

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Veronika Doležalová

CHEMILUMINISCENČNÍ STANOVENÍ VITAMÍNU B12 TECHNIKOU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY

Chemiluminescent determination of vitamin B12 using
sequential injection analysis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. srpna 2021.

Veronika Doležalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jakobovi Hraničkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu pomoci a rady během vypracovávání mé bakalářské práce.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá nalezením optimálních podmínek pro stanovení vitamínu B12 metodou techniky sekvenční injekční analýzy (SIA).

Základem stanovení je chemiluminiscenční reakce, při níž dochází k oxidaci luminolu peroxidem vodíku za katalýzy iontů kobaltu v bazickém prostředí.

Pomocí spektrofluorometrického detektoru byla proměřována intenzita chemiluminiscenčního záření a naměřené intenzity byly zaznamenávány.

Před samotným stanovením byly experimentálně nalezeny vhodné experimentální podmínky. Celkem byly optimalizovaný 4 parametry, a to hmotnostní procento peroxidu vodíku, poměr objemu mezi dávkovaným vzorkem kobaltnatých iontů a roztokem luminolu, průtoková rychlost vzorku a koncentrace luminolu.

Za optimalizovaných podmínek došlo k proměření několika roztoků o známé koncentraci kobaltnatých iontů, na základě čehož byla sestavena kalibrační závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na koncentraci iontů kobaltu. Pro toto stanovení byly určeny základní charakteristiky.

Pro stanovení samotného vitamínu B12 technikou SIA bylo vycházeno z faktu, že molekula tohoto vitamínu obsahuje právě jeden atom kobaltu, který byl za pomoci působení UV záření z molekuly uvolněn. V závěru práce byla porovnána koncentrace získaná měřením s deklarovanou koncentrací vzorku vitamínu B12 od výrobce.

Klíčová slova

Sekvenční injekční analýza

Chemiluminiscence

Luminol

Vitamín B12

Abstract

This bachelor thesis deals to find the optimal conditions for the determination of vitamin B12 by the Sequential Injection Analysis (SIA).

The basis of the determination is a chemiluminescence reaction in which luminol is oxidized by hydrogen peroxide under the catalysis of cobalt ions in a basic medium.

The intensity of the chemiluminescence radiation was measured using a spectrofluorometric detector and the measured intensities were recorded.

Suitable experimental conditions were found experimentally before the actual determination. A total of 4 parameters were optimized, namely, the mass percentage of hydrogen peroxide, the ratio between the dosed cobalt ion sample and the luminol solution, the sample flow rate and the luminol concentration.

Under optimized conditions, several solutions of known cobalt ion concentration were measured, from which a calibration dependence of chemiluminescence intensity on cobalt ion concentration could be established. For this determination, the basic characteristics were determined.

For the determination of vitamin B12 itself by the SIA technique, it was assumed that the vitamin molecule contains exactly one cobalt atom, which was released from the molecule by the action of UV radiation. At the end of the work, the concentration obtained by the measurement was compared with the declared concentration of the vitamin B12 sample from the manufacturer.

Keywords

Sequential injection analysis

Chemiluminescence

Luminol

Vitamin B12

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Cíle bakalářské práce	8
2	Teoretická část	9
2.1	Průtokové techniky	9
2.1.1	Sekvenční injekční analýza	11
2.2	Luminiscence	13
2.2.1	Chemiluminiscence	14
2.2.2	Princip chemiluminiscence luminolu	15
2.3	Vitamíny	17
2.3.1	Vitamíny B	17
2.3.2	Vitamín B12	18
3	Experimentální část	20
3.1	Použité přístroje a vybavení	20
3.2	Použité chemikálie	20
3.3	Příprava používaných roztoků	21
3.4	Experimentální uspořádání aparatury SIA	21
3.5	Statistické zpracování výsledků	23
4	Výsledková část a diskuze	25
4.1	Optimalizace parametrů	25
4.1.1	Hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku	25
4.1.2	Poměr mezi dávkovaným vzorkem kobaltnatých iontů a roztokem luminolu	26
4.1.3	Průtoková rychlost vzorku	27
4.1.4	Koncentrace luminolu	28
4.2	Souhrn optimalizovaných parametrů	28
4.3	Kalibrační závislost pro stanovení kobaltnatých iontů v roztoku	29
4.4	Základní charakteristiky stanovení	30
4.5	Stanovení vitamínu B12 v analyzovaném vzorku	30
5	Závěr	32
6	Použitá literatura	33

Seznam používaných zkratk

$c(\text{Co}^{2+})$	koncentrace roztoku kobaltnatých iontů [mg/l]
$c(\text{lum})$	koncentrace roztoku luminolu [mmol/l]
CL	chemiluminiscence
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
I_{ch}	intenzita chemiluminiscenčního záření
LOD	mez detekce (Limit of Detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)
SFA	segmentová průtoková analýza (Segmented Flow Analysis)
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
THF	tetrahydrofolát
UV	ultrafialové záření (Ultraviolet)
$V(\text{Co}^{2+})$	dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů [μl]
$V(\text{lum})$	dávkovaný objem roztoku luminolu [μl]
$w(\text{H}_2\text{O}_2)$	hmotnostní procento peroxidu vodíku [%]
\tilde{x}	medián
$v_p(\text{Co}^{2+})$	objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů [ml/min]
$v_p(\text{H}_2\text{O}_2)$	objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku [ml/min]

1 ÚVOD

1.1 Cíle bakalářské práce

V této bakalářské práci bylo cílem stanovení vitamínu B12 za pomoci využití sekvenční injekční analýzy (SIA) ve spojení se spektrofluorimetrickou detekcí měřením intenzity chemiluminiscenčního záření. V prvním kroku byly optimalizovány vhodné podmínky pro samotné měření a následně byla proměřena sada roztoků kobaltnatých iontů, která byla vhodná pro sestavení kalibrační přímky pro následné určení koncentrace vitamínu B12. Bylo vycházeno ze skutečnosti, že molekula B12 obsahuje právě jeden kobaltnatý ion, který byl za pomoci UV záření vyvázan a bylo tak možné ho stanovit pomocí výše zmíněné techniky SIA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Průtokové techniky

Průtokové metody byly ve svých počátcích, tedy v 50. letech 20. století, především zaměřeny na mechanizaci sběru elučních frakcí při chromatografických separacích a ke vzorkování monitorovaných procesů fyzikálně-chemických parametrů v průmyslové výrobě. Postupně byl tento cíl dále rozšiřován, přicházela tak jednoduchá a praktická automatizace, kdy byla zkoušena manipulace vzorku v kapalné formě, která procházela určitým průtokem za použití průtokového detektoru. Kromě mechanizace stanovení, která byla docílena díky použití průtokových analytických metod, byla oproti manuálnímu procesu zvýšena přesnost, propustnost analýzy, a naopak došlo ke snížení možnosti kontaminaci vzorku. Výsledek stanovení však nezávisel pouze na použité chemii, ale byl také odrazem všech dynamických procesů, které během procesu měření probíhaly. [1]

První praktickou aplikací průtokové techniky byla metoda segmentové průtokové analýzy (SFA – Segmented flow analysis). Vzorek nebo promývací roztok je nasáván ke sloučení s proudem vzduchu (popř. s proudem nemísitelného rozpouštědla), což vede ke vzniku segmentovaného proudu, který obsahuje několik samostatných zátek. Důsledkem segmentace proudu je minimalizováno rozšíření zón, v každé zátce dochází tak vylepšení promíchání a vnitřní stěny trubice jsou vyčištěny, uvnitř zátek v důsledku těchto jevů dochází k typickému proudění. Protože jsou zde přítomny dvě fáze, manipulace se vzorky je omezena kompresí, resp. expanzí, často jsou tyto jevy závislé na teplotě, což omezuje univerzálnost a propustnost vzorku. K odstranění vzduchové fáze dochází většinou před samotnou detekcí, v případě moderních přístrojů je tato fáze odstraněna elektronicky zařízením na vtokové bubliny. [1, 2]

Prvním komerčním přístrojem, který byl sestaven v roce 1957 a používal metodu SFA s fotometrickou detekcí se nazývá Technicon Autoanalyzer sloužící k analýze krevního séra. Přestože v průběhu 70. let došlo k zavedení metody průtokové injekční analýzy, SFA byla díky vysoké přesnosti a nízkému detekčnímu limitu i nadále používána. [3]

Analyzátoary využívající metody SFA hrály nemalou roli v chemické analýze, a i v současnosti jsou v odvětví průmyslu, klinických a enviromentálních laboratořích využívány, konkrétně pro analýzu vody, mořské vody, půdních extraktů, hnojiv, tabáku a nápojů. [1, 3]

