

ABSTRAKT

Extrakce na pevnou fázi (SPE) představuje účinnou, spolehlivou a selektivní moderní metodu pro úpravu vzorku biologického materiálu před chromatografickou analýzou. V diplomové práci byla vyvinuta nová metoda SPE pro izolaci vitamínu D₂ (ergokalciferol), D₃ (cholecalciferol) a metabolitu 25-(OH)D₃ (kalcidiol) z lidského séra současně s vitaminy A (retinol) a E (α-tokoferol). Jednotlivé vitamíny byly následně stanoveny již vyvinutou a validovanou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Vyvinutý postup SPE:

Do skleněné zkumavky napipetujeme 250 µl séra a přidáme 1000 µl ethanolu o teplotě 4°C. Vzorek protřepeme a necháme 10 minut deproteinovat v chladničce při teplotě 4°C, poté zcentrifugujeme (4 000 x g, 15 minut, 4°C). Opatrně odebereme supernatant a nanese na předem připravenou SPE kolonku (promytí 1 ml methanolu následně 1 ml destilované vody). Během těchto dvou kroků nesmí dojít k vyschnutí sorbentu kolonky. Vitamíny eluujeme 1,5 ml methanolu a následně 2 ml hexanu. Eluát odpaříme v koncentrátoru při teplotě 45°C. Odparek rozpustíme v 250 µl methanolu a analyzujeme již vyvinutou HPLC metodou.

Optimalizovaná HPLC metoda:

Mobilní fáze - A: methanol:voda:2-propanol (75:15:10) 3,0 ml/min, 0.-3. minuta, B: methanol:voda (95:5) 3,5 ml/min, 3.- 6,5. minuta; kolona - monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm + SpeedROD RP-18e, 50 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo); doba analýzy 6, 5 minut, objem nástřiku vzorku- 20 µl; detekce - 25-(OH)D₃, D₂, D₃: 264 nm, retinol: 325 nm, α-tokoferol: 295 nm, vnitřní standard tokol: 295 nm.

Nově vyvinutá metoda SPE pro současné stanovení cholecalciferolu, ergokalciferolu, kalcidiolu, retinolu a α-tokoferolu v lidském séru přispěje ke zlepšení diagnostických možností u pacientů s poruchami ledvinných funkcí, osteoporózou a také u onkologických pacientů ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.