

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Medicinální chemie



Škardová Alice

STANOVENÍ VÁPNIKU, HOŘČÍKU A FOSFORU V KOSTECH
VYBRANÝCH ŽIVOČICHŮ

Determination of calcium, magnesium and phosphorus in selected types of
animal bones

Bakalářská práce

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

Praha 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze 1. května 2023

Podpis:

Poděkování

Poděkování bych ráda věnovala svému školiteli RNDr. Jakubovi Hraníčkoví, Ph.D, za odborné vedení, trpělivost a přátelský přístup, který mi v průběhu vypracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla slečně Pokorné za dodání vzorků a konzultaci nad danou problematikou. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu a trpělivost v období psaní bakalářské práce.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je věnována stanovení vybraných prvků (vápníku, hořčíku a fosforu) v kostech různých druhů živočichů a jejich vzájemného porovnání. Analyzované vzorky kostí byly vybrány za účelem porovnání výživových hodnot v souvislosti se stanovovanými prvky. Získané vzorky kostí byly nejprve mechanicky rozmělněny a naváženy do rozkladných patron. Pomocí vysokotlakého mikrovlnného rozkladu za přítomnosti kyseliny dusičné a chlorovodíkové byly vzorky převedeny do roztoku a následně vhodným způsobem naředěny. Analýza kapalných vzorků byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Výsledný obsah všech třech prvků byl vypočten na základně kalibračních závislostí a se započtením navážky vzorku a příslušného faktoru ředění. Všechny získané výsledky byly nad limitem detekce přístroje za daných podmínek. Tento limit byl pro vápník 0,38 mg/l, pro hořčík 0,037 mg/l a pro fosfor 0,078 mg/l. Základním přínosem této práce je ucelený přehled o obsahu prvků v kostech různých druhů živočichů.

Klíčová slova

Vápník, hořčík, fosfor, kosti, hmotnostní spektrometrie, mikrovlnný rozklad

Abstract

This research focuses on the elemental analysis of selected elements (calcium, magnesium, and phosphorus) within the bones of various animal species, aiming to make comparative nutritional assessments. The obtained bone samples were subjected to mechanical grinding and then quantitatively weighed into collapsible cartridges. Using high-pressure microwave decomposition with the incorporation of nitric and hydrochloric acid, the samples were transformed into solution form, which was then appropriately diluted. The analysis of the liquid samples was carried out using a mass spectrometer with inductively coupled plasma. The observed composition for each sample was calculated using the calibration curve, accounting for both sample mass and dilution factors. All results obtained exceeded the detection limit for calcium 0.38 mg/l, magnesium 0.037 mg/l, and phosphorus 0.078 mg/l. The main finding of this research is the complete understanding of the elemental makeup present within the bones of distinct animal species.

Key words

Calcium, Magnesium, Phosphorus, Bones, Mass Spectrometry, Microwave Digestion

OBSAH

1	Úvod.....	7
1.1	Cíle práce	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Kostní tkáň.....	8
2.1.1	Biochemické ukazatele kostní přestavby	8
2.1.2	Ukazatele novotvorby kosti.....	9
2.1.3	Ukazatele kostní resorpce.....	9
2.2	Kostní onemocnění.....	10
2.2.1	Osteoporóza.....	10
2.2.2	Osteomalacie a rachitis.....	11
2.2.3	Pagetova kostní choroba.....	11
2.3	Analýza prvků v kostních tkáních	11
2.4	Význam stanovovaných prvků v lidském organismu.....	15
2.5	Využití techniky prvkové analýzy.....	16
2.6	Využití hmotnostní spektrometrie v klinické praxi.....	17
3	Experimentální část	20
3.1	Přístroje a pomůcky.....	20
3.2	Použité chemikálie.....	20
3.3	Vzorky	20
3.4	Pracovní postup.....	21
3.4.1	Příprava vzorků	21
3.4.2	Analýza vzorků	24
3.5	Charakteristiky analytických metod	25
4	Výsledková část a diskuze.....	26
4.1	Provedení mikrovlnných tlakových rozkladů.....	26
4.2	Zjištění experimentálních podmínek	26
4.3	Analýza celkového zastoupení prvků v kostech	27
4.3.1	Stanovení a vyhodnocení obsahu hořčíku	27
4.3.2	Stanovení a vyhodnocení fosforu	29
4.3.3	Stanovení a vyhodnocení vápníku.....	31
4.4	Diskuze.....	35
5	Závěr	37
6	Literatura	38

Použité zkratky a symboly

ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
MALDI-TOF	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnost / náboji pro daný iont
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
T	teplota [°C]
°C	stupeň Celsia
K	stupeň Kelvina
t_1	doba pro dosažení teploty T
t_2	doba pro udržení teploty T
m	hmotnost [g]
p	tlak [bar]
P	výkon magnetronu [%]
mg/g	miligram na gram pevného vzorku
mg/l	miligram na litr kapalného vzorku
mg	miligram
ml	mililitr
ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ALP	alkalická fosfatáza
LOD	meze detekce
BEC	koncentrace ekvivalentního pozadí

1 Úvod

Hořčík, vápník a fosfor jsou jedny z nejdůležitějších prvků pro lidský organismus. Při nízkých koncentracích může docházet k různým onemocněním, počínaje astma, cukrovka, osteoporóza nebo dokonce až k selhání srdečního svalu. Je tedy nutné hlídat hladinu těchto prvků v těle. Velká část z celkového množství těchto prvků se nachází v kostech, kde je lze snadno detekovat. Jedna z možností, jak zjišťovat obsah vybraných prvků, je využití hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Tato metoda se využívá i v lékařství, při léčbě leukemie, diagnostice mnohočetného myelomu či studium antibiotické rezistence enterobakterií.

1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit koncentrace vybraných prvků (vápníku, hořčíku a fosforu) ve vzorcích kostí různých druhů živočichů a navzájem porovnat získané výsledky. Získaná data budou v budoucnu publikována v knize o nutriční výživě psů. Druhy kostí a druhy živočichů byly předem vybrané, aby naměřená data mohla být použita do zmíněné publikace. V rámci studijního programu medicínální chemie byl zvolen i druhotný cíl, a to sepsání důležitosti vybraných prvků v lidském organismu a použití hmotností spektrometrie v lékařství.

2 Teoretická část

2.1 Kostní tkáň

Kostra člověka tvoří oporový systém těla, na něj se upínají svaly, které spolu s kostrou tvoří pohyblivý aparát. Další funkcí kostní tkáně je ochrana měkkých orgánů před mechanickým poškozením. Lidská kostra se skládá z 207 kostí, kosti jsou zásobárnou vápníku, fosforu a hořčíku. Kost se skládá z kostního matrixu a minerálu, a to v poměru 1:2. Kostní matrix se skládá převážně z kolagenu prvního typu, minoritních složek což jsou nekolagenní bílkoviny, mezi ně patří osteokalcin, osteonektin a osteopontin. Minerální část je tvořena menšími krystalky hydroxyapatitu, nejedná se o čistou formu, ale o formu, jež je doplněna i dalšími složkami jako jsou uhličitany vápenatý, fluoridy vápenatý nebo fosforečnany hořečnatý. Metabolickou aktivitu kostí zajišťují osteoblasty, osteoklasty a osteocyty souhrnně kostní buňky. Osteoblasty produkují osteoid neboli kostní matrix, do něhož se následně ukládají minerály. Hlavní funkcí osteoklastů je kostní resorpce, osteocyty fungují jako doplňkové buňky, které za pomoci jemné regulace korigují kostní resorpci. V průběhu vývoje lidského organismu se v kostní tkáni odehrává stálá přestavba neboli remodelace, tento proces je založen na osteoklastické resorpci a následné osteoblastické kostní tvorbě. Při resorpci kostí se osteoklasty zapojují do rozpouštění minerálních složek a odbourávání kostního matrixu. Osteoblasty intracelulárně syntetizují prekursory složek kostního matrixu. Tyto procesy společně zajišťují obnovu kostní tkáně. Metabolismus kostí je svázán s metabolismem iontů, které se v kostech nachází především vápník a fosfor.¹

2.1.1 Biochemické ukazatele kostní přestavby

Určitá kostní onemocnění způsobují různé typy kostní přestavby, pro jejich identifikaci používáme biochemické ukazatele, které vypovídají o metabolickém stavu skeletu. Na základě koncentrace fosforu a vápníku v kostech se posuzuje míra přestavby kostní tkáně. Takovéto stanovení může být vhodné pro určení osteoresorpce a kostní novotvorby, pro sledování účinnosti léčby či rozlišení různých onemocnění skeletu. K prokázání těchto stavů je potřeba charakterizovat biochemické ukazatele. Jako biochemický ukazatele se využívají degradační produkty kostního matrixu, které se uvolňují při odbourávání kostí nebo se využívají proteiny kostního matrixu a kostní enzymy, které jsou syntetizované v osteoblastech či osteoklastech a jsou uvolňovány do cirkulace nebo do moči.¹

2.1.2 Ukazatele novotvorby kosti

Mezi biochemické ukazatele novotvorby kostí patří produkty osteblastů v séru, mezi které patří propeptidy prokolagenu typu I, osteokalcin a alkalická fosfatáza a také její kostní izoforma.¹

Propeptidy prokolagenu typu I

V osteoblastech dochází k syntéze kolagenu ve formě prokolagenu. Před tím, než je prokolagen zabudován do kostního matrixu se proteolyticky odštěpí oba konce. Na každou molekulu, která je vestavena do kolagenních fibril se uvolní dvě molekuly, první je C-terminální propeptid a druhá je N-terminální propeptid. V krvi člověka se nachází dvě formy N-terminálního propeptidu, první je inaktivní forma v podobě trimeru, kterou zachycují jádra a druhá forma je v podobě monomerů, jež je zachycena ledvinami.¹

Osteokalcin

Jedná se o nejhojnější nekolagenní polypeptid nacházející se v kostní tkáni. Můžeme ho také označovat jako BGP. Syntéza osteokalcinu probíhá v osteoblastech a malé procentuální zastoupení se ukládá do extracelulárního kostního matrixu. Stanovení osteokalcinu se dělá na ukázkou celkového kostního obratu, osteokalcin je stanovován při zdravotních problémech.²

