

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Extrakce na tuhou fázi a její miniaturizace
metodou Lab-On-Valve**

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Bc. Eva Krchňáková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

13. 5. 2011

Touto cestou bych chtěla poděkovat PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za pomoc, trpělivost a velkou ochotu při realizaci práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Eva Krchňáková

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název diplomové práce: Extrakce na tuhou fázi a její miniaturizace metodou Lab-On-Valve.

Diplomová práce se zabývá možností automatizovat extrakci na tuhou fázi (SPE) ve spojení s mikročasticovou analýzou (BI). Cílem práce bylo vyzkoušet nahrazení mikročastic v mikročasticové analýze sorbentem z SPE, zjistit chování sorbentu v tomto systému a následně ověřit, zda je možné extrakci na tuhou fázi miniaturizovat se všemi kroky, které jsou k provedení metody nutné.

V práci byla manuálně provedena extrakce na tuhou fázi, ve které bylo testováno 7 sorbentů: Lichrolut MERCK RP-18, DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, DSC-PH, DSC-CN a HLB Oasis. Z pokusu vyplynuly nejlepší možné podmínky pro provedení extrakce na tuhou fázi a to: aktivace sorbentu a eluce analytu 100% acetonitrilem, solvatace sorbentu, rozpuštění vitamínu D a vymytí balastu ze sorbentu zředěnou kyselinou octovou o pH 3. Pro systém je nejvhodnější sorbent HLB Oasis od firmy Waters, který je smáčivý s vodou a neměl by se rozptylovat po systému, což bylo po použití sorbentu potvrzeno. Ostatní sorbenty byly pro systém nevhodné z důvodu neschůvivosti s vodou a velké jemnosti sorbentu. Sorbenty byly rozptýleny po systému, dostávaly se do pumpy a pumpu následně ucpávaly. Z toho důvodu nebylo další testování na sorbentech možné a práce byla ukončena.

Další vývoj metody spočíval v převedení stanovených podmínek z manuálně provedené extrakce na tuhou fázi do systému Lab-On-Valve, v programu byly dodrženy všechny fáze obecného postupu extrakce na tuhou fázi. Byl vyvíjen program, ve kterém

byly testovány různé dávkovací objemy, průtokové rychlosti a opakovatelnost plnění kolony.

Zoptimalizovaná metoda byla testována analýzou plazmy naspikované vitamínem D. Po (analýze) extrakci naspikované plazmy mikročasticovou analýzou byla provedena chromatografická analýza metodou sekvenční injekční chromatografie, výtěžnost metody byla 41,07 %. Za optimálních podmínek byla výsledkem práce možnost extrakce nízkých koncentrací vitamínu D z krevní plazmy. Nevýhodou metody byla nízká opakovatelnost analýzy.

Metoda, která se snažila o automatizaci a zrychlení extrakce na tuhou fázi ve spojení s mikročasticovou analýzou byla metodou experimentální. Za stanovených podmínek a za současného provedení je metoda neefektivní. Pro zefektivnění analýzy je potřeba dalšího vývoje metody.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Bc. Eva Krchňáková

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of diploma thesis: Solid phase extraction and its miniaturization by method Lab-On-Valve.

This thesis deals with the ability to automate solid phase extraction (SPE), in connection with the bead injection (BI). The aim was to test the replacement of microparticles in the bead injection with sorbent from SPE cartridges, determine the behavior of sorbent in this system and then determine whether it is possible to miniaturize all the steps of solid phase extraction that are necessary to implement the method.

In the work was done manual solid phase extraction, where were tested seven sorbents: Lichrolut Merck RP-18, DSC-18 DSC-18Lt, DSC-8, PH-DSC, DSC-CN and Oasis HLB. The experiment resulted in the best possible conditions for carrying out solid phase extraction as follows: activation of the sorbent and elution of analyte 100% acetonitrile, solvation of the sorbent, the dissolution of vitamin D and ballast from the sorbent washed with dilute acetic acid of pH 3. Oasis HLB from Waters Company is the most suitable sorbent for the system, which is water-wettable and should not be dispersed by the system, which was confirmed by the use of sorbent. Other sorbents were inappropriate for the system because sorbents were not water-wettable. Sorbents were dispersed system, got into the pump and then pump was clogged. It was reason for stopped the work and other testing of this sorbents was not possible.

Further development of the method consisted in transfer the conditions from manual solid phase extraction to the Lab-On-Valve system, in the program were compliance all phases of the general procedure for solid phase extraction.

In the program were tested various dosing volumes, flow speed and repeatability of column packing.

