnerdal B. (2004) Human milk proteins - Key components for the biological activity of human milk. *Protecting Infants through Human Milk: Advancing the Scientific Evidence* 554, 11-25.
- [45] Saarela T., Kokkonen J., Koivisto M. (2005) Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatrica* 94, 1176-1181.
- [46] Kent J.C., Mitoulas L.R., Cregan M.D., Ramsay D.T., Doherty D.A., Hartmann P.E. (2006) Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics* 117, E387-E395.
- [47] Fruhauf, P., Nevoral J., Paulová M. (2003) Výživa novorozenců a kojenců: Současný pohled. Praha: SOLEN, s.r.o., ISBN 80-239-2011-1.
- [48] Webová stránka: <http://www.physiol.uzh.ch/Glycosylation/Humanmilkoligosaccharides.html>, leden 2017
- [49] Greer F.R. (2001) Do breastfed infants need supplemental vitamins? *Pediatric Clinics of North America* 48, 415-+.
- [50] Azizi F., Smyth P. (2009) Breastfeeding and maternal and infant iodine nutrition. *Clinical Endocrinology* 70, 803-809.
- [51] Fransson G.B., Lonnerdal B. (1983) Distribution of trace elements and minerals in human and cows milk. *Pediatric Research* 17, 912-915.
- [52] St-Onge M., Chaudhry S., Koren G. (2015) Donated breast milk stored in banks versus breast milk purchased online. *Canadian Family Physician* 61, 143-146.
- [53] Updegrave K. (2005) Human Milk Banking in the United States. *Newborn and Infant Nursing Reviews* 5, 27-33.

- [54] Abramovich M., James F.K., Zakir H. (2013) Polyunsaturated fatty acids, riboflavin and vitamin C: Effects of different storage conditions of human milk. *Vitamins and Minerals* 2:110.
- [55] Mydlilová A. (2006) Banky mateřského mléka v ČR. *Pediatric pro Praxi* 1, 56–57.
- [56] Schlemmerova L., Houska M., Spelina V., Strohalm J., Landfeld A., Smuharova H., Nemcova I., Kyhos K., Pruchova J., Novotna P., Mericka P. (2009) Baroinactivation of *Staphylococcus epidermidis* - Mathematical Model and its Verification Using Human and Cow Milks. *Czech Journal of Food Science* 27, 118-126.
- [57] Spelina V., Schlemmerova L., Landfeld A., Kyhos K., Mericka P., Houska M. (2007) Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*. *Czech Journal of Food Science* 25, 283-290.
- [58] Webová stránka: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Biochemick%C3%A1_anal%C3%BDza_krve, leden 2017
- [59] Webová stránka: <https://www.memorangapp.com/flashcards/108161/Blood,+Plasma+and+Serum+Components/>, leden 2017
- [60] Webová stránka: <http://slideplayer.cz/slide/5633161/>, leden 2017
- [61] Webová stránka: <http://www.vidia-diagnostika.cz/doc/215/>, leden 2017
- [62] Webová stránka: http://www.ceva-edu.cz/pluginfile.php/6836/mod_resource/content/1/130517Analaza_moci_CEVA_2013.pdf, leden 2017
- [63] Webová stránka: <http://www.urologieprostudenty.cz/uploads/pdf/vysetreni-moce-a-uretralnich-segmentu.pdf>, leden 2017
- [64] Webová stránka: <http://www.medplus.cz/zkumavka-nester-12ml-na-moc-uzaver>, leden 2017
- [65] Webová stránka: <http://www.dialab.cz/z1028-vacurette-9-5-ml-na-moc-konicka>, leden 2017
- [66] Webová stránka: <http://nabidky.edb.cz/Nabidka-6090-Kontejnery-na-zdravotnický-odpad>, leden 2017
- [67] Nováková L., Vlčková H. (2009) A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytical Chimici Acta* 656, 8-35.
- [68] Novakova L. (2013) Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A* 1292, 25-37.
- [69] Webová stránka: <http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf>, březen 2017
- [70] Webová stránka: https://www.researchgate.net/figure/284717110_fig1_Fig-1-Scheme-of-the-main-steps-in-a-clinical-metabolomics-study-The-pre-analytical, březen 2017