Alkalická fosfatáza a její izoformy

ALP neboli alkalická fosfatáza je enzym, který katalyzuje hydrolýzu monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. Jedná se o enzym nacházející se ve všech buňkách v těle, kde se váže na membrány. Tvorba kostní ALP u zdravých dospělých jedinců je zaručena osteoblasty. Stanovení ALP a izoenzymů ALP se uplatňuje u onemocnění jater, žlučových cest a kostních onemocnění.³

2.1.3 Ukazatele kostní resorpce

Kostní resorpce je spojená s vyplavováním vápníku, fosforu, enzymů a degradačních produktů matrix do krve nebo do moči. Biochemickými ukazateli kostní resorpce patří pyridinolin a deoxypyridinolin, který se nachází v moči. Dále jako indikátor se využívá N-/C-telepeptidy kolagenu prvního typu, kostní izoenzymy kyselých fosfatázy a hydroxyprolin.¹

Pyridinolin a deoxypyridinolin

Obě tyto molekuly vznikají ve zralém kolagenu. Jedná se o tzv. příčné spojky, jsou tvořeny hydroxylysinovými zbytky, pyridinolin třemi a deoxypyridinolin dvěma. V momentě, kdy dochází k degradaci kolagenu, se obě tyto molekuly uvolňují do krevního řečiště a dále postupují do moči. V oběhu jsou přítomny ve formě koncových úseků kolagenu, případně volně vázané. Koncentrace těchto molekul je nezávislá na přítomnosti kolagenu v potravě, jež člověk přijímá. Jejich hodnoty se stanovují imunochemickými metodami či za pomoci HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie.^{1,4}

Kyselá fosfatáza a její kostní izoenzym

Kyselá fosfatáza hydrolyzuje estery fosforečnanů v kyselém prostředí. Je to látka, která se nachází v mnoha tkáních lidského organismu především v prostatě, kostech, játrech, slezině, nebo v krevních elementech. V oběhu rozlišujeme několik forem kyselé fosfatázy, mezi tyto formy patří kostní tartarát-rezistentní, prostatická, trombocytová, erytrocytová. Pro kostní tkáň je specifická pouze jedna, a to kostní tartarát-rezistentní. Osteoklasty obsahují velké množství této specifické formy enzymu, která je zapojena do běhu kostní resorpce. Na rozdíl od ostatních enzymů se však nevylučuje ledvinami, a tak je možné stanovit koncentraci této formy enzymu. Stanovuje se především u pacientů s poškozením ledvin.¹

Hydroxyprolin

Hydroxyprolin je ve velkém množství obsažen v kolagenu. Hydroxyprolin je uvolňován do oběhu a je vylučován močí při degradaci kolagenu. Určitou část, jež není vyloučená močí, metabolizují játra. Koncentrace hydroxyprolinu se v moči zvyšuje při kostní resorpci, takže je možné ho identifikovat. Hydroxyprolin je ovlivňován přítomností kolagenu v potravě, a tak jeho stanovení nemusí být vždy přesné, z toho důvodu se používají spíše jiné biochemické ukazatele.⁴

2.2 Kostní onemocnění

Kostní onemocnění může být způsobeno onemocněním organické složky kostní tkáně nebo postižením minerálních složek kosti či obojí.^{1,5}

2.2.1 Osteoporóza

Jedná se o systémové poškození kosterního skeletu. Hlavní charakteristikou je úbytek kostní hmoty, úbytek organické i anorganické složky. Dochází také k poruchám mikro architektury kostní tkáně a následkem toho se zvyšuje míra lámavosti kostí. Úbytek

jednotlivých složek je větší, než odpovídá úbytek hmoty při stárnutí daného jednice. Osteoporóza postihuje především ženy ve vyšším věku, vzniká z nepoměru mezi vystupňovanou kostní resorpcí a normální či sníženou novotvorbou kostí. Toto onemocnění postihuje právě starší ženy, protože po menopauze dochází k jevu, kdy osteoresorpce převládá nad novotvorbou kostí a v to souvislosti s vyhasínáním ovariálních funkcí. Diagnostikovat osteoporózu můžeme na základě měření hmoty pomocí zobrazovacích technik. Vyšetřuje se koncentrace vápníku a fosforu v kosech, kdy množství prvků stanovených v kostech může být stanovovat prognózu a stupeň onemocnění.^{1,5}

2.2.2 Osteomalacie a rachitis

Toto onemocnění je charakterizováno snížením minerálních komponent následkem porušení mineralizace v nově vytvořené kosti. V kostech se nacházejí osteoidy, které nekalcifikují nebo jen málo. U dětských pacientů se tomuto onemocnění říká lidově křivice. Mezi nejčastější příčiny osteomalacie patří nedostatek vitamínu D. Nedostatek vitamínu D může nastat v důsledku nedostatečného obsahu v potravě nebo při poruchách trávení či vstřebávání. Pro diagnostiku používáme koncentrace vybraných prvků v těle, nejvíce se využívají ionty fosforu a vápníku. Jejich nízká koncentrace v kostech může být dobrým indikátorem pro osteomalacii.^{1,6}

2.2.3 Pagetova kostní choroba

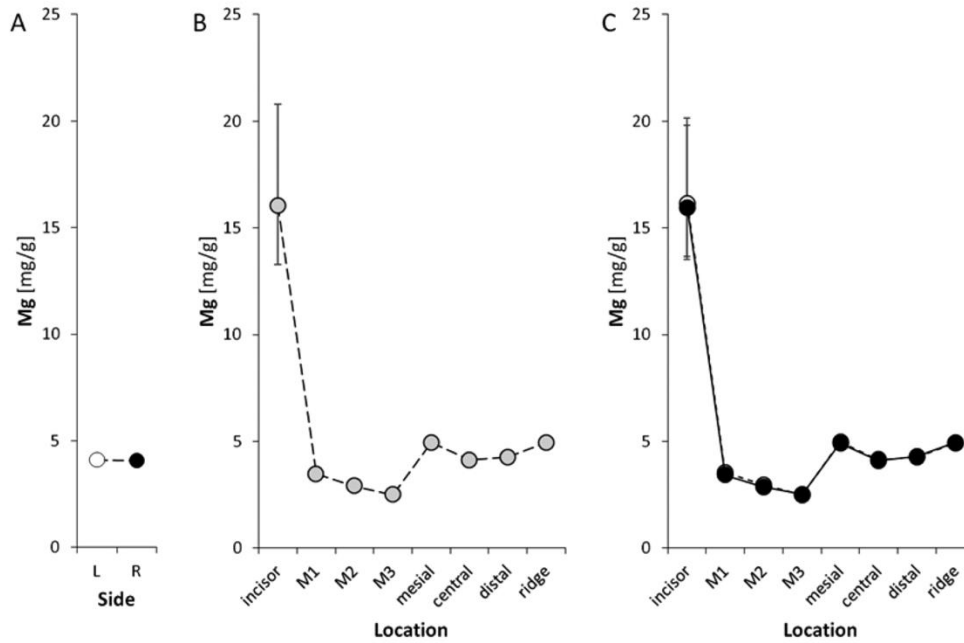
Pagetova kostní choroba postihuje jen určité části kostního skeletu a je způsobenou nekontrolovanou kostní resorpcí. Nekontrolovaná resorpce je doplněna nerovnoměrnou novotvorbou kostí. Jako indikátor pro diagnostiku se využívá alkalická fosfatáza a její kostní izoformy.^{1,7,8}

2.3 Analýza prvků v kostních tkáních

V průběhu let se analýzou prvků v kostních tkání zabývalo několik odborníků a vzniklo na toto téma několik světově uznávaných studií. Vzniklé práce mají široké spektrum zaměření přes studium nemocí a ovlivňování množství iontů v kostech po podání léčiv až po studie se zaměřením na nutriční výživu v průběhu let. V další kapitole jsou zmíněné některé z těchto studií.

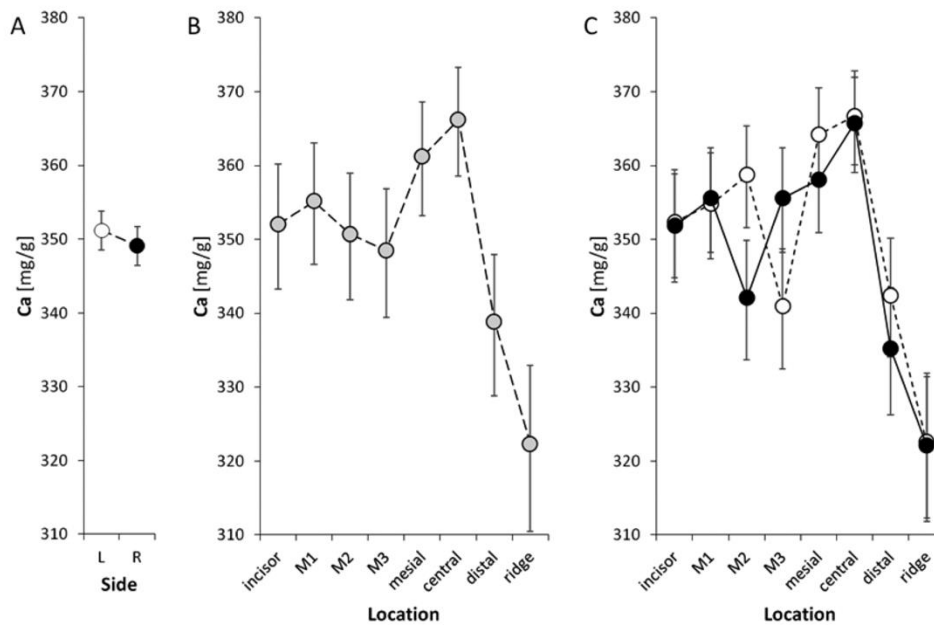
Víceprvková chemická analýza prvků v kosti dolní čelisti a zubů myši