Optimized method was tested by analysis of blood plasma spiked with vitamin D. After (analysis) extraction of plasma in bead injection was performed sequential injection analysis, recovery of the method was 41.07 %. In the optimal conditions, was result the possibility of extraction of low concentrations of vitamin D in blood plasma. The disadvantage of the method was low repeatability analysis.

The method tried to automate and accelerate the solid phase extraction in combination with the bead injection was experimental. Under defined conditions and in the current implementation of the method is ineffective. For increase efficiency of this analysis is need further method development.

Obsah

Seznam obrázků.....	11
Seznam tabulek.....	13
Seznam zkratek.....	14
1. Úvod a cíl práce.....	16
1.1 Úvod práce.....	17
1.2 Cíl práce.....	18
2. Teoretická část.....	19
2.1 Popis analyzovaných látek.....	20
2.1.1 Vitamin D ₂ (ergokalciferol), vitamin D ₃ (cholecalciferol) a jejich vlastnosti.....	20
2.1.2 Metabolismus vitamínu D.....	21
2.1.3 Účinky vitamínu D.....	22
2.1.4 Metody stanovení vitamínu D a rozmezí hodnot.....	22
2.2 Průtoková injekční analýza (FIA).....	24
2.2.1 Princip metody FIA.....	24
2.2.2 Komponenty a vlastnosti metody FIA.....	25
2.2.3 Aplikace metody FIA.....	26
2.3 Sekvenční injekční analýza (SIA).....	27
2.3.1 Princip metody SIA.....	27
2.3.2 Komponenty metody SIA.....	28
2.3.3 Vlastnosti metody SIA.....	29
2.3.4 Aplikace metody SIA.....	30
2.3.5 Srovnání FIA a SIA systémů.....	30
2.4 Mikročásticová analýza (BI).....	31
2.4.1 Princip metody BI.....	31
2.4.2 Komponenty metody BI.....	31

2.4.3	Vlastnosti a provedení metody BI	34
2.4.4	Aplikace metody BI	36
2.5	Extrakce na tuhou fázi (SPE)	39
2.5.1	Princip SPE	39
2.5.2	Komponenty SPE	40
2.5.3	Obecný postup SPE:	42
2.5.4	Vlastnosti SPE - použití, výhody, nevýhody a aplikace	44
2.6	Použitý materiál při extrakci	46
2.6.1	Krevní sérum	46
2.6.2	Složení krve	46
3.	Praktická část	48
3.1	Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků	49
3.1.1	Použité přístroje a pomůcky	49
3.1.2	Použité chemikálie	49
3.1.3	Příprava roztoků	50
3.1.4	Schéma BI přístroje a popis provedení	52
4.	Vývoj a výsledky metody	54
4.1	Vývoj a optimalizace metody	55
4.1.1	Výběr vhodného sorbentu	55
4.1.2	Vývoj průtokové rychlosti a dávkovaného objemu analytu	57
4.1.3	Vývoj dávkovacího objemu suspenze	58
4.1.4	Vývoj způsobu detekce a vlnové délky	59
4.1.5	Vývoj programu	59
4.2	Výsledky analýzy vitamínu D ₂ a D ₃	61
4.2.1	Opakovatelnost analýzy	64
4.2.2	Stanovení linearitu odezvy	65
4.2.3	Změna dávkování u analýzy vitamínu D ₂	69

4.2.4	Analýza plazmy naspikované vitamínem D ₂	71
4.2.5	Analýza vzorku na SIC	73
4.2.6	Stanovení výtěžnosti metody	76
5.	Diskuze	77
6.	Závěr	79
7.	Literatura.....	82

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Vzorec ergokalciferolu (vitaminu D ₂).	20
Obrázek č. 2: Vzorec cholekalciferolu (vitaminu D ₃).	21
Obrázek č. 3: Princip metody FIA.	24
Obrázek č. 4: Schéma FIA analyzátoru.	25
Obrázek č. 5: Princip metody SIA.	27
Obrázek č. 6: Schéma SIA analyzátoru.	28
Obrázek č. 7: Schéma BI analyzátoru.	32
Obrázek č. 8: Průběh bioligandové interakční metody.	37
Obrázek č. 9: DNA metoda.	37
Obrázek č. 10: Popis SPE kolonky.	40
Obrázek č. 11: Extrakční disk.	41
Obrázek č. 12: Obecný postup provedení SPE.	44
Obrázek č. 13: Schéma přístroje používaného v diplomové práci.	52
Obrázek č. 14: Ovlivnění analýzy vitaminu D ₂ pH nosného proudu.	57
Obrázek č. 15: Průběh analýzy vitaminu D ₂ .	61
Obrázek č. 16: Analýza vitaminu D ₂ včetně analýzy blanku.	62
Obrázek č. 17: Analýza vitaminu D ₃ .	63
Obrázek č. 18: Současná analýza vitaminu D ₂ a D ₃ .	64
Obrázek č. 19: Opakovatelnost analýzy vitaminu D ₂ .	64
Obrázek č. 20: Roztoky vitaminu D ₂ s postupně se snižující koncentrací.	65
Obrázek č. 21: Kalibrační křivka vitaminu D ₂ .	66
Obrázek č. 22: Roztoky vitaminu D ₂ s nižší koncentrací.	66