V roce 1975 byla zavedena nová technika – průtoková injekční analýza (FIA – Flow injection analysis), u jejíhož zrodu stál tým analytiků z University of Washington pod vedením J. Růžičky a E. H. Hansena. Základní komponenty pro FIA jsou srovnatelné s SFA, jedná se o peristaltické čerpadlo, které slouží k pohonu vzorku a jednotlivých reagensů, několik plastových trubek, jejichž funkce je přenos kapaliny do detektoru. [4,5]

Na rozdíl však od SFA ve FIA není využíváno žádného druhu segmentace plynu, což této metodě poskytuje vlastnosti jako jednoduchost a robustnost. [1]

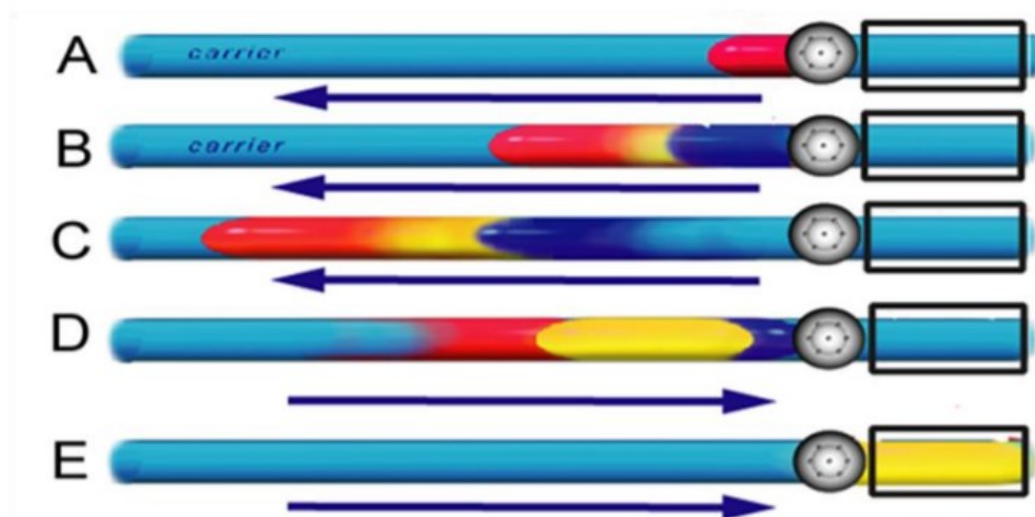
Dalším rozdílem mezi těmito dvěma metodami je, že SFA pracuje v režimu turbulentního proudění, ale FIA využívá proudění laminárního. Díky tomu je snížena pravděpodobnost přenosu mezi vzorky dávkovaných po sobě. [5]

Základní principem FIA je převedení analytu na detekovatelný produkt, čehož je dosaženo proběhnutím reakce s daným činidlem a výsledný produkt je poté kvantifikován příslušnou analytickou metodou. Vzorek je za pomoci dávkovacího kohoutu dávkován do kontinuálního nosného proudu, dochází k promísení s reakčním činidlem, vzniklý produkt je unášen jednotlivými zónami plynulého průtoku vícekanálovým systémem až k samotnému detektoru. [4]

Zásadními pozitivními vlastnostmi FIA oproti SFA jsou snížení objemů vzorků, tedy menší spotřeba reagensů, kratší doba odezvy a menší průměr trubek či hadiček, kterými kapalina proudí. FIA také nevyžaduje, aby bylo během reakce dosaženo chemické rovnováhy, žádoucí však je, aby rozsah reakce byl konstantní a reprodukovatelný. Velkou výhodou FIA je taky jednoduché a snadné sestavení aparatury, což vedlo k velkému rozšíření v chemických laboratořích. [5]

2.1.1 Sekvenční injekční analýza

Na počátku 90. let byla publikována a začala být také používána metoda sekvenční injekční analýzy (SIA). U jejího zrodu stál opět tým analytiků z University of Washington a za cíl si kladl odstranit nevýhody metody FIA. Metoda SIA má analytický princip stejný jako metoda FIA, tedy převedení analytu na produkt, který je možný detegovat po proběhnutí reakce s činidlem. Hlavní rozdílem těchto metod je směr toku, u SIA je možnost kromě přímého toku také tok zpětný, viz Obr. 2.1. Toho je dosaženo díky odděleným měřicím cyklům, kdy jsou za pomoci vícecestného ventilu a pístového čerpadla nadávkovány do systému vždy postupně jednotlivé reagensie, poté dojde k jejich promísení, tedy proběhnutí požadované chemické reakce na výsledný produkt, který je za pomoci detektoru detegován. [4, 6, 7]

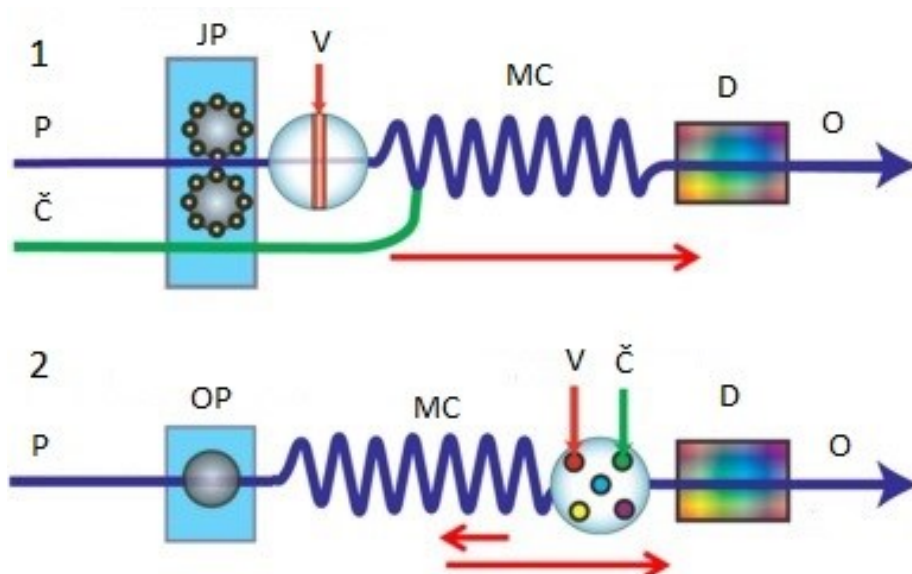


Obr. 2.1 Schéma principu SIA a jejího využití zpětného toku (převzato z [7])

I když u metody FIA došlo k poměrně velkému snížení množství reagensií, spotřeba je stále poměrně vysoká. U SIA je spotřeba reakčních činidel a množství odpadu podstatně nižší ve srovnání s FIA. Vzorky a reagensie potřebné pro proběhnutí reakce a detekci analytu jsou spotřebovávány v řádek mikrolitrů. [8]

SIA společně s FIA díky nízké spotřebě chemických reagensií a vzniklého odpadu splňují parametry tzv. Green analytical chemistry (GAC), v překladu Zelené analytické chemie. [9]

Mezi výhody SIA ve srovnání s FIA řadíme její univerzálnost, spolehlivost. [10] Dalšími klady metody jsou kromě již výše zmíněné nízké spotřeby činidel také robustnost, rychlost a flexibilita, díky změně parametrů pomocí počítače. [1, 4]



Obr. 2.2 Porovnání schémat pro techniku FIA (schéma 1) a techniky SIA (schéma 2), (převzato a upraveno z [6]);
P – nosný proud, *JP* – jednosměrná pumpa, *OP* – obousměrná pumpa, *MC* – mísící cívka, *V* – vzorek, *Č* – činidlo, *D* – detektor, *O* – odpad

Provoz aparatury SIA a samotná detekce mohou být plně automatizovány pomocí počítače, což snižuje možnost chyby lidského faktoru a výsledky jsou lépe reprodukovatelné. [10, 11]

Detektory jsou voleny podle typu proběhnuté reakce, nejvíce používanými jsou spektrometrické, fluorescenční či elektrochemické. [4]

Pomocí SIA je možné stanovit anorganické ionty i látky organické povahy. Technika SIA je využívána v oblastech chemie životního prostředí, klinické chemie, potravinářské chemie a chemie léčiv. [4, 12]

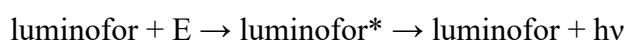
Konkrétně může být SIA použita pro stanovení iontů ve vodě (např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cl^- , F^- , NO_3^- , NO_2^- a další), a tak určit její kvalitu. Pro bioanalytickou aplikaci je často využívána SIA s imobilizací protilátek či antigenů. SIA je vhodná především pro rutinní analýzy, kde existuje velká sada vzorků. [4]

Technika SIA byla použita v této bakalářské práci pro stanovení vitamínu B12.