Jedná se o studii, která proběhla na první lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Základním cílem této studie bylo porovnání koncentrací vybraných prvků v jednotlivých částech vzorku. Jako vzorkový materiál bylo použito šest laboratorních krys, zvířata byla zabita a z jejich čelistních kostí a zubů byla připravena sada vzorků na zkoumání. K vysušeným vzorkům kostí bylo přidáno 0,5 ml koncentrované HNO_3 a vzorky byly rozloženy při 100 °C. Po zchladnutí byly zředěny deionizovanou vodou a bylo provedena prvková analýza. Měření bylo prováděno za pomoci hmotnostního spektrometru. Celkově bylo analyzováno 41 prvků, z toho 14 se objevilo ve všech vzorcích. Byly zaznamenány rozdíly v koncentracích jednotlivých prvků podle umístění v kosti/zubů. Ve stoličkách se objevovala vyšší koncentrace Ba, Mn, Mo, Sr a Zn, zatímco v řezácích byly vyšší koncentrace K, Mg a Rb. Kosti dolní čelisti byly rozděleny na mesiální, centrální a distální část. Největší rozdíl mezi zuby a kostní částí byl statisticky určen pro prvky Fe, K, Mg, Mn a Na. Největší koncentrace v mesiální a centrální části kosti byly naměřeny pro prvky Ba, Ca, Mn a Sr. Pro distální část pak přibyl draslík. Zajímavostí je, že byly naměřeny i rozdílné hodnoty koncentrací K, Ca, Co, Na, Cu, Mo, Sr, Ba a Rb pro levou a pravou část dolní čelisti. Z této práce vyplývá, že koncentrace jednotlivých iontů v stoličce a řezáku je odlišná, důvodem je anatomický vzhled a funkce daného zubu. Pro dolní čelist rozdělenou na tři části se koncentrace iontů také mění, a to je v úzké souvislosti s polohou zubů. Níže jsou přiloženy dva grafy pro prvky Ca (Obr 2.1) a Mg (Obr 2.2).⁹



Obr. 2.1: Grafy znázorňující výsledky stanovení vápníku

Graf A je zaměřen na rozdíl mezi levou a pravou částí dolní čelisti. Graf B je znázornění koncentrací v jednotlivých částech. Graf C znázorňuje rozdílnost koncentrací v jednotlivých částech vzhledem k levé a pravé části.⁹



Obr. 2.2: Grafy znázorňující výsledky stanovní hořčíku

Graf A je zaměřen na rozdíl mezi levou a pravou částí dolní čelisti. Graf B je znázornění koncentrací v jednotlivých částech. Graf C znázorňuje rozdílnost koncentrací v jednotlivých částech vzhledem k levé a pravé části.⁹

Prvková analýza stehenní kosti pacientů s frakturou krčku stehenní kosti nebo osteoartrózou

Tato studie se zaměřila na prvkovou analýzu pacientů s frakturou krčku stehenní kosti či osteoartrózou. Stehenní hlavice byly odebrány od pacientů s kompletní náhradou. Celkový počet pacientů byl 41, z toho 21 pacientů s osteoartrózou a 20 pacientů s frakturou krčku stehenní kosti. Vzorky byly odebrány od osob staršího věku, mužů i žen, nakonec se však ukázalo, že pohlaví nehraje roli při vyhodnocování, a tak výsledky byly prezentovány bez tohoto parametru. Před samotným měřením byly kosti namočený do 10 ml koncentrovaného peroxidu vodíku na dobu 4 hodin, po vyndání byly suché kosti rozloženy rozkladným přístrojem ve směsi koncentrovaných kyselin. Pro měření byly použity dvě metody (ICP-MS a ICP-AES). Aby bylo měření možno porovnávat, byla udělána „kontrolní měření“ trabekulární kosti, se kterou se pak výsledná měření porovnávala. Při statistickém vyhodnocování byl proveden Mann-Whitney U test, jedná se o korekční statistický test, který je prováděn v momentě, kdy výsledky měření nejeví velké rozdíly. Výsledky této studie ukázaly, že není rozdíl mezi mužem a ženou a že v případě fraktury krčku stehenní kosti nejsou viditelné rozdíly v množství jednotlivých prvků s přibývajícím věkem jedince. Dále bylo zjištěno, že ani koncentrace vápníku se příliš nemění s přibývajícím věkem, ale zároveň menší koncentrace vápníku měli pacienti s věkem přes 80 let, což ale souvisí s přídatnými zdravotními problémy. Jako další závěr z této studie vyplynul, že osteoartróza má mnohem větší vliv na stavbu kostní tkáně, než fraktura stehenní kosti.¹⁰

Obsah chemických prvků v archeologických nálezích lidských kostí jako zdroj výzkumu výživy

Tato studie se zabývá analýzou prvků v archeologických nálezích kostí, aby mohla porovnávat hodnoty vybraných prvků v kostech z předešlé doby s těmi současnými. K výzkumu byly použity tři sady ostatků, první byla sada z 12. a 13. století z hřbitova v Padě, druhá sada pozůstatků byla z 14. až 18. století z vesnice Taaksi a poslední vzorkový materiál byl z 16. až 18. století z kostela sv. Jonáše v Parnu. Vzorky byly rozpuštěny ve směsi koncentrované HNO_3 a H_2O_2 a byly rozloženy rozkladným zařízením Microwave MW3000. Samotné měření bylo prováděno pomocí přístroje ICP-MS. Měření bylo provedeno v triplicátech a následně statisticky zpracováno. Detekční přístroj zachytil řadu prvků, ale jen některé z nich byly využity pro zpracování výsledků v této studii. Závěrem této studie je zjištění, že množství vápníku bylo přibližně stejné u všech tří sad ostatků, nejmenší množství bylo zjištěno u ženy z Taaksi, což mohl způsobit její zdravotní stav či genetická predispozice. Jako další poznatek z této studie vychází fakt, že všechny tři sady vzorků se vyžívali nutričně

podobně. Ve všech třech vzorcích se nacházelo vyšší množství Zn a Cu a to z důvodu častého požívání masa a mořských plodů, které jsou typické pro tuto oblast. ¹¹

2.4 Význam stanovovaných prvků v lidském organismu

Hořčík

Hořečnatý kationt je řazen mezi nejdůležitější intracelulární kationty v lidském organismu. Ovlivňuje aktivitu mnoha buněčných enzymů, podílí se na přenosu signálu na postsynaptické membráně. Velmi významnou roli hraje v integritě buňky či funkcí ve vztahu k nositelce dědičné informace DNA. Jeho nedostatek se může projevovat svalovými křečemi, zvýšenou aktivitou srdce, nespavostí nervózním třesem. Dlouhodobý nedostatek hořčíku vede k onemocněním jako je astma, cukrovka či osteoporóza. Zvýšenou potřebu hořčíku v organismu je potřeba při vysoké konzumaci živočišných tuků a bílkovin, zvýšené konzumaci sacharidů a alkoholu, zvýšené sportovní aktivitě, stresu nebo i z prostředí. Potraviny bohaté na hořčík jsou luštěniny, ořechy, ovesné vločky nebo třeba ryby. Hořčík je možno do organismu i dostat pomocí doplňků stravy. Doporučené dávkování pro dospělého člověka je 350 mg na den.

^{12,13}

Vápník

Vápenaté ionty patří mezi nejvýznamnější extracelulární iontům. Nachází se jak vně, tak uvnitř buňky, ovšem koncentrace vápníku v buňce je o několik řádů nižší než vně buňky. Vápník hraje důležitou roli jako druhý posel, který zprostředkovává účinek hormonů, cytokinů a dalších mediátorů v organismu. Stojí také za možností stahu svalstva, podílí se na regulaci neuromuskulární činnosti a srdeční aktivity. Způsobuje pevnost kostí a zubů. V celém organismu je celkový podíl vápníku 1,5% celkové hmotnosti a v kostech se nachází až 99 % toho vápníku. Uvnitř kostí aktivuje troponin a podílí se na tvorbě tropomyosinu. Vápník se vyskytuje v krevním řečišti, a to ve třech formách. V ionizované formě, biologicky nejaktivnější, je schopný se přenášet přes biologické membrány a rozhoduje při neuromuskulárním dráždění. Další formou je vázaný na bílkoviny, a nebo ve formě komplexů. Homeostáza vápníku je udržovaná v organismu pomocí osteoklastů, které dokážou resorbovat kost a tím zvyšovat koncentraci vápníku. Naopak osteoblasty se podílejí na novotvorbě kostní hmoty, čímž snižují koncentraci vápníku. Díky tomuto systému je neustále udržovaná rovnováha vápníku v organismu. Pokud je tato rovnováha narušena, mohou nastat dva stavy. Hypokalcémie či hyperkalcémie. Hypokalcémie je nízká koncentrace vápníku v těle a projevuje se dušností, zmateností, pozitivním chvostkovým testem a lámání kostí. Příčinou mohou být

deficit vitamínu D, hypoalbuminémie či hypoparatyreoza. Hypekalcemie je stav s vysokou koncentrací vápníku v organismu, projevuje se slabostí, letargií, únavou a zvracením. Vysoká koncentrace způsobuje až zástavu srdeční aktivity.^{13,14,15}

Fosfor

Fosfor je nedílnou součástí lidského organismu, vyskytuje se v každé buňce. Patří mezi základní jednotky, ze kterých se skládají nukleové kyseliny, jenž se vyskytují jako nedílná součást DNA. Fosfor se také účastní metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Vyskytuje se ve sloučenině ATP neboli adenosintrifosfát, což je jedna z nejdůležitějších molekul pro lidský organismus, zajišťují energetickou stabilitu. S vápníkem se vyskytuje v kostech a zubech. Pohyb fosforu po těle je úzce spojen s pohybem vápník. Oba tyto ionty jsou regulovány vitamínem D. Nedostatek fosforu v lidském organismu může způsobovat kazivost zubů, lámání kostí a ztuhlostí kloubů. Dalšími příznaky nedostatku fosforu jsou nechutenství a únava. Tím, že fosfor má i velký význam ve tvorbě krvinek, jeho nedostatek může způsobit chudokrevnost.^{13, 16, 17}

2.5 Techniky prvkové analýzy využití v této práci

Mikrovlňný rozklad

Mikrovlňný mineralizační tlakový systém se velmi často používá k převedení pevných vzorků na kapalné. Jedná se o velice účinnou metodou, při které teplota rozkladné směsi dosahuje až 260 °C a tlaku až 100 barů. Mikrovlňný rozklad se provádí v teflonových patronách o různých objemech. Průběh celého procesu je monitorován pomocí teploty v jednotlivých patronách a monitorováním tlaku v patroně s obvykle nejvyšší hmotností vzorku. Samotný rozklad se provádí v přítomnosti kyselin, kombinací více kyselin či kombinací peroxidu vodíku a kyseliny. Principem je rozklad organických látek a rozpouštění anorganických složek vzorku.¹⁸