Obrázek č. 23: Kalibrační křivka roztoků s nízkými koncentracemi vitamínu D ₂ .	67
Obrázek č. 24: Roztoky vitamínu D ₃ s postupně se snižující koncentrací.	68
Obrázek č. 25: Kalibrační křivka vitamínu D ₃ .	68
Obrázek č. 26: Změna objemu dávkování 5 µM pracovního roztoku standardu D ₂ .	69
Obrázek č. 27: Změna objemu dávkování 2,5 µM pracovního roztoku standardu vitamínu D ₂ .	70
Obrázek č. 28: Dávkování 100 µl 25 µM roztoku a 500 µl 5 µM roztoku vitamínu D ₂ .	71
Obrázek č. 29: Analýza 50 µM naspikované plazmy vitamínem D ₂ .	72
Obrázek č. 30: Porovnání blanku a 50 µM naspikované plazmy vitamínem D ₂ .	72
Obrázek č. 31: Srovnání odezvy analýzy standardu a naspikované plazmy.	73
Obrázek č. 32: Podrobná analýza 50 µM naspikované plazmy vitamínem D ₂ .	74
Obrázek č. 33: Zobrazení píku vitamínu D ₂ z 50 µM naspikované plazmy.	74
Obrázek č. 34: Podrobná analýza 5 µM naspikované plazmy vitamínem D ₂ .	75
Obrázek č. 35: Zobrazení píku vitamínu D ₂ z 5 µM naspikované plazmy.	75
Obrázek č. 36: Analýza eluovaného standardu na SIC.	76
Obrázek č. 37: Podrobná analýza standardu na SIC.	76

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Charakteristika reverzní fáze.	39
Tabulka č. 2: Pracovní roztoky standardu vitamínu D ₂ .	51
Tabulka č. 3: Pracovní roztoky standardu vitamínu D ₃ .	51
Tabulka č. 4: Pracovní roztoky standardů vitamínu D ₂ a D ₃ .	51
Tabulka č. 5: Zkoušené podmínky manuálně prováděné SPE.	55
Tabulka č. 6: Výsledné podmínky manuálně prováděné SPE.	56
Tabulka č. 7: Stanovení dávkovaného objemu suspenze.	58
Tabulka č. 8: Popis programu č. 1.	60
Tabulka č. 9: Popis programu č. 2.	61
Tabulka č. 10: Změny č. 1 v programu č. 1.	63
Tabulka č. 11: Změny č. 2 v programu č. 1.	64
Tabulka č. 12: Data pro kalibrační křivku vitamínu D ₂ .	65
Tabulka č. 13: Data pro kalibrační křivku (nižší koncentrace) vitamínu D ₂ .	67
Tabulka č. 14: Data pro kalibrační křivku vitamínu D ₃ .	68
Tabulka č. 15: Změny č. 3 v programu č. 1.	69
Tabulka č. 16: Změny č. 4 v programu č. 1.	71
Tabulka č. 17: Změna v programu č. 2.	75

Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie (Atomic Absorption Spectrometry)
BI	mikročástečková analýza (Bead Injection)
BIA	bioligandová interakční metoda (Bioligand Interaction Assay)
BIS	spektroskopie mikročástečkové analýzy (Bead Injection Spectroscopy)
BMD	hustota kostních minerálů (Bone Mineral Density)
DSC	Discovery - registrovaná ochranná známka společnosti Sigma-Aldrich
ELISA	enzymová imunoanalýza (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ETAAS	elektrotermální atomová absorpční spektrometrie (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
HLB	hydrofilně-lipofilně vyvážený (Hydrophilic-Lipophilic Balance)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
ISE	iontově selektivní elektrody (ion selective electrodes)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid Liquid Extraction)
LOV	laboratoř na ventilu (Lab-On-Valve)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NIR	blízké infračervené záření (Near Infrared light)
PP	polypropylen
RIA	radioimunologická analýza (RadioImmuno Assay)
RP	reverzní fáze (Reversed Phase)
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)