2.2 Luminiscence

Luminiscence byla blíže vysvětlena v počátcích 20. století, kdy docházelo k rozvoji kvantové mechaniky. Jev luminiscence, české označení také světélkování, je definován jako přebytek záření tělesa nad jeho tepelným zářením, pokud přebytek trvá déle než přibližně 10^{-10} s (po ukončení budícího účinku). Dochází tedy k uvolnění elektromagnetického záření, které je způsobeno předchozím dodáním energie – molekula, která byla uvedena do stavu s vyšší energií (excitovaný stav, který není stabilní) se přechodem do svého základního stavu o energii nižší dostane vyzářením světelného kvanta, čímž uvolní přebytek energie získané. [13–15]

Tuto výše uvedenou skutečnost lze popsat jednoduchým schématem:



kde luminofor je světélkující látka, E značí přijatou energii, (*) značí excitovaný stav, $h\nu$ značí uvolněnou energii ve formě záření (vychází z Planckova zákona pro popis energie fotonu). [13, 14]

Rozlišujeme několik druhů luminiscence podle typu budící energie, tedy na základě mechanismu, díky němuž se luminofor dostane do excitovaného stavu (viz Tab 2.1). [13, 15]

Tab. 2.1. Rozdělení druhů luminiscence (převzato z [13])

Druh luminiscence	Budící energie
Radioluminiscence	krátkovlnné elektromagnetické záření
Termoluminiscence	tepelná
Elektroluminiscence	elektrická
Katodová luminiscence	elektrony urychlené v elektrickém poli
Triboluminiscence	mechanická – tření, stlačování apod.
Chemiluminiscence	chemická reakční
Fotoluminiscence	světelné záření, popř. UV záření
Sonoluminiscence	ultrazvuk

Látky, které jsou schopny luminiscence, jsou nazývány luminofory. Obecně se dělí na organické a anorganické. Do skupiny organických luminoforů patří roztoky a krystaly, anorganické dělíme na skla a krystalofosfory. [14]

V případě organických luminoforů je původcem luminiscence molekula, neliší se tedy záření od látky pevné (krystal) od látky v kapalně formě, roztoku. Oproti tomu u anorganických látek pevných je podmínkou pro schopnost luminiscence seskupení několik atomů. [16]

2.2.1 Chemiluminiscence

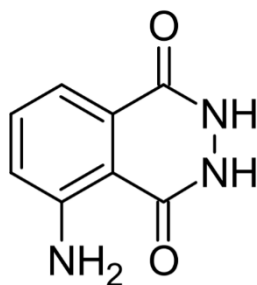
V případě chemiluminiscence (CL) je luminiscenční světlo získáno díky proběhnutí chemické reakce, tato reakce zahrnuje přesun elektronu z nižší energetické vrstvy do vrstvy vyšší, tedy do excitovaného stavu. Při rozpadu excitovaného stavu následně může dojít k emisi fotonů. Takto emitované světlo může být z ultrafialové, viditelné či infračervené oblasti. [17]

Využití CL jako analytické techniky má několik výhod – není potřeba žádný externí světelný zdroj, což způsobuje vysokou citlivost a za vhodných experimentálních podmínek je zde přímá úměrnost mezi intenzitou výstupního světla a koncentrací analytu ve zkoumaném vzorku. [18, 19]

Ve velké většině v případě CL jde o proběhnutí oxidační reakce. Nejznámější je reakce žlutého fosforu na vzduchu, která dala reakci jméno fosforescence. V praxi se pro indikaci proběhnuté reakce používá luminol (reakce s peroxidem vodíku), lucigenin a deriváty siloxenu. [14]

2.2.2 Princip chemiluminiscence luminolu

Luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) je žlutá krystalická práškovitá látka, která je rozpustná ve většině polárních organických rozpouštědlech. Jedná se o diprotickou kyselinu, která v kyselých roztocích protonizuje a v bazických dochází k její disociaci. Roztok luminolu není příliš tepelně stabilní, není vhodné ho vystavovat vysokým teplotám. [13, 20]

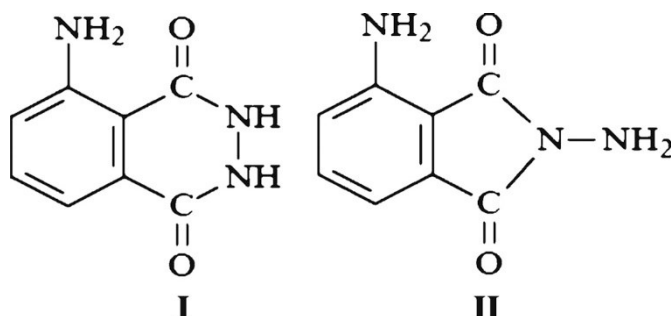


Obr. 2.3 Strukturní vzorec luminolu (převzato z [13])

Je jednou z nejpoužívanějších luminiscenčních látek díky své dostupnosti a nízkým nákladům. [19, 20]

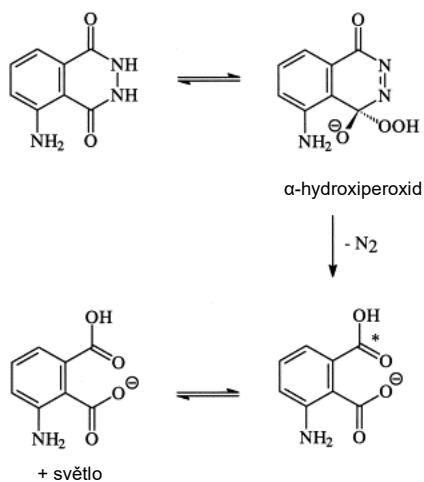
K emisi CL luminolu dochází v alkalickém prostředí za pomoci těchto oxidačních činidel: ozon, halogeny, singletový kyslík, persírany, chlornany, peroxid vodíku, manganistan, jodistan či hexakynoželezitan draselný, nebo je možné provést jeho elektrooxidaci na vhodné elektrodě. K CL dochází při vlnové délce 425 nm. Nejpoužívanějším oxidačním činidlem je peroxid vodíku [19, 20]

CL vlastnosti luminolu byly objeveny v roce 1928 německým chemikem H. O. Albrechtem. Luminol existuje ve 2 izomerech, které jsou vyobrazeny na Obr. 2.3, kdy izomer I je stabilnější, vykazuje CL a fluorescenční vlastnosti, oproti izomeru II, který jevy nevykazuje. [19]



Obr. 2.4 Chemické struktury izomerů luminolu (převzato z [19])

Mechanismus CL reakce luminolu je založen na jeho oxidaci za přítomnosti katalyzátoru (pokud je použito vodné rozpouštědlo) v alkalickém prostředí. Meziproduktem této reakce je α -hydroxiperoxid, jehož rozklad vede k excitovanému stavu a následně poté k vyzáření světla (tento proces je zcela unikátní a závisí na pH prostředí, ve kterém probíhá). [21]



Obr. 2.5 Zjednodušený reakční mechanismus CL luminolu (převzato a upraveno z [21])

CL vlastnosti luminolu jsou využívány pro analytickou analýzu v enviromentálním prostředí, u imunitestů, monitorování metabolických drah, ve farmaceutickém a biologickém průmyslu, v minulosti byl využíván při forenzních identifikacích. [13, 20]

2.3 Vitamíny

Vitamíny jsou přírodní bioaktivní látky, které jsou řazeny do skupiny hlavních živin pro lidský organismus. V těle fungují především jako katalyzátory chemických reakcí. Vitamíny jsou molekuly organické povahy a mohou být součástí kofaktorů (nepeptidová část enzymů, která je nezbytná pro katalýzu). Jsou důležité pro správné fungování organismu, účastní se metabolismu a regulaci buněk a klíčovou roli mají také pro správný vývoj a růst. Esenciální vitamíny je nutné přijímat jako součást potravy, protože tělo nemá tu možnost je syntetizovat, jsou však zásadní pro zachování základních životních funkcí. Jako provitamíny označujeme skupinu látek, které slouží k syntéze vitamínu v těle, dochází tak k jejich přeměně. Obecně vitamíny dělíme do 2 základních skupin, a to podle jejich rozpustnosti. První skupinou jsou vitamíny rozpustné v tucích, které se především váží na buněčné jaderné receptory a ovlivňují expresi genů, mají větší uhlovodíkovou strukturu a jejich vazby jsou ve většině nenasycené. Do této skupiny řadíme vitamíny A, D, E a K. Druhou skupinu tvoří vitamíny rozpustné ve vodě, tedy všechny vitamíny skupiny B a vitamin C. Ty jsou zodpovědné za enzymatickou aktivitu, protože jsou kofaktory příslušných enzymů, často jsou nabitými molekulami nebo obsahují funkční skupiny polární. [22–25]