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Základním principem této metody je vytvoření iontů stanovovaných prvků a jejich následná detekce. Tyto vzniklé ionty jsou rozlišovány na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Metody hmotnostní spektrometrie pracují obvykle v základní režimu bez přídavku reakčního / kolizního plynu. Toto uspořádání se běžně nazývá „no-gas mód“. Pro odstranění závažných spektrálních (izobarických) interferencí se využívá složitějšího režimu za využití reakčního / kolizního plynu, tzv. heliového modu, zkráceně „He mód“ (je evidentní, že v tomto

případě je použitým plynem helium). Vzniklý proud iontů je separován v hmotnostním spektrometru nejčastěji pomocí kvadrupólového analyzátoru a detekován. Detektor zaznamenává jednotlivé signály, které převádí na výsledné signály dle četnosti při daném poměru m/z .¹⁹

Techniku hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je možné použít pro více prvků najednou a zároveň je možné provádět rychlý sken téměř všech prvků periodické tabulky. Měřený vzorek se nejprve převede do formy aerosolu pomocí zmlžovače, tento aerosol je následně transportován nosným plynem do plazmové hlavice společně s plazmovým plynem. Jako plazmový plyn se nejčastěji používá argon. Plazmová hlavice je tvořena třemi koncentricky umístěnými trubicemi. Teplota plazmatického plynu dosahuje hodnot od 6 000 do cca 10 000 K. Jako důležitá součást přístroje je radiofrekvenční cívka, která generuje elektromagnetické pole, jehož energie je předávána argonovému plazmatu.^{19,20}

Metoda hmotnostní spektrometrie se dá využít v klinické praxi a biomedicínském výzkumu. Její velkou výhodou je vysoký stupeň spolehlivosti, široký lineární dynamický rozsah, nízké detekční limity pro většinu stanovovaných prvků a díky tomu se může v laboratořích využívat jako primární metoda. Na velkých pracovištích či ve výzkumných centrech je hmotnostní spektrometrie nepostradatelnou součástí pracovního postupu, na menších pracovištích se však tato metoda nepoužívá tak často, a to hlavně kvůli finanční náročnosti (vysoké pořizovací i provozní náklady).^{19,21}

2.6 Využití hmotnostní spektrometrie v klinické praxi

S rostoucím využíváním hmotnostní spektrometrie ve výzkumech narůstá také množství oborů, ve kterých se daná metoda používá při diagnostice. Jako účinný nástroj diagnostiky se hmotnostní spektrometr využívá při metabolických onemocnění, identifikace alergenů, identifikace bakteriálních kmenů, analýza bioaktivních peptidů a menších regulačních molekul, v toxikologii jako analýza toxických látek, biomarkerové studie a expresní profilování nebo sekvenční analýza DNA.²¹ Je nutné dodat, že v následujícím textu je pojednáno o hmotnostní spektrometrii s jinými typy iontových zdrojů a pro organickou analýzu (nikoliv prvkovou).

Metabolická onemocnění

V krvi či moči se nachází metabolity a malé organické látky jako jsou puriny, kyseliny, pyrimidiny, oligosacharidy či jiné. V těchto látkách můžeme zaznamenávat odchylky, které následně mohou způsobovat metabolická onemocnění. Při diagnostice metabolického onemocnění hmotnostní spektrometr přispívá k rozpoznání strádavých lysozomálních

onemocnění. Střádavé lysozomální onemocnění je vzácná dědičná choroba, kdy dochází k defektu lysozomálních enzymů zodpovědných za štěpení glykoproteinů, glykosaaminoglykanů a lipidů. Samotná diagnostika funguje na principu monitorování kvantity připraveného na syntetizovaného substrátu, který hodnotí aktivitu enzymů.^{21,22}

Identifikace alergenů

Alergie je patologická reakce imunitního systému na alergeny. Alergeny jsou látky, které se běžně nacházejí v prostředí, mohou to být plísně, zvířata či potraviny. Alergií trpí až 30% populace. Hmotnostní spektrometr se využívá při detekci alergenů v potravinách, přítomné alergeny dokáže rozlišit na základě přesné hmoty a fragmentace.^{21,23}

Identifikace bakteriálních kmenů

Tato metoda se hlavně uplatňuje v mikrobiologii, kdy se identifikují bakteriální kmeny z jedné bakteriální kolonie či malého množství média. Malé množství vzorku je následně nanášeno na terčík a pomocí metody MAI-TOF/MS jsou analyzovány. Výsledná spektra se porovnávají s již analyzovanými vzorky a je jim přiřazena identita. Tato metoda je velice časově úsporná a prokazuje vysokou úspěšnost.²¹

Analýza bioaktivních peptidů a malých regulačních molekul

MS může stanovovat analogy steroidních hormonů, růstových faktorů a dalších zakázaných látek ve sportu pro zvyšování výkonnosti. MS může dané látky stanovit díky možnosti stanovovat látky s velmi nízkou plazmatickou koncentrací, jako jsou i hormony a biogenní proteiny. Metoda MS není totiž závislá na terciální struktuře látek, identifikace probíhá na základě přesné hmoty a fragmentace. Standard s přesnou terciální strukturou, jako má studovaný vzorek je možné potom ztotožnit na základě metody kalibrační křivky, kdy získáme informaci o přesné koncentraci.²¹

Toxikologie

Hmotnostní spektrometr se používá i na analýzu toxických látek, jako jsou pesticidy, bakteriální toxiny atd. Využití je ale mnohem širší a lze stanovovat i látky v léčivech, drogách nebo životním prostředí. Dnešní výzkum se soustředí na získávání dat pomocí neinvazivní metody, získávání dat z potu nebo pomocí DESI techniky, aplikované na kůži.^{21,24}

Biomarkerové studie a expresní profilování

Biomarkerové studie jsou založeny na identifikaci proteomů pomocí MS, což hraje klíčovou roli v identifikaci biomarkerů. Tato metoda se používá u infekčních, kardiovaskulárních, a především onkologických onemocnění. Při těchto onemocněních dochází v těle jedince k velkým metabolickým a regulačním změnám, které způsobují pokles koncentrací některých vybraných molekul, biomarkerů. Expresní profilování je proces, při kterém dochází k paralelnímu stanovení exprese mnoha genů, tato exprese nám poskytuje informace o buněčné funkci. Za pomoci MS stanovujeme proteomy a metabolomy, které mají význam při vyjasňování mechanismu účinku léčiv, a mohou nám poskytnout důležité informace o dané chorobě.²¹

Sekvenční analýza DNA

Pomocí MS lze stanovit krátké řetězce DNA, tato metoda je časově méně náročná než standardní sekvenční metody. Metodu sekvenční analýzy uplatňujeme v případech, kdy vzorek je dostatečně koncentrovaný a je známo co za změny v genomu jsou potřeba najít.^{21,25}

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a pomůcky

Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7900 ICP-MS s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (Agilent Technologies, USA)

Mikrovlnné rozkladné zařízení Speedwave Xpert vybavené rozkladnými patronami DAP 60 (Berghoff Products + Instruments, Německo)

Analytické váhy (Sartorius, Česká republika)

Zdroj deionizované vody (Milli-Qplus, Millipore, USA)

3.2 Použité chemikálie

Kyselina dusičná (67-69 %, Analpure, Analytika spol. s.r.o., Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (35-37 %, Analpure, Analytika spol. s.r.o., Česká republika)

Jednoprvkové certifikované referenční materiály vápníku, hořčíku a fosforu o koncentraci $1,00 \pm 0,05$ mg/l (platí pro každý zvlášť) v kyselině dusičné (Analytika spol. s.r.o., Česká republika)

Roztok interních standardů obsahující prvky Bi, In, Sc, Tb a Y o koncentraci 10 mg/l (Astastol®-MIX INT-MIX 1, Analytika spol. s.r.o., Česká republika)

Deionizovaná voda (0,055 μ S)

3.3 Vzorky

Pro analýzu byly použity vzorky kostí z 8 druhů živočichů. Ve výběru jednotlivých druhů sehrála hlavní roli jejich dostupnost na trhu. Výběr byl proveden tak, aby výsledná data mohla být v budoucnu publikována v knize o nutriční výživě psů. Vzorky byly označeny písmeny A-K, podle následujícího schématu (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Přehled analyzovaných vzorků

Označení	Druh	Označení	Druh	Označení	Druh
A	Hovězí oháňka	E	Kuřecí křídlo	CH	Kachní běhák
B	Kruta stehno	F	Kuřecí krk	I	Kachní hlava
C	Křepelka stehno	G	Jehněčí hřebínky	J	Králičí hlava
D	Kuře stehno	H	Vepřová žebra	K	Kachní krk

3.4 Pracovní postup

Nejprve byly připravovány vzorky. Obdržené kosti byly očištěny a nadrceny na menší kousky. Jednotlivé kousky byly opláchnuty deionizovanou vodou a poté přemístěny na Petriho misky. Misky byly umístěné do sušárny na 90 min při teplotě 90 °C. Poté byly vzorky přemístěny do menších zkumavek. V případě nutnosti byly vzorky dále uchovávány v mrazáku při -20 °C. Jednotlivé vzorky byly označeny A-K.

Následně bylo přistoupeno k mikrovlnným tlakovým rozkladům za použití k tomu určenému přístroji. Bylo připraveno 12 rozkladných teflonových patron, které byly nejprve důkladně vyčištěny. Čištění bylo provedeno postupným pipetováním 1 ml 36% HCl a 9 ml 67% HNO₃. Patrony byly uzavřené těsníci víčky, průraznými disky a uzavřeny uzávěry. Všechny patrony byly umístěny do karuselu mikrovlnného rozkladného zařízení a byl spuštěn čisticí program. Sled jednotlivých kroků (nastavená teplota, doba udržování, nastavený tlak) je uveden v Tab. 3.2. Po ukončení programu byly patrony otevřeny, opláchnuty a ponechány k vysušení.