SIC	sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography)
SMPE	mikroextrakce pevnou fází (Solid Phase MicroExtraction)
SPE	extrakce na tuhou fází (Solid Phase Extraction)
UV	ultrafialové spektrum (UltraViolet Spectrum)
VIS	viditelné spektrum (Visible Spectrum)

1. Úvod a cíl práce

1.1 Úvod práce

Laboratorní vyšetření se skládá z části preanalytické, analytické a postanalytické. V klinických laboratořích byl vždy kladen velký důraz na všechny tři části analýzy, ale nikdy se nepřikládala taková váha části preanalytické jako v poslední době. V současné době probíhají v preanalytické fázi změny nejen v oblasti odběru vzorku a informování pacienta o vhodném chování před odběrem, ale také ve vymýšlení nových metod úpravy vzorku předcházející samotné analýze. Jsou hledány efektivní, rychlé, nenáročné a levné způsoby úpravy vzorku.

Jednou z nejčastějších a nejvhodnějších používaných metod pro úpravu vzorku je extrakce na tuhou fázi (SPE), která umožňuje odstranit z plazmy nežádoucí látky od sledovaných analytů. Velkou výhodou SPE je práce s malými objemy činidel a přijatelná finanční dostupnost.

Mikročástečková analýza (BI) je dalším vývojovým stupněm průtokových technik. BI je metodou, která se využívá hlavně v experimentální oblasti. Hlavní výhodou metody je její miniaturizace, nízká spotřeba rozpouštědel a z toho plynoucí malé množství odpadních látek. Nespornou výhodou metody je rychlost analýzy a automatizace. Zmíněné vlastnosti dělají metodu BI oproti jiným metodám velice zajímavou. Nevýhodou, která brání širokému použití metody BI je relativní složitost pochopení a provedení analýzy.

Jelikož mají obě metody velké množství výhod, nabízí se vyzkoušet spojení metod a ověřit, zda při vzájemném propojení zmíněné výhody metod přetrvávají nebo budou pohlceny náročností spojení. Diplomová práce se proto zabývá možností automatizovat metodu SPE ve spojení s metodou BI.

Téma práce mě velice zaujalo, pokud by bylo spojení metod úspěšné, vznikla by ojedinělá metoda pro úpravu vzorků před analýzou. Úprava vzorků by se nejen zjednodušila a usnadnila, ale zároveň výrazně urychlila.

1.2 Cíl práce

Cílem práce bylo vyzkoušet nahrazení mikročástic v metodě BI sorbentem z SPE kolonek a následně zjistit chování sorbentu v tomto systému a ověřit, zda je možné metodu SPE miniaturizovat se všemi kroky, které jsou k provedení metody SPE nutné. Cílem práce bylo ověřit, zda je spojení metody SPE s metodou BI vůbec technicky možné.

Dalším cílem práce bylo vyzkoušet analýzu vitamínu D touto metodou a dále také vyzkoušet chování metody při aplikaci plazmy naspikované vitamínem D. Aplikace naspikované plazmy by měla nastínit chování analýzy při analýze vzorku lidské plazmy.

Posledním cílem práce bylo objektivně zhodnotit, zda je metoda přínosná nebo je natolik problematická, že pro danou problematiku není vhodná.