- [71] Kole P. L., Venkatesh G., Kotecha J., Sheshala R. (2011) Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography* 25, 199-217.
- [72] Wen J., Wu Y., Zhang L., Qi Y., Fan G., Wu Y., Li Z. (2008) High-throughput determination of fudosteine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, following protein precipitation in the 96-well plate format. *Journal of Chromatography B* 867, 153-159.
- [73] Webová stránka: <https://mab.blk.kit.edu/english/368.php>, březen 2017
- [74] Webová stránka: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVACO.htm>, březen 2017
- [75] Rickwood D., Ford T.C., Steensgaard J. (1994) *Centrifugation: essential data*, John Wiley & Son, ISBN 0471942715
- [76] Wilson K., Walker J. (2010) *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, Cambridge University Press, New York, ISBN 978-0-521-73167-6
- [77] Webová stránka: <http://clinfield.com/wp-content/uploads/2012/07/nomogram.gif>, květen 2017
- [78] Webová stránka: http://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/beckman-coulter-optima-max-xp-benchtop-ultracentrifuge_9262, květen 2017
- [79] Webová stránka: http://www.prf.jcu.cz/~vacha/Vyuka/Metody/pdf/5_hod_Centrifugace.pdf, květen 2017
- [80] Webová stránka: <https://www.slideshare.net/MisSsiDD/lecture-3-biochemical-technique-2>, květen 2017
- [81] Webová stránka: <http://slideplayer.com/slide/6819382/>, květen 2017
- [82] Webová stránka: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255tech/ecbxp5x4x4.jpg>, květen 2017
- [83] Webová stránka: <http://www.cella.cn/book/02/images/image023.jpg>, květen 2017
- [84] Webová stránka: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>, červen 2017
- [85] Nováková L., Douša M. a kol. (2013) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*, Europrint, Praha ISBN 978-80-260-4244-0
- [86] Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K. E. (2010) Electrical potential can drive liquid-liquid extraction for sample preparation in chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 27 934 – 941.
- [87] Bylda C., Thiele R., Kobold U., Volmer D. A. (2014) Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst* 139, 2265 – 2276.
- [88] Webová stránka: <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/analytics-and-sample-preparation/liquid-liquid-extraction/working-principle>, červen 2017

- [89] Asensio-Ramos M, Ravelo-Pérez L.M., González-Curbelo M.Á., Hernández-Borges J. (2011) Liquid Phase Microextraction Applications in Food Analysis. *Journal of Chromatography A* 1218, 7415-7437.
- [90] Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A. (2010) Liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1-14.
- [91] Abdulra'uf B.L, Sirhan A., Tan G.H. (2012) Recent developments and applications of liquid phase microextraction in fruits and vegetables analysis. *Journal of Separation Science* 35, 3540–3553.
- [92] Jeannot M.A., Cantwell F.F. (1996) Solvent microextraction into a single drop. *Analytical Chemistry* 68, 2236-2240.
- [93] Spietelun A., Marcinkowski L., de la Guardia M., Namiesnik J. (2014) Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta* 119, 34-45.
- [94] Padron M.E., Afonso-Olivares C., Sosa-Ferrera Z., et al., (2014) Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples. *Molecules* 19, 10320-10349.
- [95] Kokosa, J.M. (2015) Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry* 71, 194-204.
- [96] Webová stránka:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854708003431>, červen 2017
- [97] Ma M., Cantwell F.F. (1999) Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Preconcentration into a Single Microdrop. *Analytical Chemistry* 71, 388-393.
- [98] Liu W., Lee H.K. (2000) Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes. *Analytical Chemistry* 72, 4462-4467.
- [99] Xia L., Hu B., Juany Z., Wu Y., Liang Y. (2004) Single-drop microextraction combined with low-temperature electrothermal vaporization ICPMS for the determination of trace Be, Co, Pd, and Cd in biological samples. *Analytical Chemistry* 76, 2910-2915.
- [100] Liu H., Dasgupta P. K., (1996) Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. *Analytical Chemistry* 68, 1817-1821.
- [101] Sarafraz-Yazdi A., Amiri A., (2010) Liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1-14.
- [102] Webová stránka: <http://microextraction.blogspot.cz/2012/03/bell-shaped-extraction-new-liquid.html>, červen 2017
- [103] Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. (1999) Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 71, 2650-2656.
- [104] Ghambarian M., Yamini Y., Esrafil A. (2012) Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Microchimica Acta*, 177, 271-294.