Tab. 3.2: Čisticí program vysokotlakého mikrovlnného zařízení

Číslo kroku	T [°C]	p [bar]	t_1 [min]	t_2 [min]	P [%]
1	170	35	5	5	90
2	200	35	1	15	90
3	50	35	1	10	0
4	50	0	0	0	0
5	50	0	0	0	0

T - požadovaná teplota, *p* - požadovaný tlak, *t*₁ - doba pro dosažení požadované teploty a tlaku, *t*₂ - doba pro udržení teploty a tlaku, *P* - maximální výkon magnetronu

3.4.1 Příprava vzorků

Mikrovlnný rozklad vzorků

Všechny vzorky byly rozloženy pomocí mikrovlnného rozkladného zařízení. Nejprve byly rozloženy vzorky A-C (Tab. 3.3). Jednotlivé vzorky byly rozděleny na tři části tak, aby jedna navážka odpovídala hmotnosti od 0,15 do 0,25 g. Jednotlivé navážky byly vsypány do rozkladných patron a poté k nim bylo pomocí pipety přidáno 8 ml 67% HNO₃ a 2 ml 36% HCl. Celkově bylo připraveno 10 rozkladných patron. Vzorek C byl rozdělen z důvodu malého množství pouze na dvě části. V osmi patronách byly části analyzovaných vzorků. Další dvě patrony byly využity pro slepé pokusy (blanky). Do obou patron se slepými vzorky byly přidány

pouze kyseliny, a to konkrétně 8 ml 67% HNO₃ a 2 ml 36% HCl. Patrony byly ponechány v klidu po dobu deseti minut. Následně byly patrony uzavřeny, vloženy do karuselu rozkladného zařízení a byl spuštěno program pro rozklad vzorků kostí (Tab. 3.7). Po ukončení rozkladného programu byly vzorky přelity do plastových centrifugačních zkumavek a byly doplněny deionizovanou vodou na objem 45 ml. Rozkladné patrony byly následně vypláchnuty pomocí 5% HNO₃, patrony s kyselinou byly ponechány po dobu 20 min v digestoři louhovat a poté byly vypláchnuty deionizovanou vodou a ponechány na vyschnutí.

Tab. 3.3: *Navážky jednotlivých vzorků A-C*

Patrona	Vzorek	Hmotnost [g]
1B	A1	0,23778
2B	A2	0,21903
3B	A3	0,24090
4B	B1	0,19539
5B	B2	0,21330
6B	B3	0,15960
7B	C1	0,15348
8B	C2	0,14147
9B	blank	
10B	blank	

Dále byly rozkládány vzorky D-F (Tab. 3.4), opět se vzorky rozdělily na třetiny a ty byly postupně vkládány do jednotlivých patron. Vzorek F neměl dostatečnou hmotnost na tři navážky, a tak vznikly pouze dvě části. Další postup byl shodný s předchozí sérií vzorků.

Další vzorky G-CH (Tab. 3.5) byly rozloženy až s odstupem několika dní. Vzorky byly opět rozděleny na tři navážky, přičemž celková hmotnost vzorku G neodpovídala třem požadovaným hmotnostním podílům, a tak vznikly pouze dvě části. Další postup byl opět shodný s předchozím.

Tab. 3.4: *Navážky jednotlivých vzorků D-F*

Patrona	Vzorek	Hmotnost [g]
1B	D1	0,26307
2B	D2	0,23630
3B	D3	0,22640
4B	E1	0,16397
5B	E2	0,18710
6B	E3	0,21020
7B	F1	0,15485
8B	F2	0,16983
9B	Blank	
10B	Blank	

Tab. 3.5: *Navážky jednotlivých vzorků G-CH*

Patrona	Vzorek	Hmotnost [g]
1B	G1	0,15735
2B	G2	0,25213
3B	H1	0,24660
4B	H2	0,18403
5B	H3	0,23092
6B	CH1	0,16662
7B	CH2	0,19270
8B	CH3	0,18862
9B	Blank	
10B	Blank	

Na závěr byly rozkládány vzorky I-K (Tab. 3.6). Jednotlivé vzorky byly rozděleny podle hmotnosti na tři menší díly, jednotlivé díly byly umístěny do patron a do nich bylo postupně napipetováno 8 ml 67% HNO₃ a 2 ml 36% HCl. Poté byly patrony ponechány stát 10 min v klidu a následně byly uzavřeny těsníci víčky, průraznými disky a velkými víčky. Následně byly vzorky rozloženy.

Tab. 3.6: *Navážky jednotlivých vzorků I-K*

Patrona	Vzorek	Hmotnost [g]
1B	I1	0,16380
2B	I2	0,21254
3B	J1	0,21100
4B	J2	0,17291
5B	J3	0,21081
6B	K1	0,19500
7B	K2	0,15530
8B	K3	0,17530
9B	blank	
10B	blank	

Tab. 3.7: *Program pro rozklad vzorků kostí*

Číslo kroku	T [°C]	p [bar]	t_1 [min]	t_2 [min]	P [%]
1	160	30	10	10	70
2	190	30	5	20	80
3	50	25	1	10	0
4	50	0	0	0	0
5	50	0	0	0	0

T - požadovaná teplota, p - požadovaný tlak, t_1 - doba pro dosažení požadované teploty a tlaku, t_2 - doba pro udržení teploty a tlaku, P - maximální výkon magnetronu

3.4.2 Analýza vzorků

Po rozložení všech vzorků kostí byly připraveny roztoky k optimalizaci hmotnostního spektrometru, směsné kalibrační roztoky byly připraveny ředěním koncentrovaného směsného roztoku, který byl vytvořen pomocí třech jednorvkových kalibračních roztoků (Ca, Mg, P). Koncentrace roztoků, z nichž byla vytvořena kalibrační řada (jednotlivé roztoky byly označeny I0 až I5) činily: blank; 0,0016; 0,008; 0,04; 0,2 a 1,0 mg/l pro všechny měřené prvky. Všechny kalibrační roztoky byly připraveny ve 2% kyselině dusičné.

Výsledné roztoky byly proměřovány na hmotnostním spektrometru. Přístroj byl spuštěn a byly nastaveny potřebné parametry jak pro no gas mode, tak i pro mode s héliem. Dále byl přístroj podroben kalibraci pomocí kalibrační řady I0-I5. Všechny rozložené vzorky kostí byly

navíc 50x naředěny (bylo pipetováno 300 ul původního vzorku do 15ml zkumavky a doplněny 2% kyselinou dusičnou na objem 15ml).

3.5 Charakteristiky analytických metod

Základní charakteristiky analytických metod nejdůležitější pro tuto práci byly detekční limit, vyjádřený jako meze detekce (LOD) a jako koncentrace ekvivalentního pozadí (BEC).

LOD neboli meze detekce je nejmenší možná detekovatelná koncentrace analytu ve vzorku. Podle IUPAC je mezí detekce myšlena koncentrace analytu, jejíž signál odpovídá trojnásobku směrodatné odchylky šumu základní linie nebo blanku.

Pomocí meze detekce (LOD) se také posuzuje citlivost dané analytické metody, citlivost se také dá posoudit podle směrnice kalibrační přímky.^{26, 27}

BEC neboli koncentrace ekvivalentního pozadí je parametr, který popisuje citlivost přístroje za daných konkrétních podmínek. Je dán koncentrací prvku ve vzorku, jejíž signál je roven signálu, který produkuje pozadí přístroje.²⁶

Přesnost u analytických metod je parametr, který ukazuje blízkost měření ke skutečné hodnotě nebo k hodnotě, která je vyjádřena s chybou.²⁶

Správnost výsledku je charakteristický parametr, který určuje, jak moc je měření zatíženo chybami.²⁶

4 Výsledková část a diskuze

V následující části práce jsou prezentována získaná data, která jsou následně diskutována. Jsou zde i zahrnuty experimentální podmínky, za kterých byly jednotlivé experimenty provedeny.

4.1 Provedení mikrovlnných tlakových rozkladů

Vysokotlaké mikrovlnné zařízení bylo použito při rozkladu všech analyzovaných vzorků v této práci. Použité navážky vzorků jsou uvedeny v Tab. 3.3 až Tab. 3.6. Teploty a další nastavené podmínky během procesu rozkladu jsou uvedeny v tabulkách Tab. 3.2 a Tab. 3.7. Teplotní průběh během celého procesu rozkladu byl sledován ve všech použitých patronách. Tlak byl sledován pouze v jedné patroně, a to v patroně s nejvyšší navázkou vzorku, která byla opatřena speciálním uzávěrem umožňující tlaková měření a byla umístěna do pozice 1 karuselu. Ze získaných záznamů průběhů rozkladu bylo zřejmé, že všechny rozkladné cykly proběhly standardně bez jakýchkoliv výkyvů teplot nebo tlaku. Na závěr tak bylo možné konstatovat, že všechny rozkládané vzorky byly rozloženy úspěšně, což bylo možné ověřit i vizuální kontrolou transparentnosti vzorku.

4.2 Zjištění experimentálních podmínek

Prvková analýza jednotlivých vzorků byla prováděna na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Na začátku měření bylo provedeno ladění přístroje. Následně pak byly naměřeny příslušné kalibrační závislosti a zjištěny základní charakteristiky stanovení uvedených třech prvků. Celý proces byl řízen počítačovým programem MassHunter 4.6, experimentální podmínky jsou uvedeny v níže přiložené tabulce (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: *Experimentální podmínky ICP-MS*

Režim měření	General Purpose
Výkon RF generátoru [W]	1550 W
Hloubka vzorkování [mm]	10,0
Teplota S/C (mlžné komory) [°C]	2,0
Průtok argonu ve zmlžovači (nebulizéru) [l/min]	15,0
Průtok přídavného plynu (helia) [l/min]	1,05
Rychlost otáček peristaltické pumpy u zmlžovače [RPS]	0,1

4.3 Analýza celkového zastoupení prvků v kostech

Praktickou úlohou bylo stanovení celkového zastoupení jednotlivých prvků (vápník, hořčík a fosfor) v kostech. Měření bylo prováděno přístrojem ICP-MS, naměřené hodnoty byly přepočteny pomocí příslušného ředícího faktoru. Koncentrace jednotlivých prvků byly měřeny v triplikátech. Ze získaných koncentrací byl následně vyjádřen medián a ten byl doplněn o konfidenční interval. Finální výsledky byly vyjádřeny jako obsah daného prvku (v mg) na jeden gram vzorku. Získané hodnoty jsou přiložené v níže uvedených tabulkách.