2. Teoretická část

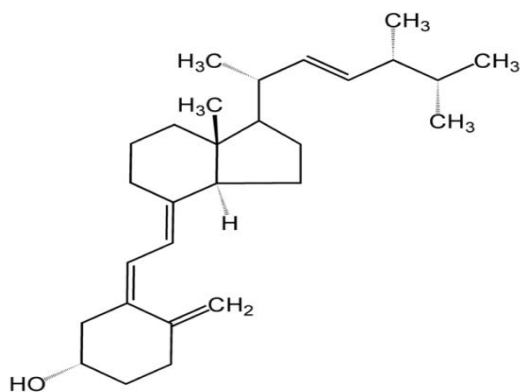
2.1 Popis analyzovaných látek

2.1.1 Vitamin D₂ (ergokalciferol), vitamin D₃ (cholecalciferol) a jejich vlastnosti

Vitamin D je označení pro komplex látek steroidní povahy rozpustných v tucích, které se spolu s parathormonem a kalcitoninem účastní regulace vápníkové homeostázy. Přírodní vitamin D₃ (cholecalciferol) je prohormon povahy sekosteroidů, který se vytváří v kůži fotochemickými reakcemi (působením ultrafialového záření) ze steroidních provitaminů, především 7-dehydrocholesterolu, vznikajícího v organismu redukcí cholesterolu. Vitamin D₃ (cholecalciferol) i forma obsažená v rostlinách, vitamin D₂ (ergokalciferol), se do organismu dostávají z dietních zdrojů [1]. Potraviny, které obsahují vitamin D, jsou: mořské ryby (sardinky, sledi, makrely, lososi). Menší množství vitaminu D obsahují vejce, maso, mléko a máslo [2]. Obě formy vitaminu D se vstřebávají v tenkém střevě při neporušené absorpci lipidů [3].

Ergokalciferol (vitamin D₂)

Obrázek č. 1: Vzorec ergokalciferolu (vitaminu D₂) [4].



(5Z, 7E, 22E)-9, 10-sekoergosta-5, 7, 10 (19), 22-tetraen-3β-ol [5]

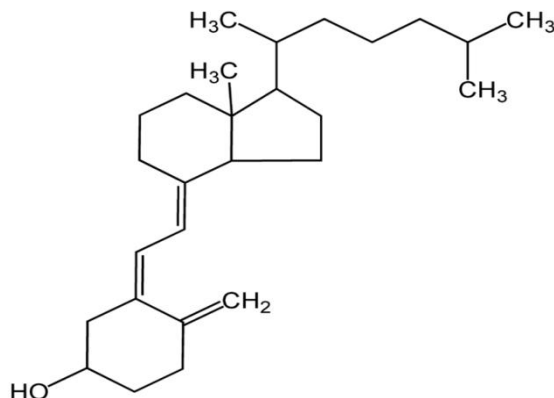
C₂₈H₄₄O M_r 396,65 [5]

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek, bílé nebo téměř bílé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu 96%, dobře rozpustný v mastných olejích. Vlivem vzduchu, tepla a světla se rozkládá. Roztoky v těkavých rozpouštědlech jsou nestabilní a připravují se těsně před použitím. V roztoku dochází

k reverzibilní izomerizaci na pre-ergokalciferol v závislosti na teplotě a času. Účinné jsou obě sloučeniny [5].

Cholekalciferol (vitamin D₃)

Obrázek č 2: Vzorec cholekalciferolu (vitaminu D₃) [6].



(5Z, 7E)-9, 10-sekokocholesta-5, 7, 10 (19)-trien-3β-ol [5].

C₂₇H₄₄O M_r 384,64 [5].

Bílé nebo téměř bílé krystaly. Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu 96%, dobře rozpustný v trimethylpentanu a v mastných olejích. Je citlivý na vzduch, teplo a světlo. Roztoky v rozpouštědlech bez antioxidačních látek jsou nestálé a připravují se těsně před použitím. V roztoku dochází k reverzibilní izomerii na pre-cholekalciferol v závislosti na teplotě a času. Účinné jsou obě sloučeniny [5].

2.1.2 Metabolismus vitamínu D

Jak exo-, tak endogenní vitamin D musí být v organismu dále přeměněn na aktivní formu, a to dvojitou hydroxylací. Hydroxylace v poloze 25 probíhá v játrech; z cholekalciferolu tak vzniká 25-hydroxycholekalciferol neboli kalcidiol. Ten je potom hydroxylován v poloze 1 v ledvinách a teprve vzniklý 1,25-dihydroxycholekalciferol (kalcitriol) stimuluje ve sliznici tenkého střeva syntézu specifického proteinu, nutného pro vazbu a absorpci vápníku. Hydroxylace v poloze 1 nastává při hypokalcémii, která aktivuje enzym 1α-hydroxylázu. Je-li plazmatická koncentrace Ca²⁺ normální nebo dokonce zvýšená, probíhá v ledvinách alternativní metabolický pochod – hydroxylace na 24. uhlíku; vzniklý 24,25-dihydroxyderivát vitamínu D má výrazně menší biologickou účinnost [3].

Tyto látky vzhledem k biosyntéze v organismu nevyhovují definici vitamínu a plní již úlohu hormonů, ze zvyklostních důvodů se však i nadále užívá označení vitamin [1].