2.3.1 Vitamíny B

Vitamíny B nemají jako celek podobné chemické struktury, jejich společnou vlastností je pouze rozpustnost ve vodě a funkce buněčných koenzymů v katabolických i anabolických reakcích. Do této skupiny řadíme 8 vitamínů: thiamin (B1), riboflamin (B2), niacin (B3), kyselina pantothenová (B5), vitamin B6, folát (B9) a vitamin B12. Mezi jejich společné účinky na organismus řadíme například udržování správné funkce nervového systému, výrobu energie v metabolických drahách, dále mají vliv na syntézu a opravy genetické informace, genomovou i negenomovou metylaci a v neposlední řadě i na syntézu signálních molekul. [26, 27]

Tato skupina vitamínů je syntetizována v organelách rostlin (chloroplasty, mitochondrie, cytosol) a jejich regulace je řízena podle měnících se potřeb rostliny, přičemž jejich funkce je zde srovnatelná s funkcí u živočišných organismů. I když jsou původci vitamínů rostliny, jsou často konzumovány z živočišné stravy, kde dochází k jejich počátečnímu přizpůsobení pro bioaktivní funkci. Vitamin B12 je oproti ostatním

vitamínům skupiny B syntetizován bakteriemi, jeho příjem je z živočišné stravy (u přežvýkavců dochází k další syntéze). [26]

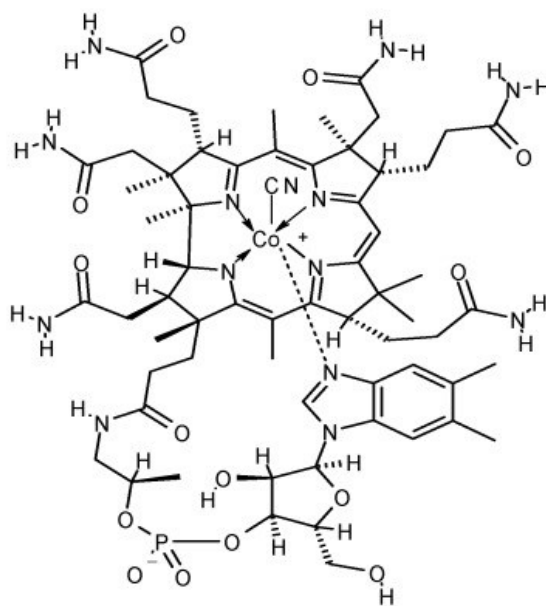
Byl také zkoumán vliv nedostatku vitamínů skupiny B v souvislosti na náchylnost a četnost zlomenin. Na základě těchto poznatků jsou vitamíny B řazeny k důležitým živinám spolu s vitamínem D a vápníkem pro správnou fyziologii kostí. [27]

Vliv na stav duševního zdraví mají z této skupiny především vitamíny B1, B3 a B12. [28]

2.3.2 Vitamín B12

Vitamín B12, kobalamin, je jeden z vitamínů rozpustných ve vodě. Pro lidské potřeby výživy je získáván z živočišných zdrojů potravy, a to především z červeného masa, mléčných výrobků, vajec a ryb. [29–31] Jako doporučený denní příjem je udávána hodnota 2,4 µg/den. [30, 32]

Základem struktury vitamínu je korinový makrocyklus s centrálně vázaným atomem kobaltu. [33]



Obr. 2.6 Struktura kobalaminu (vitamínu B12) (převzato a upraveno z [33])

Když je vitamín B12 (vytvořený B komplex spolu s vnitřním faktorem) absorbován do těla (k jeho absorpci dochází v terminálním ileu), účastní se několika metabolických drah, které jsou důležité pro neurologické i hematologické funkce. Vitamín B12 je kofaktorem enzymu – methion syntháza, který se účastní přeměny homocysteinu na methionin. Vedlejším produktem této přeměnné reakce je methyl-THF, který je přeměňován na THF, který je dále převáděn na meziprodukty účastnící se syntézy pyrimidinových bází DNA. V případě nedostatku vitamínu B12 dochází ke zpomalené syntéze DNA, která vede k megaloblastické anémii. Vitamín B12 se také jako kofaktor enzymu účastní přeměny methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA. V případě nedostatku kofaktoru dojde k hromadění kyseliny methylmalonové z důvodu nefunkční přeměny, což spolu se zvýšeným homocysteinem přispívá k neurologickým poruchám. [29] Tyto dráhy jsou důležité pro tvorbu červených krvinek, růst a správnou funkčnost nervového systému. [31]

Poprvé v roce 1948 byl vitamín B12 izolován ve své kyanoforně a je dodnes používán k léčení hypovitaminózy B12. [31]

Nedostatek vitamínu B12 je často zaznamenán u starších osob, kdy je problém s jeho absorpcí v gastrointestinálním traktu, nebo u přísných veganů, kteří jsou bez příjmu živočišné stravy. [31, 32]

Hypovitaminóza vitamínu B12 je také spojována s některými psychiatrickými poruchami: zhoršení paměti, podrážděnost, demence, deprese, velmi málo i výskyt psychóz. [34]

K rozkladu vitamínu B12 pro uvolnění iontu kobaltu z jeho struktury a následné stanovení je možné využít několik možných způsobů: acidifikace pomocí zředěné HCl [35], použití oxidačního činidla spolu s UV zářením [36], acidifikace pomocí HNO₃ a vypaření směsi ve vodní lázni [37] nebo mokrá rozklad pomocí koncentrovaných kyselin při atmosférickém tlaku za zvýšené teploty. [38]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a vybavení

- Spektrofluorimetr AMINCO-Bowman Series 2 (Thermo Electron Corp., USA)
- FIAlab - 3500 Sequential and Flow Injection Analyzer (FIAlab, USA)
- Analytické váhy 2004 MP (Sartorius, Česká republika)
- Laboratorní váhy EW600-2M (Gottl. KERN & Sohn GmbH, Německo)
- pH-metr AD1000 (Adwa, Maďarsko)
- MilliporeMili plus Q systém (USA)
- Tygonové hadičky o vnitřním průměru 1,42 mm (Ismatec, USA)
- Nízkotlaká rtuťová UV výbojka (délka 61 cm, výkon 20 W) vlastní výroby

3.2 Použité chemikálie

- Luminol (3-aminophthalhydrazide), čistota 97 % (Sigma-Aldrich, USA)
- H₂O₂, roztok 30 %, p. a. (Analytika, Česká republika)
- NaOH, perly č. (Lach-Ner Neratovice, Česká republika)
- Na₂CO₃, bezvodý, p. a. (Penta, Česká republika)
- NaHCO₃, pevný, p. a. (Penta, Česká republika)
- (NH₄)₂CO₃, pevný, p. a. (Lach-Ner Neratovice, Česká republika)
- CoSO₄·7H₂O, pevný, p. a. (Lachema Brno, Česká republika)
- Deionizovaná voda, která neměla odpor menší než 18,2Ω
- Vitamin B12 Léčiva 1000 μg (Zentiva a.s., ČR) - jeden ml injekčního roztoku obsahuje cyanocobalaminum 1000 mikrogramů
- Peroxodisíran draslený, p.a. (Lach-Ner Neratovice, Česká republika))

3.3 Příprava používaných roztoků

- Příprava 100 ml 16,9 mmol/l roztoku luminolu v uhličitanovém pufru o pH 9,0

V asi 60 ml deionizované vody bylo nejdříve rozpuštěno 0,4 g uhličitanu sodného a poté 0,3 g luminolu. Následně bylo přidáno 2,4 g hydrogenuhličitanu sodného a 5 g uhličitanu amonného. Tento roztok byl důkladně promíchán a doplněn po rysku deionizovanou vodou. Výsledné pH roztoku bylo 8,7 a bylo tedy upraveno za stálého míchání na magnetické míchače a neustálým přeměřováním pomocí pH metru na hodnotu 9,0 pomocí malých přídavek pevného hydroxidu sodného ve formě malých peciček. Během upravování hodnoty pH roztoku byl pozorován vliv rozpustnosti luminolu, při zvyšování hodnot pH došlo k účinnějšímu rozpuštění jeho krystalků tedy k jeho vyšší rozpustnosti.

- Příprava 100 ml 0,5% roztoku peroxidu vodíku

Za pomoci skleněné pipety bylo pipetováno 1,67 ml 30% peroxidu vodíku do 100ml odměrné baňky, roztok byl doplněn deionizovanou vodou po rysku a důkladně promíchán.