4.3.1 Stanovení a vyhodnocení obsahu hořčíku

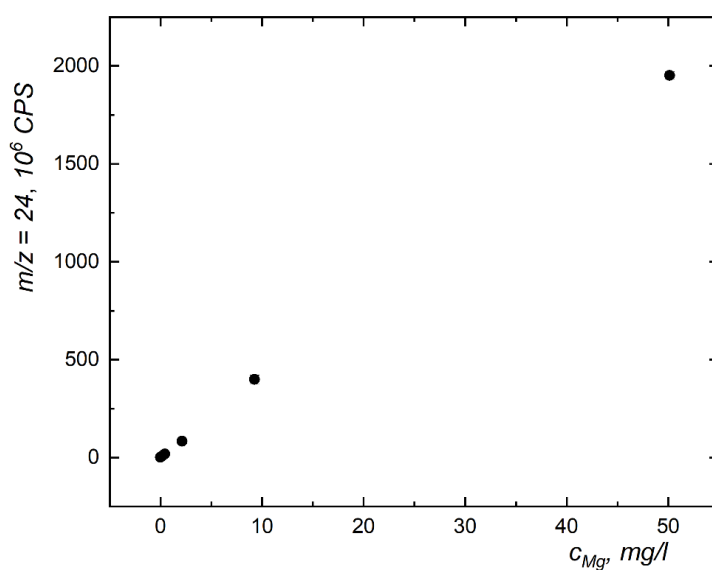
Hořčík byl měřen na hmotnostním spektrometru ve dvou výše uvedených módech (no-gas a He-mód). Hořčík má tři izotopy, které lze sledovat. Izotop ^{24}Mg , ^{25}Mg a ^{26}Mg . Pro nejvyšší zastoupení byl sledován izotop ^{24}Mg , jehož procentuální zastoupení je 78,99 % v přírodě a nemá žádné významné interference. Izotop ^{25}Mg se vyskytuje v 10,00 % a izotop ^{26}Mg v 11,01 %. Jako interní standart bylo použito skandium ^{45}Sc .

Po změření jednotlivých vzorků poskytl spektrometr informace o koncentraci daného prvku v kapalném roztoku v jednotkách mg/l (Tab. 4.2). Ze získaných výsledků byl statisticky vypočten medián a koncentrace byla přepočtena na mg/g pomocí navážky vzorku a započteného zředovacího faktoru.

Na Obr. 4.1 je vizuálně zpracovaná kalibrační závislost pro ^{24}Mg . Graf ukazuje závislost odezvy přístroje v jednotkách 10^6 CPS na koncentraci zvoleného izotopu Mg v jednotkách mg/l. Kalibrační závislost popsanou regresní přímkou lze vyjádřit pomocí rovnice $y = 3,903 \cdot 10^7 x + 1,43 \cdot 10^6$. Hodnota koeficientu korelace R byla v tomto případě rovna 1,0000. Teoretický detekční limit (DL) činil 1,24 $\mu\text{g/l}$, avšak reálně lze vyhodnocovat až výsledky ležící nad koncentrací ekvivalentního pozadí (BEC), jejíž hodnota činila pro stanovení hořčíku 0,037 mg/l.

Tab. 4.2: Hodnoty koncentrací v mg/l pro ^{24}Mg

Vzorek	$c(\text{Mg})$ [mg/l]	Vzorek	$c(\text{Mg})$ [mg/l]
A1	$0,548 \pm 5,8$	E1	$0,351 \pm 18$
A2	$0,387 \pm 0,5$	E2	$0,536 \pm 1,2$
A3	$0,515 \pm 3,5$	E3	$0,602 \pm 12$
B1	$0,480 \pm 1,3$	F1	$0,333 \pm 29$
B2	$0,634 \pm 0,6$	F2	$0,419 \pm 0,9$
B3	$0,412 \pm 1,5$	G1	$0,328 \pm 1,5$
C1	$0,389 \pm 25$	G2	$0,517 \pm 0,9$
C2	$0,370 \pm 0,5$	H1	$0,581 \pm 1,3$
D1	$0,775 \pm 0,4$	H2	$0,480 \pm 1,0$
D2	$0,758 \pm 0,2$	H3	$0,691 \pm 14$
D3	$0,672 \pm 1,4$	I1	$0,296 \pm 3,2$
CH1	$0,232 \pm 0,8$	I2	$0,313 \pm 1,5$
CH2	$0,325 \pm 11$	K1	$0,362 \pm 1,3$
CH3	$0,352 \pm 0,3$	K2	$0,295 \pm 1,7$
J1	$0,414 \pm 0,3$	K3	$0,353 \pm 0,3$
J2	$0,432 \pm 0,3$		
J3	$0,494 \pm 4,1$		



Obr. 4.1: Kalibrační závislost pro ^{24}Mg (podmínky měření uvedeny v Tab. 4.1)

Tab. 4.3: Výsledná koncentrace hořčíku v původních vzorcích v mg/g

Vzorek	c(Mg) [mg/g]
Hovězí oháňka	4,81 ± 0,19
Krutí stehenní kost	5,81 ± 0,10
Křepelčí stehenní kost	5,88 ± 0,03
Kuřecí stehenní kost	6,68 ± 0,11
Kuřecí křídlo	6,45 ± 0,09
Kuřecí krk	5,55 ± 0,06
Jehněčí hřebínky	4,61 ± 0,05
Vepřová žebra	5,87 ± 0,07
Kachní běhák	3,79 ± 0,49
Kachní hlava	4,07 ± 0,15
Králičí hlava	5,62 ± 0,02
Kachní krk	4,27 ± 0,08

Jak je patrné z Tab. 4.3, získané hodnoty koncentrací hořčíku jsou ve všech vzorcích řádově stejné. Nejvyšší naměřená koncentrace hořčíku byla zaznamenána ve vzorku D (*Kuřecí stehenní kost*). Koncentrace hořčíku činila $6,68 \pm 0,11$ mg/g. Naopak nejnižší byla zjištěna ve vzorku CH (*Kachní běhák*) a činila $3,79 \pm 0,49$ mg/g.

4.3.2 Stanovení a vyhodnocení fosforu

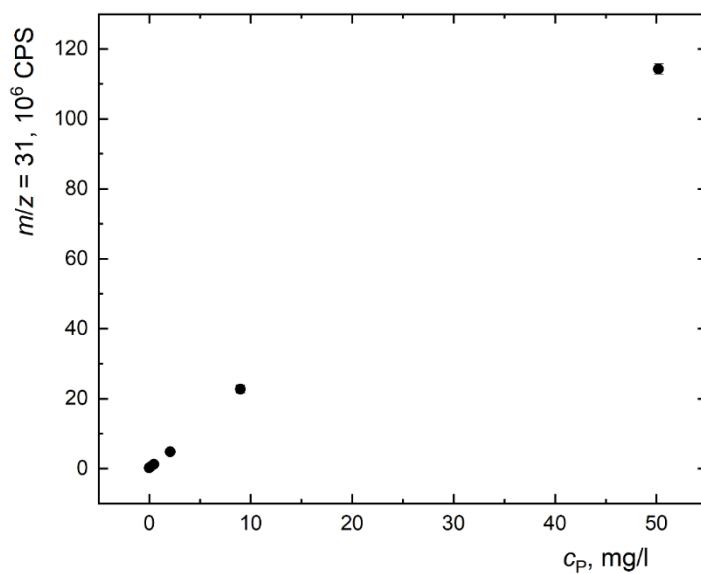
Fosfor jako prvek, který se nachází v přírodě ve formě izotopu ^{31}P , byl za pomoci přístroje ICP-MS detekován za využití interního standartu ^{45}Sc . Pro měření fosforu byly použity dva mody – no gas mode a helium mode. Z výsledných hodnot byly zpracovány data z no gas mode.

Jednotlivé koncentrace vzorků (Tab. 4.4) v mg/l, byla statisticky převedena na medián a přepočítaná na koncentraci v mg/g.

Na Obr. 4.2 je vizuálně zpracovaná kalibrační závislost pro ^{31}P . Graf ukazuje závislost odezvy přístroje v jednotkách 10^6 CPS na koncentraci zvoleného izotopu P v jednotkách mg/l. Kalibrační závislost popsanou regresní přímkou lze vyjádřit pomocí rovnice $y = 2,280 \cdot 10^6 x + 1,78 \cdot 10^5$. Hodnota koeficientu korelace R v tomto případě činila 1,0000. Teoretický detekční limit (DL) činil $2,05 \mu\text{g/l}$, reálně však lze vyhodnocovat až výsledky ležící nad koncentrací ekvivalentního pozadí (BEC), tato hodnota pro stanovení fosforu byla $0,078$ mg/l.

Tab. 4.4: Hodnoty koncentrací v mg/l pro ^{31}P

Vzorek	$c(\text{Mg})$ [mg/l]	Vzorek	$c(\text{Mg})$ [mg/l]
A1	$14,9 \pm 4,30$	E1	$8,28 \pm 18,7$
A2	$10,8 \pm 0,30$	E2	$11,8 \pm 0,40$
A3	$13,6 \pm 4,50$	E3	$13,4 \pm 12,9$
B1	$12,6 \pm 2,50$	F1	$7,58 \pm 28,0$
B2	$16,4 \pm 0,40$	F2	$9,66 \pm 0,30$
B3	$10,6 \pm 0,70$	G1	$7,95 \pm 0,80$
C1	$9,36 \pm 25,1$	G2	$12,8 \pm 0,70$
C2	$8,92 \pm 0,20$	H1	$14,1 \pm 0,30$
D1	$18,2 \pm 0,40$	H2	$11,7 \pm 1,10$
D2	$17,9 \pm 0,40$	H3	$16,6 \pm 14,8$
D3	$16,0 \pm 0,80$	I1	$8,89 \pm 3,10$
CH1	$6,59 \pm 0,00$	I2	$10,1 \pm 1,00$
CH2	$9,38 \pm 12,0$	K1	$10,9 \pm 0,90$
CH3	$10,3 \pm 0,80$	K2	$9,41 \pm 0,40$
J1	$11,1 \pm 1,20$	K3	$10,6 \pm 0,60$
J2	$11,2 \pm 0,30$		
J3	$12,7 \pm 4,40$		

**Obr. 4.2:** Závislost kalibrace pro ^{31}P (podmínky měření uvedeny v Tab. 4.1)

Tab. 4.5: Výsledná koncentrace fosforu ve vzorcích v mg/g

Vzorek	c(P) [mg/g]
Hovězí oháňka	127 ± 6,50
Krutí stehenní kost	149 ± 1,19
Křepelčí stehenní kost	142 ± 0,32
Kuřecí stehenní kost	156 ± 0,71
Kuřecí křídlo	142 ± 0,65
Kuřecí krk	128 ± 0,44
Jehněčí hřebínky	115 ± 0,91
Vepřová žebra	144 ± 1,80
Kachní běhák	123 ± 1,12
Kachní hlava	122 ± 4,31
Králičí hlava	136 ± 6,81
Kachní krk	136 ± 0,93

Z výše uvedené Tab. 4.5 je vidět, že nejvyšší naměřená koncentrace fosforu byla $156 \pm 0,71$ mg/g, tato koncentrace byla naměřena u vzorku D (*Kuřecí stehenní kost*), nejnižší koncentrace fosforu, která činila $115 \pm 0,91$ mg/g, byla naměřena u vzorku G (*Jehněčí hřebínky*).