2.1.3 Účinky vitamínu D

Vitamin D hraje významnou úlohu v homeostáze vápníku a fosfátů, jeho úkolem je udržovat koncentraci vápníku v extracelulárním prostoru. V první řadě zvyšuje vstřebávání vápníku a fosfátů ze střeva; nejúčinnější v tomto směru je kalcitriol, který zvyšuje transport vápníku přes intestinální sliznici jednak indukci nových proteinů (calcium-binding protein), jednak urychlením prostupu vápníku přes membrány kartáčového lemu a mitochondriálních membrán [1].

Vitamin D mobilizuje vápník uložený v kostech a snižuje jeho exkreci v ledvinách tím, že zvyšuje reabsorpci vápníku v tubulech. Pro účinek v kostní tkáni se nejvíce využívají aktivní metabolity vitamínu D, jejich cílovými buňkami jsou osteoklasty, ve vyšších dávkách i osteoblasty. Hlavním účinkem je urychlení maturace osteoklastů a nepřímá stimulace jejich aktivity. Snižuje se také syntéza kolagenu v osteoblastech. Deriváty vitamínu D mají i imunomodulační vlastnosti a podporují proliferaci některých linií imunokompetentních buněk [1].

Nežádoucí účinky až toxicita vitamínu D se projevují především při předávkování a jsou důsledkem hyperkalcémie a hypofosfatémie. Hlavními příznaky jsou gastrointestinální obtíže (nechutenství, zvracení, zácpa, spastické bolesti v břiše), porucha renálních funkcí v důsledku nefrolitiázy, nefrokalcinózy a lokalizované nebo generalizované snížení kostní denzity [1].

Při nedostatku vitamínu D dochází k hypokalcémii, která se projeví poruchou mineralizace osteoidu kostí (osteomalacie) u dospělých, v dětství i kostními deformitami (rachitida, křivice) [3].

2.1.4 Metody stanovení vitamínu D a rozmezí hodnot

Ke zjišťování krevních hodnot vitamínu D se běžně užívá stanovení jaterního metabolitu 25-hydroxycholekalCIFerolu [7] (hlavní zásobní forma vitamínu D v těle, biologický poločas v krvi je cca 3 týdny [8]). Metabolit 1,25-dihydroxycholekalCIFerol se nepoužívá, protože může i při nízké hodnotě 25-hydroxycholekalCIFerolu zůstat v normálním rozmezí. Je to důsledek zvýšené sekrece parathormonu při poklesu absorpce kalcia ve střevě, čímž se zvýší tvorba 1,25-dihydroxycholekalCIFerolu. Kromě

toho může zvýšená koncentrace parathormonu zvýšit kostní resorpci a snížit BMD (bone mineral density) [7]. Důvodem je i o 3 řády nižší koncentrace 1,25-dihydroxycholecalciferolu a tudíž větší problémy analytické. Navíc má 1,25-dihydroxycholecalciferol velmi krátký biologický poločas) [9]. Více jak 95 % 25-hydroxycholecalciferolu měřeného v séru tvoří 25-hydroxycholecalciferol vitamínu D₃, zatímco 25-hydroxycholecalciferol vitamínu D₂ dosahuje měřitelných hladin jen u pacientů se suplementací vitamínem D₂ [8].

Vyšetření 25-hydroxycholecalciferolu

Nízké hodnoty tohoto testu mohou znamenat nedostatečný přísun vitamínu D potravou, vyhýbání se slunci nebo je problém ve vstřebávání vitamínu střevem. Snížovat hladinu 25-hydroxycholecalciferolu mohou i některé užívané léky (zejména na bázi fenytoinu), které mohou ovlivnit syntézu 25-hydroxycholecalciferolu v játrech. Vysoká úroveň 25-hydroxycholecalciferolu obvykle znamená předávkování vitamínu z vitaminových zdrojů [10].

Vyšetření 1,25-dihydroxycholecalciferolu

Nízké hladiny 1,25-dihydroxycholecalciferolu lze pozorovat u onemocnění ledvin a je to jeden z prvních příznaků u předčasného selhání ledvin. Vysoká koncentrace 1,25-dihydroxycholecalciferolu se může objevit u některých onemocnění jako je sarkoidóza nebo některé typy lymfomů, které pak mohou produkovat 1,25-dihydroxycholecalciferol i mimo ledviny [10].

Normální laboratorní hodnoty 25-hydroxycholecalciferolu v séru:

Doporučená hladina: 60 –200 nmol/l (24 – 80 ng/ml)

Mírná insuficience: 25 –60 nmol/l (10 – 24 ng/ml)

Středně těžká insuficience: 12,5 – 25 nmol/l (5 – 10 ng/ml)

Těžká insuficience: < 12,5 nmol/l (< 5 ng/ml)

Toxické hladiny: > 500 nmol/l (> 200 ng/ml) [8].