- [105] Webová stránka: https://www.researchgate.net/publication/237046800_Developments_in_hollow_fiber_based_liquid-phase_microextraction_Principles_and_applications, červen 2017
- [106] Rezaee M., Assadi Y., Hosseinia M.R.M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S. (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* 1116, 1-9.
- [107] Rezaee M., Yamini Y., Faraji M. (2010) Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A* 1217, 2342-2357.
- [108] Kataoka H. (2010) Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 339-364.
- [109] Webová stránka: https://www.researchgate.net/publication/278310494_New_Sample_Preparation_Strategies_for_Analytical_Determinations, červen 2017
- [110] Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E. (2006) Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A* 1109, 183-190.
- [111] Lars E., Eng S. (2014) Parallel electromembrane extraction in the 96-well format. *Analytica Chimica Acta* 828, 46-52.
- [112] https://www.researchgate.net/figure/224036424_fig2_Fig-2-Schematic-illustration-of-the-equipment-for-electromembrane-extraction-EME
- [113] Edel A.L., Aliani M., Pierce G.N. J. (2013) Supported liquid extraction in the quantitation of plasma enterolignans using isotope dilution GC/MS with application to flaxseed consumption in healthy adults. *Journal of Chromatography B* 912, 24 – 32.
- [114] Rositano J., Harpas P., Kostakis C., Scott T. (2016) Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, methylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers. *Forensic Science International* 265, 125-130.
- [115] Majors R.E. (2012) Supported Liquid Extraction: The Best-Kept Secret in Sample Preparation. *LCGC Europe* 25, 430 – 435.
- [116] Webová stránka: <http://www.sopachem.com/analytical/portfolio/biotage-extrahera/>, červenec 2017
- [117] Webová stránka: http://www.genpore.com/spe_column_frits.htm, červenec 2017
- [118] Lucci P., Pacetti D., Frega G.N., Núñez O. (2012) Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, Dr. Leonardo Calderon (Ed.), InTech, ISBN 978-953-51-0813-9
- [119] Simpson N.J.K. (2000) *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications* CRC Press, New York, ISBN 9780824700218
- [120] Dipe de Faria H., de Carvalho Abrão L.C., Santos G.M., Barbora F.A., Figueiredo C.E. (2017) New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta* 959, 43-65.

- [121] Desilets C.P., Rounds M.A., Regnier F.E. (1991) Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 544, 25-39.
- [122] Sellergren B. (1994) Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. *Analytical Chemistry* 66, 1578-1582.
- [123] Anderson L.I. (2000) Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *Journal of Chromatography B* 745, 3-13.
- [124] Webová stránka: <http://www.iitk.ac.in/infocell/iitk/newhtml/storyoftheweek55.htm>, červenec 2017
- [125] Delaunay-Bertoncini N., Pichon V., Hennion M.C. (2000) Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. *Journal of Chromatography B* 745, 15-37.
- [126] Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- [127] Kataoka H., Saito K. (2011) Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54, 926-950.
- [128] Lord H.L., Zhang X., Musteata F.M., Vuckovic D., Pawliszyn J. (2011) In vivo solid-phase microextraction for monitoring intravenous concentrations of drugs and metabolites. *Nature Protocols* 6, 896-924.
- [129] Gorecki T., Yu X.M., Pawliszyn J. (1999) Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst* 124, 643-649.
- [130] Szultka M., Pomastowski P., Railean-Plugaru V., Buszewski B. (2014) Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. *Journal of Separation Science* 37, 3094-3105.
- [131] Pan J., Zhang C., Zhang Z., et al., (2014) Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 815, 1-15.
- [132] Abdel-Rehim M. (2010) Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A* 1217, 2569-2580.
- [133] Alves G., Rodrigues M., Fortuna A., Falcao A., Queiroz J. (2013) A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. *Bioanalysis* 5, 1409-1442.
- [134] Webová stránka: http://www.infochroma.ch/eng/prep/spe_meps.html, červenec 2017
- [135] Webová stránka: http://www.gbcpolska.pl/index.php?menu_nr=7&page=sge/meps/meps.inc, červenec 2017
- [136] Nováková L., Douša M. a kol. (2013) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, Europrint, Praha ISBN 978-80-260-4243-3
- [137] Nogueira J.M.F. (2015) TrAC Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *Trends in Analytical Chemistry* 71, 214-223
- [138] Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C. (1999) Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11, 737-747.