4.3.3 Stanovení a vyhodnocení vápníku

Vápník se vyskytuje v mnoha izotopech v přírodě. Největší zastoupení má izotop ^{40}Ca vyskytuje se až v 96,941 % případů, bohužel pro vysokou pravděpodobnost spektrálních interferencí především s adukty plazmového plynu nebylo možné tento izotop měřit. Byly tak zvoleny jiné izotopy, a to izotopy ^{43}Ca a ^{44}Ca . Oba tyto izotopy byly měřeny ve dvou modech – no gas mode a helium mode. Izotop ^{43}Ca se vyskytuje v 0,135 % a izotop ^{44}Ca v 2,09 %. Dále se vápník dá měřit jako izotop ^{42}Ca a ^{46}Ca . Ty ale vyhodnoceny nebyly. Jako intertní standart bylo použito scandium ^{45}Sc .

Vápník byl sledován ve dvou izotopech, proto jsou níže přiloženy dva obrázky. Obr. 4.3 ukazuje závislost hodnoty 10^6 CPS na koncentraci v mg/l izotopu ^{43}Ca a druhý Obr. 4.4 představuje stejnou závislost akorát pro izotop ^{44}Ca .

Z jednotlivých dat byl statisticky vypočten medián a hodnoty koncentrací byly přepočteny z mg/l na mg/g pouze pro izotop ^{44}Ca . Koncentrace vápníku ve vzorcích kostí v mg/l pro ^{43}Ca a ^{44}Ca uvádí Tab. 4.6 a Tab. 4.7.

Tab. 4.6: *Hodnoty koncentrací v mg/l pro ^{43}Ca*

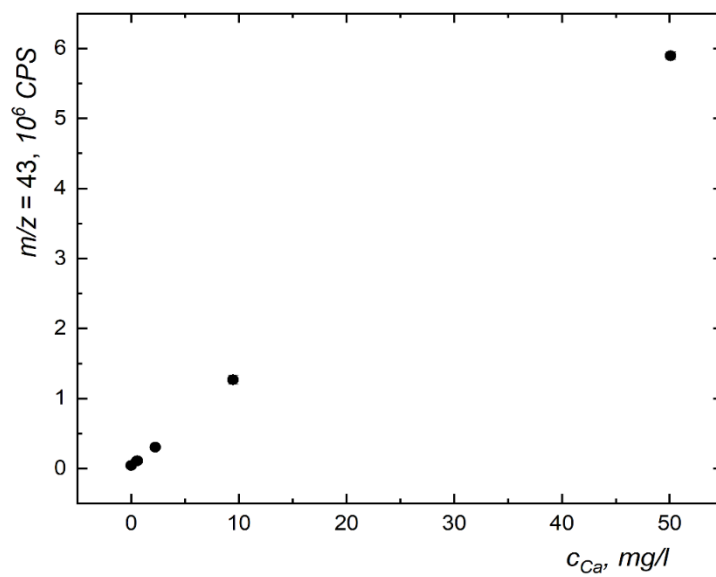
Vzorek	$c(\text{Ca})$ [mg/l]	Vzorek	$c(\text{Ca})$ [mg/l]
A1	$33,1 \pm 3,80$	E1	$17,8 \pm 18,2$
A2	$24,1 \pm 1,10$	E2	$25,2 \pm 0,20$
A3	$30,5 \pm 3,70$	E3	$28,9 \pm 11,9$
B1	$27,3 \pm 2,30$	F1	$15,9 \pm 27,5$
B2	$35,8 \pm 0,60$	F2	$20,2 \pm 0,40$
B3	$23,0 \pm 1,00$	G1	$16,5 \pm 0,20$
C1	$19,6 \pm 25,0$	G2	$27,0 \pm 0,80$
C2	$18,7 \pm 0,20$	H1	$31,3 \pm 0,60$
D1	$39,5 \pm 0,40$	H2	$26,3 \pm 1,60$
D2	$38,3 \pm 0,20$	H3	$36,9 \pm 14,2$
D3	$34,6 \pm 1,40$	I1	$18,9 \pm 3,70$
CH1	$14,6 \pm 0,20$	I2	$21,8 \pm 1,10$
CH2	$21,1 \pm 10,7$	K1	$23,6 \pm 0,80$
CH3	$23,3 \pm 1,70$	K2	$20,7 \pm 0,60$
J1	$24,9 \pm 1,30$	K3	$22,8 \pm 0,80$
J2	$25,2 \pm 1,20$		
J3	$28,9 \pm 3,70$		

Tab.4.7: Hodnoty koncentrací v mg/l pro ^{44}Ca

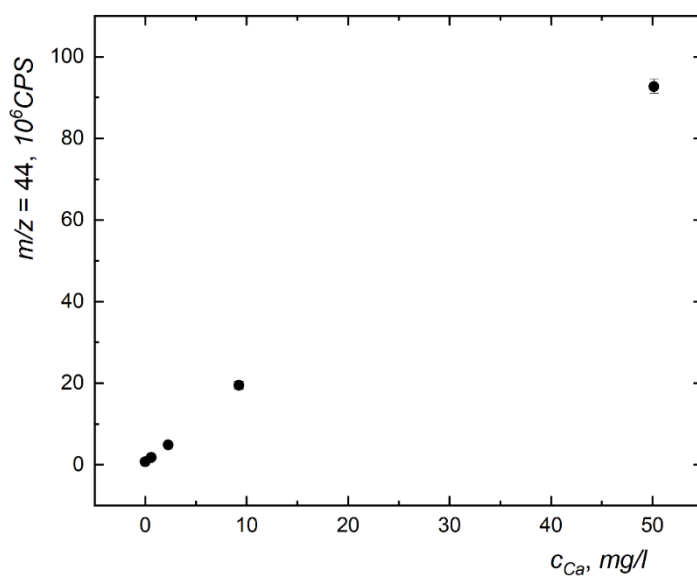
Vzorek	$c(\text{Ca})$ [mg/l]	Vzorek	$c(\text{Ca})$ [mg/l]
A1	$34,4 \pm 15,4$	E1	$20,2 \pm 9,10$
A2	$23,1 \pm 0,40$	E2	$26,3 \pm 6,80$
A3	$28,9 \pm 8,50$	E3	$29,8 \pm 6,30$
B1	$25,9 \pm 4,70$	F1	$16,9 \pm 6,00$
B2	$37,4 \pm 4,02$	F2	$19,5 \pm 5,80$
B3	$22,1 \pm 4,00$	G1	$15,5 \pm 8,90$
C1	$19,9 \pm 4,40$	G2	$26,6 \pm 6,50$
C2	$18,1 \pm 7,50$	H1	$31,3 \pm 7,50$
D1	$36,3 \pm 6,00$	H2	$24,4 \pm 2,80$
D2	$37,6 \pm 3,10$	H3	$33,1 \pm 9,20$
D3	$35,1 \pm 9,90$	I1	$17,1 \pm 8,10$
CH1	$14,7 \pm 4,70$	I2	$21,9 \pm 2,70$
CH2	$18,4 \pm 4,90$	K1	$22,8 \pm 5,90$
CH3	$20,9 \pm 8,00$	K2	$19,4 \pm 5,20$
J1	$22,9 \pm 4,00$	K3	$22,0 \pm 5,10$
J2	$24,8 \pm 8,30$		
J3	$25,9 \pm 6,50$		

Na Obr. 4.3 je graficky zpracována kalibrační závislost pro ^{43}Ca . Graf ukazuje závislost odezvy přístroje v jednotkách 10^6 CPS na koncentraci zvoleného izotopu Ca v jednotkách mg/l. Kalibrační závislost popsanou regresní přímkou lze zapsat pomocí rovnice $y = 1,172 \cdot 10^5 x + 4,19 \cdot 10^4$. Hodnota koeficientu korelace R byla v tomto případě rovna 0,9999. Teoretický detekční limit (DL) činil $23,6 \mu\text{g/l}$, avšak reálně lze vyhodnocovat až výsledky ležící nad koncentrací ekvivalentního pozadí (BEC), jejíž hodnota pro izotop ^{43}Ca činila $0,357 \text{ mg/l}$.

Na Obr. 4.4 je vizuálně zpracována kalibrační závislost pro ^{44}Ca . Závislost ukazuje odezvy přístroje v jednotkách 10^6 CPS na koncentraci zvoleného izotopu Ca v jednotkách mg/l. Regresní přímka, která popisuje kalibrační závislost se dá vyjádřit rovnicí $y = 1,841 \cdot 10^6 x + 7,13 \cdot 10^5$. Hodnota pro koeficient korelace R byla 1,0000. Hodnota DL, teoretického detekčního limitu činí $9,25 \mu\text{g/l}$, výsledky však lze vyhodnocovat až nad koncentrací ekvivalentního pozadí (BEC), jejíž hodnota pro izotop ^{44}Ca činila $0,387 \text{ mg/l}$.



Obr. 4.3: Závislost kalibrace pro ^{43}Ca (podmínky měření uvedeny v Tab. 4.1)



Obr. 4.4: Závislost kalibrace pro ^{44}Ca (podmínky měření uvedeny v Tab. 4.1)

Tab. 4.8: Výsledná koncentrace vápníku ve vzorcích v mg/g

Vzorek	c(Ca) [mg/g]
Hovězí oháňka	285 ± 12,00
Krutí stehenní kost	325 ± 3,70
Křepelčí stehenní kost	297 ± 0,68
Kuřecí stehenní kost	344 ± 5,48
Kuřecí křídlo	304 ± 0,69
Kuřecí krk	267 ± 1,22
Jehněčí hřebínky	236 ± 0,54
Vepřová žebra	321 ± 5,85
Kachní běhák	278 ± 5,38
Kachní hlava	231 ± 2,90
Králičí hlava	329 ± 4,49
Kachní krk	293 ± 2,67

Výsledná data byla vypočtena pouze pro izotop ^{44}Ca . Z výše uvedené Tab. 4.8 je patrné, že nejvyšší naměřená hodnota u vápníku byla zaznamenána u vzorku D (*Kuřecí stehenní kost*) $344 \pm 5,5$ mg/g, naopak nejnižší zaznamenaná hodnota byla změřena u vzorku I (*Kachní hlava*) $231 \pm 2,9$ mg/g.