Metody stanovení: RIA, HPLC, ELISA [8].

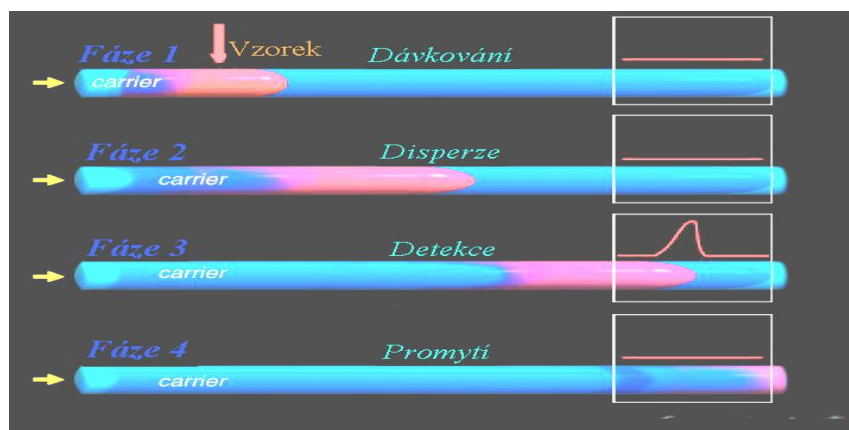
2.2 Průtoková injekční analýza (FIA)

2.2.1 Princip metody FIA

FIA je první generace průtokových technik [13], je to analytická metoda s plynulým tokem všech roztoků založená na dávkování vzorku do proudu činidel [12]. Malé objemy vzorku jsou postupně dávkovány do proudu činidla pomocí dávkovacího ventilu s vyměnitelnou smyčkou [14]. Rozsah míchání a délka reakčního času je kontrolována průtokovou rychlostí, objemem a geometrií kanálu [13].

V nejjednodušší formě je zóna vzorku dávkována do tekoucího nosného proudu činidla. Jak se vstříknutá zóna pohybuje po proudu, nastává disperze vzorku do činidla a začíná se formovat reakční produkt na rozhraní mezi zónou vzorku a zónou činidla. Detektor umístěný na konci proudu zaznamenává intenzitu zbarvení nebo jiný parametr měnící se díky průchodu derivatizovaného produktu přes průtokovou celu. Detektor odečítá výsledky obou procesů, které probíhají současně: disperzi vzorku a následující chemickou reakci [13]. Výsledkem analýzy jsou za sebou jdoucí píky [12].

Obrázek č. 3: Princip metody FIA [12].

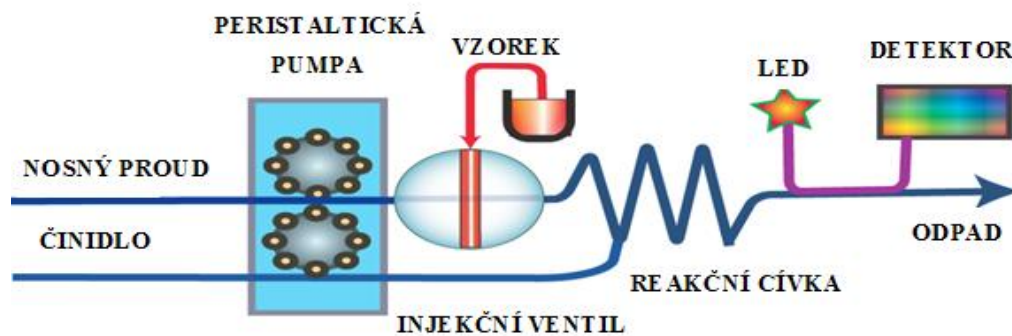


Vzorek je při průchodu vedením (hadičkou) rozmýván v nosném proudu činidel a vytváří se koncentrační gradient. Kontrolovaná disperze je základní charakteristikou metody FIA [12]. Při měření v režimu FIA není dosaženo ustáleného (rovnovážného) stavu. Homogenní míchání činidel a dosažení chemické rovnováhy zde není nezbytné, avšak vlastní měření musí být vždy provedeno za stejných experimentálních podmínek. Většinou se vlastní měření provádí po předchozím uskutečnění chemické reakce v průtokovém reaktoru [14].

2.2.2 Komponenty a vlastnosti metody FIA

Měření v režimu FIA může být zcela automatizováno, náklady na provedení analýzy jsou nízké [14]. Touto cestou mohou běžné laboratoře změřit až 360 vzorků za hodinu [13].