- [139] Nazyropoulou C., Samanidou V. (2015) Stir bar sorptive extraction applied to the analysis of biological fluids. *Bioanalysis* 7, 2241-2250.
- [140] Webová stránka: https://www.intechopen.com/source/html/44908/media/image6_w.jpg, červenec 2017
- [141] Namer A., Saito T. (2013) Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis. *Bioanalysis* 5, 915-932.
- [142] Webová stránka: http://www.richrom.com/en_GB/pages/show/id/56, červenec 2017
- [143] Švec F. (2009) Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické Listy* 103, 266-270.
- [144] Martin A.J., Synge R.L. (1941) A new form of chromatogram employing two liquid phases: I. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*, 35, 1358-1368.
- [145] Webová stránka: https://sk.wikipedia.org/wiki/Michail_Semionovi%C4%8D_Cvet, červenec 2017
- [146] Webová stránka: <http://anl.zshk.cz/vyuka/separacni-metody.aspx>, červenec 2017
- [147] Webová stránka: <http://www.hplc.cz/Teorie/>, červenec 2017
- [148] Cazes J. (2010) *Encyclopedia of chromatography*. 3rd ed. CRC Press: Boca Raton, ISBN 9781420084597
- [149] Nordborg A., Hilder E.F. (2009) Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 71-84.
- [150] Webová stránka: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, červenec 2017
- [151] Webová stránka: <http://docplayer.cz/2058765-Chromatografie-kralovna-analyz.html>, červenec 2017
- [152] Webová stránka: http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/Waters_HPLCSystem.gif, srpen 2017
- [153] Webová stránka: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20ruzny%20typy%20detekce%20pro%20analyzu%20biologicky%20vyznamnych%20latek.pdf, červenec 2017
- [154] Webová stránka: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202013%20teorie.pdf>, červenec 2017
- [155] Webová stránka: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016, červenec 2017
- [156] Sýkora D. (2007) MODERNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE PRO RP-HPLC. *Chemické Listy* 101, 190-199.
- [157] Kirkland J.J., DeStefano J.J. (2006) The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A* 1126, 50-57.
- [158] Webová stránka: http://www.waters.com/waters/en_CZ/HPLC-Column-Hardware-/nav.htm?cid=10049068&locale=en_CZ, červenec 2017

- [159] Hayes R., Ahmed A., Edge T., Zhang H. (2014) Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1357, 36 – 52.
- [160] Gritti F., Guiochon G. (2011) Diffusion models in chromatographic columns packed with fully and superficially porous particles. *Chemical Engineering Science* 66, 3773-3781.
- [161] Webová stránka: https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/HALO_core_web-300x256.jpg, červenec 2017
- [162] Webová stránka: https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/HALO_FusedCore_TechReport.pdf, červenec 2017
- [163] Cabrera K. (2004) Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science* 27, 843-852.
- [164] Švec F. (2004) Monolitické stacionární fáze pro HPLC. Místo narození: Praha. *Chemické Listy* 98, 232-238.
- [165] Vojta J., Musilová-Svobodová A., Franc M., et al. (2014) Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické listy* 108, 127–134.
- [166] Webová stránka: <https://www.chromservis.eu/c/more-about-chromatography?offset=130>, červenec 2017
- [167] Webová stránka: <http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/>, červenec 2017
- [168] Webová stránka: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/6%20HPLC%202012%20detektory.pdf>, červenec 2017
- [169] Webová stránka: <http://docplayer.cz/2775027-lontove-zdroje-i-iontovy-zdroj-data-vzorek-hmotnostni-analyzator-zdroj-vakua-ionizace-vlastnosti-iontovych-zdroju-iontova-optika.html>, červenec 2017
- [170] Webová stránka: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/JVAXJ.htm>, červenec 2017
- [171] Webová stránka: <http://austinpublishinggroup.com/chromatography/fulltext/chromatography-v2-id1032.php>, červenec 2017
- [172] Webová stránka: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf, červenec 2017
- [173] Dass Ch. (2007) *Fundamentals of contemporary mass spektrometry*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Persey ,ISBN 13: 9780471682295
- [174] Hao Ch., Zhao X., Yang P. (2007) GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry* 6, 569 – 580.