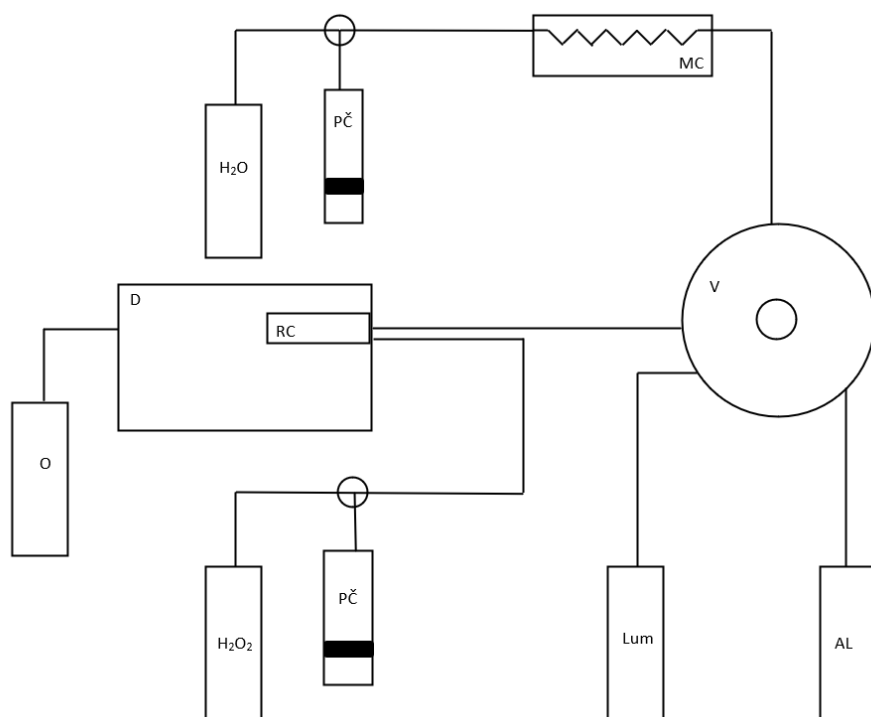
- Příprava 100 ml standardního roztoku kobaltnatých iontů o koncentraci 1000 mg/l

Navážka síranu kobaltnatého o hmotnosti 0,48 g byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky, roztok byl doplněn po rysku deionizovanou vodou a důkladně promíchán.

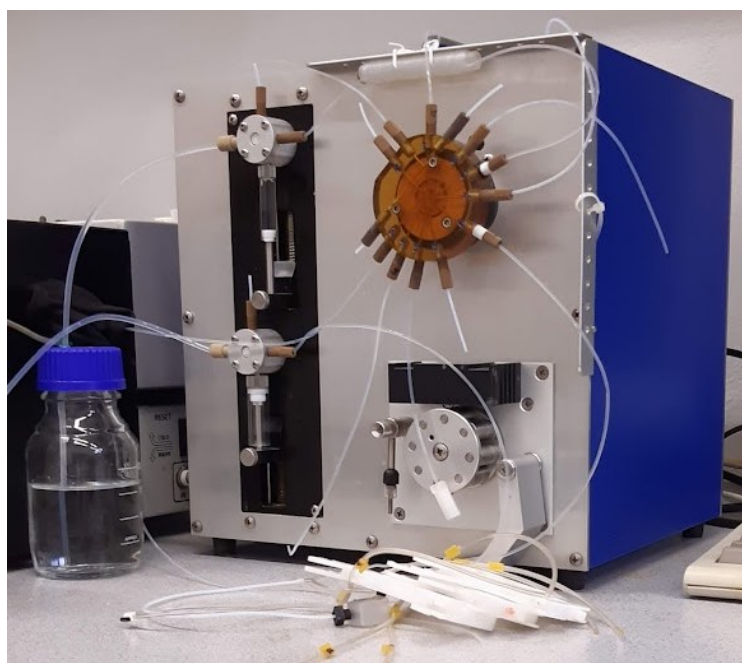
3.4 Experimentální uspořádání aparatury SIA

Pro všechna měření v této práci byla využita jediná aparatura. K jejímu ovládání byl používán software FIAlab2. Prostřednictvím naprogramovaných příkazů bylo do aparatury ze zásobních lahví pomocí 2 pístových čerpadel nasávána deionizovaná voda a peroxid vodíku, dále pak pomocí osmicestného dávkovacího ventilu nasáván roztok luminolu a kobaltnatých iontů v případě optimalizování podmínek, proměření kalibrační závislosti a v poslední řadě také roztok obsahující uvolněné ionty kobaltu z molekuly vitamínu B12. Stanovovaným analytem byl vždy tedy iont kobaltu, konkrétně jeho kvantita. Po nasátí požadovaných objemů byly jednotlivé roztoky smíchány v mísící cívce, v cívce reakční, která byla umístěna ve spektrofluorimetru docházelo k promísení s luminolem, což způsobilo výše popsanou reakci luminiscence. Intenzita luminiscenčního záření byla naměřena a vyhodnocena z výšky píků. Z detektoru samovolně odtékala odpadní směs.

Schéma použité aparatury je vyobrazeno a popsáno níže na obr. 3.1.



Obr. 3.1 Schéma aparatury SIA; H_2O – deionizovaná voda, H_2O_2 – roztok peroxidu vodíku o příslušné koncentraci, Lum – roztok luminolu, AL – analyt (vodný roztok iontů kobaltu), PČ – pístové čerpadlo, MC – míšící cívka, V – osmicestý dávkovací ventil, RC – reakční cívka, D – detektor (konkrétně spektrofluorimetr), O – odpad



Obr. 3.2 Fotografie použité aparatury SIA

3.5 Statistické zpracování výsledků

Všechna měření v této práci byla opakována pětkrát. Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány tak, že byl z daného souboru vždy vybrán medián, pomocí něhož a zjištěného rozpětí výsledků byla vypočítána směrodatná odchylka. Ta je uvedena v grafickém provedení ve formě kladných a záporných chybových úseček.

Medián

Medián je charakterizován jako střední hodnota ze série výsledků, které byly seřazeny podle velikosti (zpravidla používán pro menší počet výsledků). V případě lichého počtu výsledků je medián přímo střední hodnota, u sudého počtu je vypočítán jako aritmetický průměr dvou výsledků prostředních. [39]

Odhadnutá směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka

Odhad směrodatné odchylky (s) je charakterizován jako šířka intervalu, ve kterém se nacházejí výsledky opakovaného měření. [39]

Pro malý počet měření lze odhad směrodatné odchylky vypočítat podle vztahu:

$$s = k_n \cdot R$$

kde k_n je tabelovaný koeficient pro daný počet měření, R je rozpětí výsledků ($R = x_{\max} - x_{\min}$).

Relativní směrodatná odchylka (s_r) neboli variační koeficient je vyjádření směrodatné odchylky v procentech. [39] Pro její určení je vypočten podíl směrodatné odchylky a mediánu.

Opakovatelnost

Opakovatelností je vyjádřena těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření identického analytu, které byly provedeny totožnou metodou, totožným člověkem, na totožném zařízení, místě a za nezměněných podmínek v krátkém časovém období. Opakovatelnost určuje vlastnost metody, nikoliv výsledku. [40]

Citlivost

Citlivost příslušné metody určuje směrnice kalibrační přímky (schopnost rozlišit dvě koncentrace). Tato skutečnost platí pro lineární závislost. [40]

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) při dané analytické metodě je nejnižší možná koncentrace analytu ve zkoumaném vzorku, které je možné určit a odlišit jej od šumu, přičemž dojde k odezvě přístroje. Hodnotu LOD je možné vypočítat ze vztahu

$$LOD = \frac{3 \cdot s}{\alpha}$$

kde s je směrodatná odchylka šumu, α je směrnice kalibrační přímky. [40, 41]

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší detekovatelná koncentrace zkoumaného analytu, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. LOQ je možné vypočítat ze vztahu

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{\alpha}$$

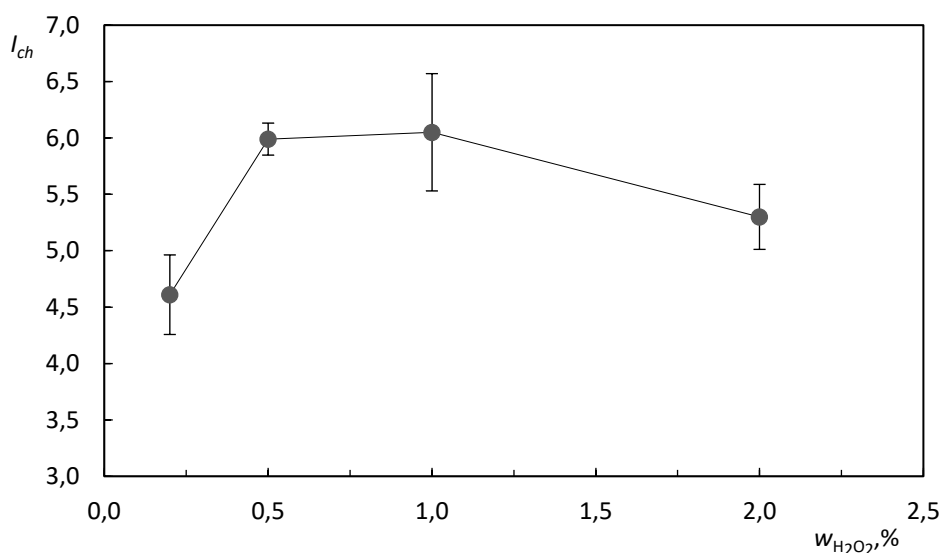
kde s je směrodatná odchylka šumu, α je směrnice kalibrační přímky. [40, 41]

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

4.1 Optimalizace parametrů

Před samotným měřením obsahu vitamínu B12 byly nejprve provedeny níže uvedené optimalizační experimenty tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti stanovení. Byly optimalizovány celkem čtyři různé parametry, a to hmotnostní procento peroxidu vodíku, poměr nasátých objemů vzorku roztoku standardního roztoku kobaltnatých iontů a luminolu, objemová průtoková rychlost vzorku a posledním optimalizovaným parametrem byla koncentrace luminolu. Při každé změně daného parametru bylo vždy provedeno pět měření a výsledky byly staticky zpracovány a znázorněny graficky. Pokud není uvedeno jinak, všechny experimenty probíhaly při pH = 9.