4.4 Diskuze

Ze získaných dat bylo prokázáno, že kosti tvoří hlavní základnu pro vápník a fosfor a jejich koncentrace tedy mnohonásobně převyšují ostatní prvky v kostech. Tím, že kosti se však skládají z dalších minerálních složek, je tedy možné naměřit i koncentrace dalších prvků. Z výsledných údajů však vyplývá, že koncentrace měřeného hořčíku je až 100x menší než fosforu a vápníku, což potvrzuje výše sepsaný teoretický podklad.

Při všech třech stanovení došlo k naměření nejvyšší koncentrace u vzorku D (*Kuřecí stehno*). Vzorek D představuje nejdelsí kost v organismu. Obecně v dlouhých kostech dochází k největší přeměně a tvorbě kostní dřevě. Remodelace dlouhých kostí je velice častý proces, při kterém dochází k tvorbě i nových iontů a jejich ukládání. Ionty jsou běžně uloženy v kostních tkáních, a to převážně v dlouhých nebo plochých kostech. Vzorek s nejmenší koncentrací byl u všech třech měření jiný.

Právě pro minerální stavbu kostí byly vybrány specificky tyto tři prvky. Vápník, hořčík a fosfor jsou hlavní prvky, které se v těchto minerálech nacházejí, a proto se také stávají hlavní

složkou potravy psů, které se kostmi krmí. Zjištěná data byla právě proto důležitou informací pro další výzkum související s problematikou výživy psů. Ze zjištěných dat vyplývá důležitý závěr, že je v podstatě jedno, jakými kostmi je pes krměn, neboť při správném krmení vždy dostane potřebné množství minerálů ve stravě.

5 Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo vytvořit přehled koncentrací hlavních prvků ve vybraných kostech vybraných druhů živočichů. Zvolené prvky (vápník, hořčík a fosfor) byly stanovovány pomocí hmotností spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Zjištěné hodnoty koncentrací vybraných prvků budou v budoucnu použity pro knižní publikaci o výživě psů. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že vliv druhu zvířete nehraje velkou roli na množství prvků v kostech, poměr prvků se udržuje ve stále stejné hladině. Více než druh zvířete hraje roli druh kosti samotné, rozdíly mezi dlouhými, krátkými a plochými kostmi byly znát, nejvyšší naměřená koncentrace byla u všech tří vybraných prvků u stejné kosti, nejdelší kosti v těle, femur. Dále bylo prokázáno, že kosti tvoří hlavní základnu pro vápník a fosfor a jejich hodnoty byly mnohonásobně vyšší než koncentrace třetího sledovaného prvku hořčíku.

Dále bylo ověřeno, že použitá metoda hmotnostního spektrometru byla vhodnou metodou pro stanovení všech nám vybraných prvků. Tato metoda má vhodnou citlivost a umožňuje detekovat současně vícero prvků.

V rámci oborového zaměření autorky (medicinální chemie) byl zvolen cíl zhodnotit důležitost vybraných prvků v lidském organismu a sepsat využití obecně hmotnostní spektrometrie v lékařství. V této části byla pozornost zaměřena na využití hmotnostního spektrometru v klinické praxi, kdy bylo rešerší dokázáno, že hmotnostní spektrometrie se používá v mnoha případech v lékařství, ať už při metabolických onemocnění, alergických reakcí či nebo např. v toxikologii. I samotná metoda ICP-MS je celkově využívána v mnoha oblastech klinického použití a přispívá k vyřešení mnoha diagnostických problémů.

6 Literatura

- (1) Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK: *Metabolismus vápníku a fosforu* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5624/kost-teorievseobecni-1617-aktualizace-20212022-prijate-zmeny-opr.pdf>> [cit. 2.12.2023].
- (2) Osteokalcin (OC) [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.vaselaboratore.cz/seznam-vysetreni/imunochemie/item/osteokalcin-oc>> [cit. 4.12.2023].
- (3) Shaban, S. M.; Byeok Jo, S.; Hafez, E.; Ho Cho, J.; Kim, D.-H.: A Comprehensive Overview on Alkaline Phosphatase Targeting and Reporting Assays. *Coordination Chemistry Reviews* 2022, 465, 214567 [on-line]. Dostupné z URL: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214567>> [cit. 4.12.2023].
- (4) Wu, G.; Bazer, F. W.; Burghardt, R. C.; Johnson, G. A.; Kim, S. W.; Knabe, D. A.; Li, P.; Li, X.; McKnight, J. R.; Satterfield, M. C.; Spencer, T. E.: Proline and Hydroxyproline Metabolism: Implications for Animal and Human Nutrition. *Amino Acids* 2011, 40 (4), 1053–1063 [on-line]. Dostupné z URL: <<https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z>> [cit. 4.12.2023]
- (5) Osteoporosis – Symptoms and Causes [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.pennmedicine.org/for-patients-and-visitors/patient-information/conditions-treated-a-to-z/osteoporosis>> [cit. 7.12.2023]
- (6) Endokrinologický ústav 1. LF UK, Cirmanová, Mud. V.: *Možnosti pozitivního ovlivnění kostní hmoty u dětí, současný pohled na křivice* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2014/05/08.pdf>> [cit. 7.12.2023]
- (7) Lofthouse, M. A: *Single Infusion of Zoledronic Acid Is Safe and Effective for the Treatment of Paget's Disease* [on-line]. 2005. Dostupné z URL: <<https://doi.org/10.1038/ncpendmet0036>> [cit. 7.12.2023]
- (8) Paget's disease of bone [on-line]. Dostupné z URL <[nhs.uk. https://www.nhs.uk/conditions/pagets-disease-bone/](https://www.nhs.uk/conditions/pagets-disease-bone/)> [cit. 8.12.2023]
- (9) Němec, I.; Smrčka, V.; Mihaljevic, M.; Mazánek, J.; Pokorný, J.: *Multielemental Chemical Analysis of Elements in Mandibular Bone and Teeth in the Rat. Folia Biol (Praha)* [on-line]. 2018. Dostupné z URL: <<https://fb.cuni.cz/file/5872/fb2018a0012.pdf>> [cit. 8.12.2023]
- (10) Helliwell, T. R.; Kelly, S. A.; Walsh, H. P. J.; Klenerman, L.; Haines, J.; Clark, R.; Roberts, N. B.: *Elemental Analysis of Femoral Bone from Patients with Fractured Neck of Femur or Osteoarthritis Bone* [on-line]. 1996. Dostupné z URL:

<[https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00440-8](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00440-8)> [cit. 10.12.2023]

(11) Allmäe, R.; Limbo, J.; Heapost, L.; Verš, E.: *The Content of Chemical Elements in Archeological Human Bones as a Source of Nutrition Research* [on-line]. *Papers On Anthropology*, 2012. Dostupné z URL: <<https://doi.org/10.12697/issn1406-0140>> [cit. 10.12.2023]

(12) Silvie Čížková: *Hořčík a jeho význam ve výživě* [on-line]. 2009 Masarykova Univerzita v Brně, Dostupné z URL: <https://is.muni.cz/th/213994/lf_b/Horcik_a_jeho_vyznam_ve_vyzive.pdf> [cit. 10.5.2023]

(13) Aldersey-Williams, H.: *Periodic Tales: A Cultural History of the Elements, from Arsenic to Zinc*, 1st ed.; Ecco: New York, 2011.

(14) Harvard T.H. Chan: *Calcium* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/calcium/>> [cit. 10.12.2023]

(15) Fernandez Lahore, R. G.; Pampaloni, N. P.; Peter, E.; Heim, M.-M.; Tillert, L.; Vierock, J.; Oppermann, J.; Walther, J.; Schmitz, D.; Oswald, D.; Plested, A. J. R.; Rost, B. R.; Hegemann, P.: *Calcium-Permeable Channelrhodopsins for the Photocontrol of Calcium Signalling* [on-line]. 2022. Dostupné z URL: <<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35373-4>> [cit. 10.3.2023]

(16) Harvard T.H. Chan: *Phosphorus* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/phosphorus/>> [cit. 10.12.2023]

(17) State of the planet: *Phosphorus: Essential to Life—Are We Running Out?* [on-line]. 2013. Dostupné z URL: <<https://news.climate.columbia.edu/2013/04/01/phosphorus-essential-to-life-are-we-running-out/>> [cit. 10.12.2023]

(18) Delta scientific laboratory produkt: *speedwave XPERT Microwave Innovative Technology for Reliable Digestion* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.delta-sci.com/products/speedwave-xpert-berghof-microwave-digestion>> [cit. 10.12.2023].

(19) Britannica: *Mass spectrometry - Ion-velocity spectrometers* [on-line] Dostupné z URL: <<https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>> [cit. 10.12.2023].

(20) Lionakis: *Caltech Mass Spectrometry Research Lab* [on-line]. Dostupné z URL: <https://www.lionakis.com/projects/mass_spectrometry_research_lab/> [cit. 5.1.2023].

(21) Cibiček, N.: *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2019/07/Cibicek-Vacek-OI-2014.pdf>> [cit. 10.12.2023].

(22) Mayo Clinic: *Metabolic syndrome – Symptoms and causes* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/metabolic-syndrome/symptoms-causes/syc->

20351916> [cit. 7.3.2023].

(23) Špičák, V.; Panzner, P.: *Alergologie*, 1. vyd.; Galén: Karolinum: Praha, 2004.

(24) National Institute of Environmental Health Sciences: *Toxicology* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/science/toxicology/index.cfm>> [cit. 3.9.2023].

(25) Julkunen, H.; Cichońska, A.; Tiainen, M.; Koskela, H.; Nybo, K.; Mäkelä, V.; Nokso-Koivisto, J.; Kristiansson, K.; Perola, M.; Salomaa, V.; Jousilahti, P.; Lundqvist, A.; Kangas, A. J.; Soininen, P.; Barrett, J. C.; Würtz, P.: *Atlas of Plasma NMR Biomarkers for Health and Diseases* [on-line]. 2023. Dostupné z URL: <<https://doi.org/10.1038/s41467-023-36231-7>> [cit. 3.9.2023].

(26) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.: *Analytická chemie*, Vydání: první.; Nesměrák, K., Červený, V., Křížek, T., Nováková, E., Translators; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2019.

(27) Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P. *Spektrometrické analytické metody I*, 2. vyd.; Karolinum: Praha, 2004.