- [175] Baranowska I., Magiera S., Baranowski J. (2013) Clinical applications of fast liquid chromatography: A review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites. *Journal of Chromatography B* 927, 54-79.
- [176] Fekete S., Schappler J., Veuthey J.-L. et al. (2014) Current and future trends in UHPLC. *Trends in Analytical Chemistry* 63, 2-13.
- [177] Plíšek J., Kujovská Krčmová L., Aufartová J., Morales V. T., Esponda M. S., Oros R., Kasalová E., Santana-Rodriguez J. J., Sobotka L., Solich P., Solichová D. (2013) New approach for clinical monitoring of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry based on the Standard Reference Material 972. *Journal of Separation Science* 36, 3702-3708.
- [178] Kašparová M., Plíšek J., Solichová D., Krčmová L., Kučerová B., Hronek M., Solich P. (2012) Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk. *Talanta* 93, 147-152.
- [179] Kamao M., Tsugawa N., Suhara Y., Wada A., Mori T., Murata K., Nishino R., Ukita T., Uenishi K., Tanaka K., & Okano T. (2007) Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 859, 192-200.
- [180] Abernethy G. A. (2012) A rapid analytical method for cholecalciferol (vitamin D-3) in fortified infant formula, milk and milk powder using Diels-Alder derivatisation and liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 1433-1440.
- [181] Specker B. L., Tsang R. C., Hollis B. W. (1985) Effect of race and diet on human-milk vitamin-D and 25-hydroxyvitamin-D. *American Journal of Diseases of Children* 139, 1134-1137.
- [182] Higashi T., Shimada K., Toyo'oka T. (2010) Advances in determination of vitamin D related compounds in biological samples using liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878, 1654-1661.
- [183] Musteata M. L., Musteata F. M. (2011) Overview of extraction methods for analysis of vitamin D and its metabolites in biological samples. *Bioanalysis* 3, 1987-2002.
- [184] Luque-Garcia J. L., de Castro M. D. L. (2001) Extraction of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A* 935, 3-11.
- [185] Blanco D., Fernandez M. P., Gutierrez M. D. (2000) Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. *Analyst* 125, 427-431.
- [186] Gomis D. B., Fernandez M. P., Alvarez M. D. G. (2000) Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 891, 109-114.
- [187] Kaushik R., Sachdeva B., Arora S., Wadhwa B. K. (2014) Development of an analytical protocol for the estimation of vitamin D-2 in fortified toned milk. *Food Chemistry* 151, 225-230.

- [188] Trenerry V. C., Plozza T., Caridi D., Murphy S. (2011) The determination of vitamin D-3 in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry* 125, 1314-1319.
- [189] Kunz C., Niesen M., Vonlilienfeldtoal H., Burmeister W. (1984) Vitamin-D, 25-hydroxy-vitamin-D and 1,25-dihydroxy-vitamin-D in cows milk, infant formulas and breast-milk during different stages of lactation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 54, 141-148.
- [190] Delgado-Zamarreno M. M., Sanchezperez A., Gomezperez M. C., Hernandezmendez J. (1995) Directly coupled sample treatment high-performance liquid-chromatography for online automatic-determination of liposoluble vitamins in milk. *Journal of Chromatography A* 694, 399-406.
- [191] Barba F. J., Esteve M. J., Frigola A. (2011) Determination of vitamins E (alpha-, gamma- and delta-tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research and Technology* 232, 829-836.
- [192] Jakobsen J., Saxholt, E. (2009) Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 472-478.
- [193] Careri M., Lugari M. T., Mangia A., Manini P., Spagnoli S. (1995) Identification of vitamin-A, vitamin-D and vitamin-E by particle-beam liquid-chromatography mass-spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 351, 768-776.
- [194] Urbánek L., Krčmová L., Solichová D., Melichar B., Opletalová V., Solich P. (2006) Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects. *Journal of Separation Science* 29, 2485-2493.