4.1.1 Hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku



Obr. 4.1 Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na hmotnostním procentu peroxidu vodíku;

Podmínky: $c(Co^{2+}) = 10 \text{ mg/l}$; $c(lum) = 16,9 \text{ mmol/l}$; $V(lum) = 300 \text{ } \mu\text{l}$;
 $V(Co^{2+}) = 300 \text{ } \mu\text{l}$; $v_p(Co^{2+}) = 4,6 \text{ ml/min}$; $v_p(H_2O_2) = 2,0 \text{ ml/min}$

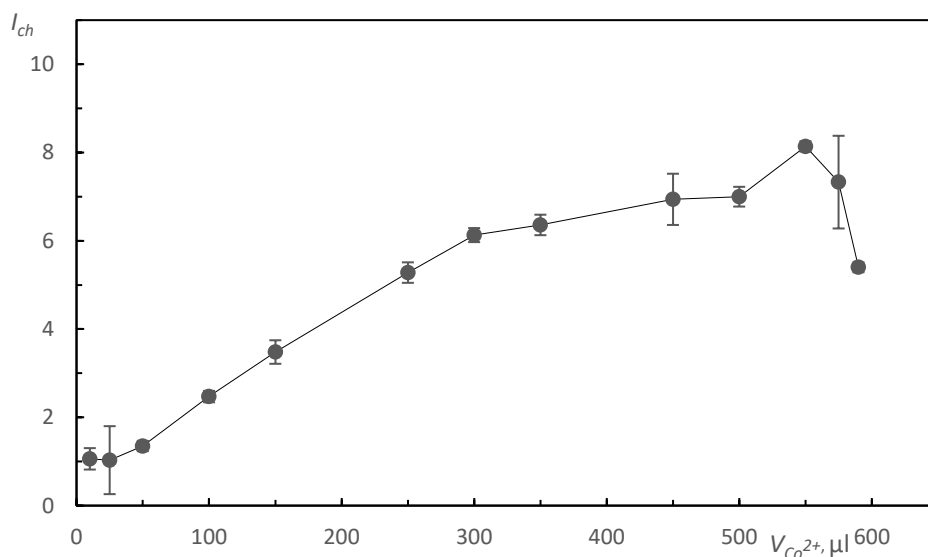
Pro tuto optimalizaci byly připraveny 4 roztoky peroxidu vodíku o koncentraci 0,20; 0,5; 1,0 a 2,0 %. Všechny ostatní parametry zůstaly beze změny. Naměřené intenzity chemiluminiscenčního záření na hmotnostním procentu byly zaznamenány graficky na Obr. 4.1.

Z uvedeného grafu (Obr 4.1) je patrné, že nejvyšší intenzity záření a největší stability signálu je dosaženo při koncentraci 0,50 % peroxidu vodíku, kdy pro toto hmotnostní procento byla směrodatná odchylka 2,37 %. Pro roztok 1,0 % peroxidu vodíku byl signál

sice nepatrně vyšší, ale směrodatná odchylka byla podstatně vyšší, a to 8,6 %. Pro následující měření byl tedy použit 0,50% roztok peroxidu vodíku.

4.1.2 Poměr mezi dávkovaným vzorkem kobaltnatých iontů a roztokem luminolu

Dalším zkoumaným parametrem byl poměr mezi objemy kobaltnatých iontů a roztokem luminolu. Poměr jednotlivých složek byl vždy takový, že celkový objem směsi činil 600 μl .



Obr. 4.2 Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na poměru dávkovaných objemů kobaltnatých iontů a luminolu

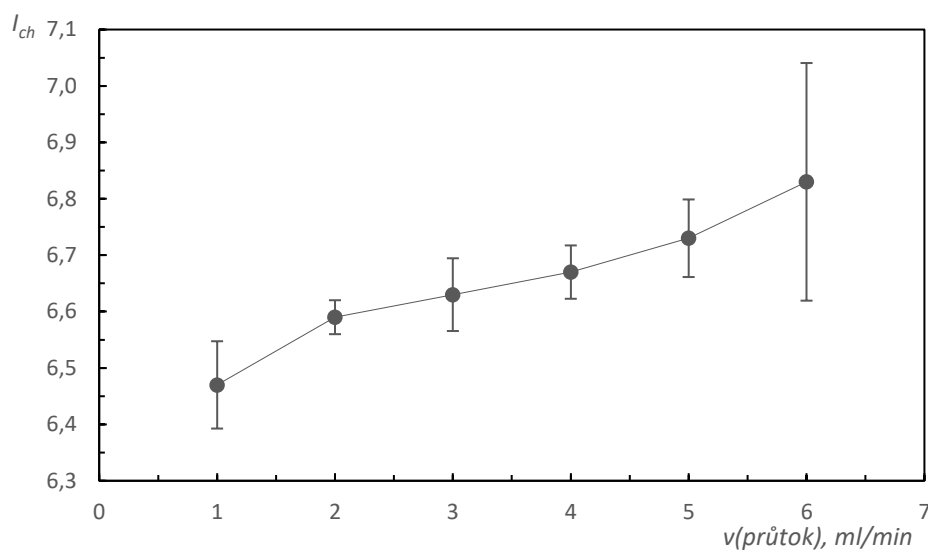
Podmínky: $c(\text{Co}^{2+}) = 10 \text{ mg/l}$; $c(\text{lum}) = 16,9 \text{ mmol/l}$; $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,5 \%$;

$V(\text{lum}) + V(\text{Co}^{2+}) = 600 \mu\text{L}$; $v_p(\text{Co}^{2+}) = 4,6 \text{ ml/min}$; $v_p(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,0 \text{ ml/min}$

Z výše uvedeného grafu (Obr. 4.2) vyplývá, že nejvyšší intenzita chemiluminiscenčního záření a zároveň nejmenší směrodatná odchylka je pro poměr objemů Co^{2+} : luminol 550:50 μl . Pro další měření byl tedy využíván tento poměr objemů.

4.1.3 Průtoková rychlost vzorku

Zkoumaným parametrem byla také průtoková rychlost vzorku, která byla měněna v rozmezí od 1,0 do 6,0 ml/min, ostatní parametry zůstaly nezměněny.

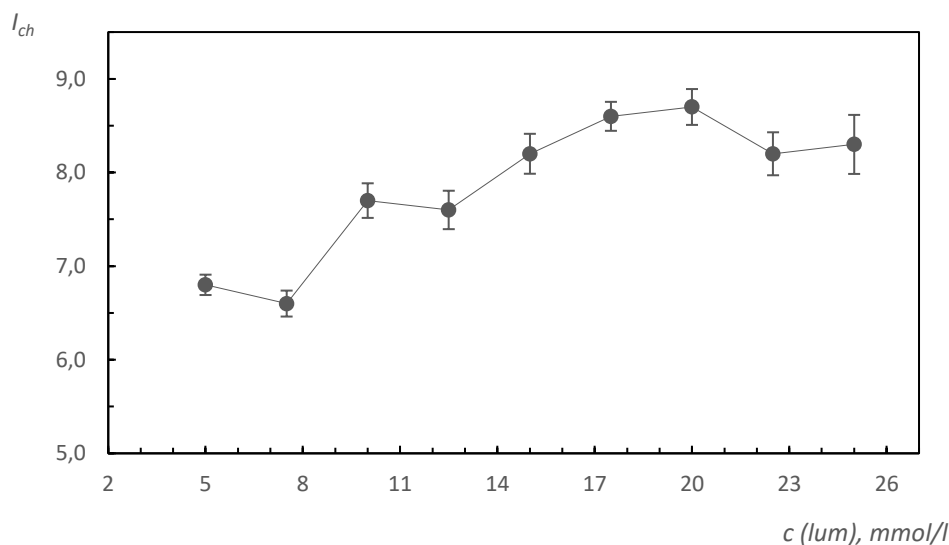


Obr. 4.3 Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na průtokové rychlosti vzorku
Podmínky: $c(\text{Co}^{2+}) = 10 \text{ mg/l}$; $c(\text{lum}) = 16,9 \text{ mmol/l}$; $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,5 \%$; $V(\text{lum}) = 50 \mu\text{l}$;
 $V(\text{Co}^{2+}) = 550 \mu\text{l}$; $v_p(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,0 \text{ ml/min}$

Z vyobrazeného grafu (Obr. 4.3) vyplývá, že nejvyšší intenzita chemiluminiscenčního záření byla naměřena pro objemovou průtokovou rychlost 6,0 ml/min, avšak u této hodnoty průtokové rychlosti je poměrně velká směrodatná odchylka. Proto byla pro následující měření jako nejvhodnější zvolena hodnota průtoku 5,0 ml/min, u které je znatelně menší odchylka.

4.1.4 Koncentrace luminolu

Posledním optimalizovaným parametrem byla koncentrace roztoku luminolu měřená v rozmezí od 5,0 do 25 mmol/l.



Obr. 4.4 Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na koncentraci luminolu
Podmínky: c (Co^{2+}) = 10 mg/l; w (H_2O_2) = 0,5 %; V (lum) = 50 μ l;
 V (Co^{2+}) = 550 μ l; v_p (H_2O_2) = 2,0 ml/min

Z uvedeného grafu (Obr. 4.4) je patrné, že nejvyšší intenzita chemiluminiscenčního záření byla naměřena pro koncentraci luminolu 20 mmol/l, avšak byla zde vyšší směrodatná odchylka než v případě koncentrace 17,5 mmol/l, proto byla pro měření vybrána tato koncentrace.

4.2 Souhrn optimalizovaných parametrů

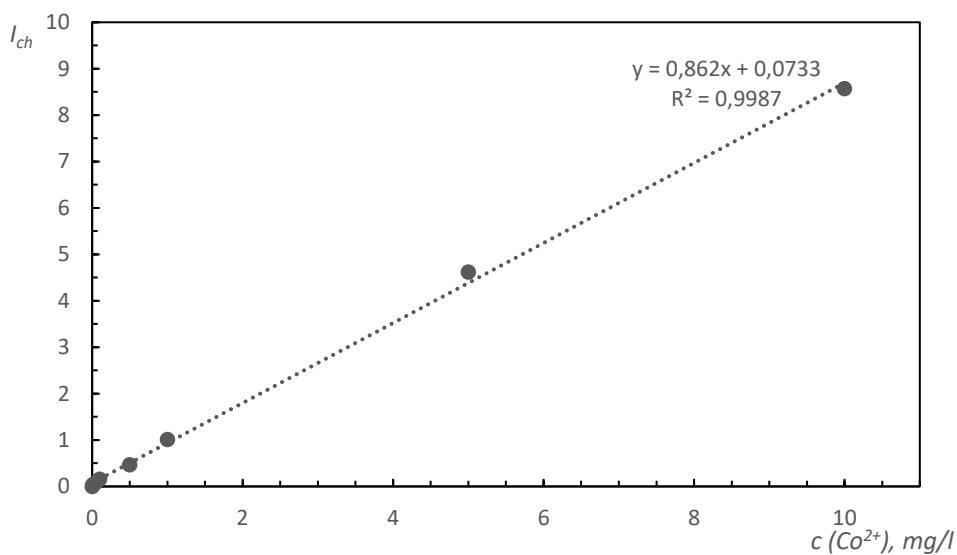
V Tab. 4.1 jsou shrnuty všechny optimalizované parametry, které jsou výše zmíněny a podrobněji rozebrány. Za těchto podmínek probíhaly všechny další měření pro získání maximální citlivosti stanovení.

Tab. 4.1 Souhrn jednotlivých optimalizací

Optimalizovaný parametr	Hodnota
Hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku	0,5 %
Poměr mezi dávkovaným vzorkem kobaltnatých iontů a roztokem luminolu	550 μ l : 50 μ l
Průtoková rychlost vzorku	5,0 ml/min
Koncentrace luminolu	17,5 mmol/l

4.3 Kalibrační závislost pro stanovení kobaltnatých iontů v roztoku

Pro kalibrační závislost bylo proměřeno celkem 9 roztoků iontů kobaltu, od nulové koncentrace po koncentraci 25 mg/l. Všechna měření probíhala za optimalizovaných podmínek, které jsou shrnuty v Tab. 4.1. Pro koncentraci 25 mg/l již intenzita chemiluminiscenčního záření nebyla naměřena, došlo k přesaturování. Z naměřených intenzit byla sestavena křivka.



Obr. 4.5 Kalibrační závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na koncentraci kobaltnatých iontů

Podmínky: $c(\text{lum}) = 17,5 \text{ mmol/l}$; $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,5 \%$; $V(\text{lum}) = 50 \mu\text{l}$; $V(\text{Co}^{2+}) = 550 \mu\text{l}$; $v_p(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,0 \text{ ml/min}$

4.4 Základní charakteristiky stanovení

Pro určení hodnot LOD a LOQ byl desetkrát proměřen roztok kobaltnatých iontů o koncentraci 0,010 mg/l. Z naměřených hodnot intenzit CL záření byla vypočtena směrodatná odchylka a podle vzorců v kapitole 3.5 byly vypočteny LOD a LOQ. Citlivost je dána směrnici kalibrační přímky viz Obr. 4.5. Pro opakovatelnost byl desetkrát proměřen roztok kobaltnatých iontů o koncentraci 1,0 mg/l. Z naměřených hodnot intenzit CL záření byla vypočtena směrodatná odchylka, průměr hodnot intenzit CL záření, z podílu směrodatné odchylky a průměru byla vypočtena relativní směrodatná odchylka, která byla vyjádřena v procentech.

Tab. 4. 2 Základní charakteristiky stanovení kobaltnatých iontů metodou SIA

Charakteristika	Hodnota
LOD	0,013 mg/l
LOQ	0,044 mg/l
Citlivost	0,862 l/mg
Opakovatelnost	3,9 %

4.5 Stanovení vitamínu B12 v analyzovaném vzorku

V následující části práce bylo provedeno stanovení vitamínu B12. Stanovení bylo založeno na rozkladu molekul kobalaminu a přímém stanovení koncentrace Co^{2+} iontů vyvázaných z molekuly vitamínu B12. Ze všech způsobů rozkladu uvedených v kap. 2.3.2 teoretické části práce bylo využito rozkladu prostřednictvím UV-záření v prostředí peroxidisíranu draselného. K 1,0 ml injekčního roztoku B12 bylo přidáno 10 ml 5,0 mmol/l roztoku peroxidisíranu draselného a roztok byl doplněn v 25ml odměrné baňce deionizovanou vodou. Tento roztok byl v odměrné baňce vystaven po dobu 60 s UV-záření generovaném nízkotlakou rtuťovou výbojkou. Po ukončení ozařování byl roztok promíchán a ihned proměřen. Porovnáním naměřených signálů, jejich přepočtu na koncentrace a po započtení příslušného ředění byly získány výsledky uvedené v Tab. 4.3. Ty byly porovnány s deklarovanou hodnotou koncentrace vitamínu B12 na etiketě výrobku.

Tab. 4.3 Výsledky stanovení vitamínu B12 a porovnání s deklarovanou hodnotou

Naměřená hodnota [mg/l]	Deklarovaná hodnota [mg/l]	Výtěžnost [%]
856 ± 39,4	1000	85,6 ± 3,94

Po přepočtu z hodnoty naměřených intenzit na obsah iontu kobaltu a samotného vitamínu B12 ve vzorku byla naměřená hodnota obsahu vitamínu B12 menší, než byl jeho deklarovaný obsah ve zkoumaném injekčním roztoku. Tato nepřesnost mohla být především způsobena nedostatečným rozkladem vitamínu B12 a tedy nedošlo k uvolnění všech iontů kobaltu. Výtěžnost je i přesto poměrně vysoká, a to přes 80 %, jak je uvedeno v Tab. 4.3.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracování metody stanovení vitamínu B12 založené na katalytických účincích kobaltnatých iontů při chemiluminiscenční reakci luminolu. Experimenty byly realizovány v uspořádání sekvenční injekční analýzy (SIA). Důležité tedy nejprve bylo nalezení vhodných experimentálních podmínek pro stanovení kobaltnatých iontů v režimu SIA. Celkem byly optimalizovány 4 parametry, které byly používány pro další měření. Konkrétně byl používán 0,5% roztok peroxidu vodíku, 17,5 mmol/l roztok luminolu, byl dodržován poměr mezi dávkovaným objemem kobaltnatých iontů a roztokem luminolu 550 μ l : 50 μ l a průtoková rychlost vzorku 5,0 ml/min. Za optimalizovaných podmínek byla proměřena kalibrační závislost pro stanovení iontů kobaltu v roztoku a byly určeny základní charakteristiky.

Pro stanovení vitamínu B12 byl vybrán léčivý přípravek firmy Zentiva, který obsahoval injekční roztoky, přičemž jeden mililitr tohoto injekčního roztoku obsahoval 1000 mikrogramů kyanokobalaminu. Roztok vitamínu byl vhodně naředěn, tak aby byl obsah kobaltu v rozsahu kalibrační závislosti. Z molekuly kobalaminu byl za pomoci UV-záření uvolněn atom kobaltu a rozložený vzorek byl ihned proměřen.

Z naměřených intenzit byla pomocí přepočtu stanovena koncentrace vitamínu B12 na $856 \pm 39,4$ mg/l. Výtěžnost tak činila kolem 85 %. Nižší výtěžnost je pravděpodobně způsobena nedokonalým uvolnění všech atomů kobaltu z molekul vitamínu B12.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. Estela, J. M.; Cerdà, V.: Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. *Talanta* 66: 2, 307–331 (2005).
2. Zagatto, E. A. G.; Oliveira, C. C.; Townshend, A.; Worsfold, P. J.: *Flow Analysis with Spectrophotometric and Luminometric Detection*, Amsterdam, Elsevier; 2012.
3. Coverly, S.: *Encyclopedia of Analytical Science*, 3rd ed., Oxford, Academic Press 2019.
4. Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: Sekvenční injekční analýza. *Chem. Listy* 93, 354–359 (1999).
5. Cerdà, V.; Ferrer, L.; Avivar, J.; Cerdà, A.: *Flow Analysis, A Practical Guide*, Boston, Elsevier 2014.
6. Ruzicka, J.: From continuous flow analysis to programmable Flow Injection techniques. A history and tutorial of emerging methodologies. *Talanta* 158, 299–305 (2016).
7. FIAlab: *Sequential Injection Analysis*, Dostupné z URL: http://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf (citováno 10. 8. 2021).
8. Takahashi, Y.; Masadome, T.: Determination of Lactate by Sequential Injection Analysis Using a Fluoride Ion-selective Electrode Detector. *Electrochemistry* 88: 6, 522–524 (2020).
9. Dimitriadou, A.; Anthemidis, A.: Automatic On-Line Purge-and-Trap Sequential Injection Analysis for Trace Ammonium Determination in Untreated Estuarine and Seawater Samples. *Molecules* 25:7, 1569 (2020).
10. Wibowotomo, B.; Eun, J-B.; Rhee, J. I.: Development of a Sequential Injection Analysis System for the Determination of Saccharin. *Sensors* 17:12, 2891 (2017).
11. Miyamoto, A.; Nakamura, K.; Ohba, Y.; Kishikawa, N.; Nakashima, K.; Kuroda N.: Sequential Injection Analysis with Chemiluminescence Detection for the Antioxidative Activity against Singlet Oxygen. *Anal Sci.* 221, 73–76 (2006).
12. Masadome, T.; Arai, H.: Sequential Injection Analysis of Anionic Surfactants Using On-line Preconcentration Technique and a Microfluidic Polymer Chip with an Embedded Ion-Selective Electrode as a Detector. *Electrochemistry* 86:3, 122–127 (2018).
13. Šimsa, D.; Skopal, J.: Chemická luminescence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chem. Listy* 102, 1017–1019 (2008).
14. Pátek, K.: *Luminiscence (fyzikální poznatky a technické aplikace)*, Praha, Státní nakladatelství technické literatury 1962.

15. Krist, J.; Géla, F.; Fronček, F.; Kubala, M.: Luminiscence v běžném životě i v laboratoři. *Chem. Listy* 102, 1012–1016 (2008).
16. Pelant, I.; Valenta, J.: *Luminiscenční spektroskopie – I. Objemové krystalické polovodiče*, Praha, Academia 2006.
17. Liu, M.; Wang, Z-Y.; Zhang, C-Y.: Recent Advance in Chemiluminescence Assay and Its Biochemical Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44:2,1934–1941 (2016).
18. Yan, Y.; Shi, P.; Song, W.; Bi, S.: Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: In Vitro and In Vivo Perspectives. *Theranostics* 9:14, 4047–4065 (2019).
19. Christodouleas, D.; Fotakis, C.; Economou, A.; Papadopoulos, K.; Timotheou-Potamia, M.; Calokerinos, A.: Flow-Based Methods with Chemiluminescence Detection for Food and Environmental Analysis: A Review. *Analytical Letters*. 44:1–3, 176–215 (2011).
20. Khan, P.; Idrees, D.; Moxley, M. A.; Corbett, J. A ; Ahmad, F.; von Figura, G.; et al.: Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Appl Biochem Biotechnol* 173:2, 333–355 (2014).
21. Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R.: Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* 51:3, 415–439 (2000).
22. Zhang, Y.; Zhou, W.; Yan, J.; Liu, M.; Zhou, Y.; Shen, X.; et al.: A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010. *Molecules* 23:6, 1484 (2018).
23. Zhao, X.; Zhang, M.; Li, C.; Jiang, X.; Su, Y.; Zhang, Y.: Benefits of Vitamins in the Treatment of Parkinson’s Disease. *Oxid Med Cell Longev* (2019)
24. Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R.: *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*, 2. přepracované vydání, Praha, VŠCHT Praha 2018.
25. Schnellbaecher, A.; Binder, D.; Bellmaine, S.; Zimmer, A.: Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnol Bioeng* 116:6, 1537–1555, (2019).
26. Kennedy, D. O.: B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. *Nutrients* 8:2, 68 (2016).
27. Dai, Z.; Koh, W-P.: B-Vitamins and Bone Health—A Review of the Current Evidence. *Nutrients* 7:5, 3322–3346 (2015).
28. Morris, M. C.; Schneider, J. A.; Tangney, C. C.: Thoughts on B-vitamins and dementia. *J Alzheimers Dis* 9:4, 429–433 (2006).

29. Ankar, A.; Kumar, A.: *Vitamin B12 Deficiency*, StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2021.
30. Shipton, M. J.; Thachil, J.: Vitamin B12 deficiency – A 21st century perspective. *Clin Med (Lond)* 15:2, 145–150 (2015).
31. Vidal-Alaball, J.; Butler, C.; Cannings-John, R.; Goringe, A.; Hood, K.; McCaddon, A.; et al.: Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency. *Cochrane Database Syst Rev* 3 (2005).
32. Ryan-Harshman, M.; Aldoori, W.: Vitamin B12 and health. *Can Fam Physician* 54:4, 536–541 (2008).
33. Watanabe, F.; Yabuta, Y.; Bito, T.; Teng, F.: Vitamin B12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. *Nutrients* 6:5, 1861–1873 (2014).
34. Oh, R.C.; Brown, D. L.: Vitamin B12 Deficiency. *Am Fam Physician* 67:5, 979–986 (2003).
35. Murillo Pulgarín, J. A.; García Bermejo, L. F.; Sánchez García, M. N.: Flow injection chemiluminescence determination of vitamin B12 using on-line UV-persulfate photooxidation and charge coupled device detection. *Luminescence* 26:6, 536–542 (2011).
36. Lok, K. S.; binte Abdul Muttalib, S. Z.; Lee, P. P. F.; Kwok, Y. C.; Nguyen, N-T.: Rapid determination of vitamin B12 concentration with a chemiluminescence lab on a chip. *Lab on Chip* 13, 2353–61 (2012).
37. Han, L.; Zhang, Y.; Kang, J.; Tang, J.; Zhang, Y.: Determination Co^{2+} in vitamin B12 based on enhancement of 2-(4-substituted-phenyl)-4,5-di(2-furyl) imidazole and H_2O_2 chemiluminescence reaction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 82:1, 146–152 (2011).
38. Mader, P.; Čurdová E.: Metody rozkladu biologických materiálu pro stanovení stopových prvků. *Chem. Listy* 91:4, 227–236 (1997).
39. Opekar, F.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*, Praha, Carolinum 2003.
40. Barek, J.; Jánoš, P.; Koruna, P.; Meloun, M.; Plzák, Z.; Skácel, F.; Suchánek, M.; Tichý, J.; Vilímeč, J.; Vláčil, F.; Zima, T.: Metrologická terminologie v chemii. *Chem. Listy* 94:7, 439–444 (2000).
41. Armbruster, D. A.; Pry. T.: Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev.* 29:1, 49–52 (2008).