Obrázek č. 4: Schéma FIA analyzátoru [13].



Základní schéma FIA systému:

1. čerpadlo – peristaltická pumpa
 - průtoková rychlost cca 0,5 – 1,0 ml/min [13]
2. dávkovací systém
 - dávkovací nízkotlaký vícecestný ventil se smyčkou daného objemu [12] (10 – 100 μ l) [14]
3. hadičky o průměru 0,5 – 1 mm z teflonu [12]
4. reakční zóna
 - průtokové reaktory: dlouhé přímé trubice, reakční cívky, mísící komůrky, koráلكové reaktory, uzlové reaktory [14]
 - v analytické praxi se používají velmi často reaktory typu reakčních cívek [14]
5. světelný zdroj
 - LED (270 - 810 nm) [13]
 - Tungsten (Deuterium, Halogen) D-2000 deuteriová lampa pro UV (215-400 nm), DH-2000 deuteriová a halogenová lampa pro UV/VIS/NIR (190 – 800+ nm) [15]
6. průtoková cela o délce 0,01 – 50 cm [13]
7. detektor

- mezi detektory využívající optické vlastnosti látek patří: spektrofotometrické, citlivější fluorimetrické, detektory využívající chemiluminiscenci, detektory refraktometrické, dále také AAS [12] a MS [13]
 - z elektrochemických detektorů lze použít potenciometrické (ISE), amperometrické, konduktometrické nebo coulometrické detektory [14]
8. software (LabVIEW) [13].

Do FIA aparatury může být zařazena kolonka s iontoměničem, extrakční, dialyzační nebo prekoncentrační jednotka [14].

2.2.3 Aplikace metody FIA

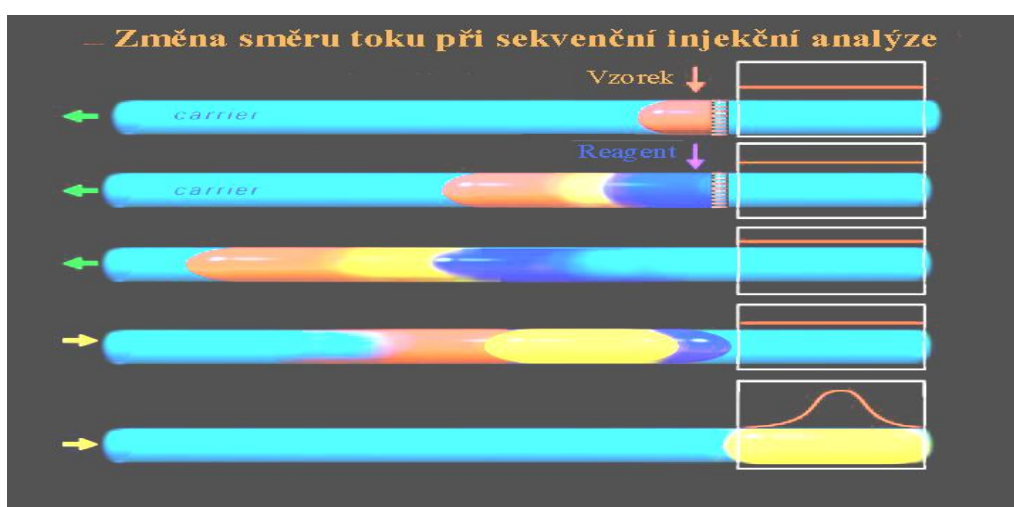
Tradiční FIA je vyspělá technika, která má široký rozsah aplikací. Hlavní oblasti využití metody jsou v zemědělství a v životním prostředí. Analýzy vody, půdy a hnojiva, které mohou být znečištěné čpavkem, dusičnany, dusitany, fosfáty, chloridy, železem, chromem (IV a VI) a kyanidy, jsou metodou FIA běžně prováděny. Další užití je například ve farmaceutické analýze nebo také výzkumná činnost v oblasti biochemie (enzymová kinetika) [13].

2.3 Sekvenční injekční analýza (SIA)

2.3.1 Princip metody SIA

SIA je druhá generace průtokových technik, je to univerzální metoda zakládající se na programovatelném průtoku. Vzorek a činidlo jsou dávkovány postupně pomocí vícecestného ventilu do nosného proudu. Jak se reakční produkt začíná formovat na rozhraní zón vzorku a činidla, aplikuje se zpětný tok, který podporuje míchání a transport reakční směsi do detektoru (pro monitorování) [13].

Obrázek č. 5: Princip metody SIA [11].

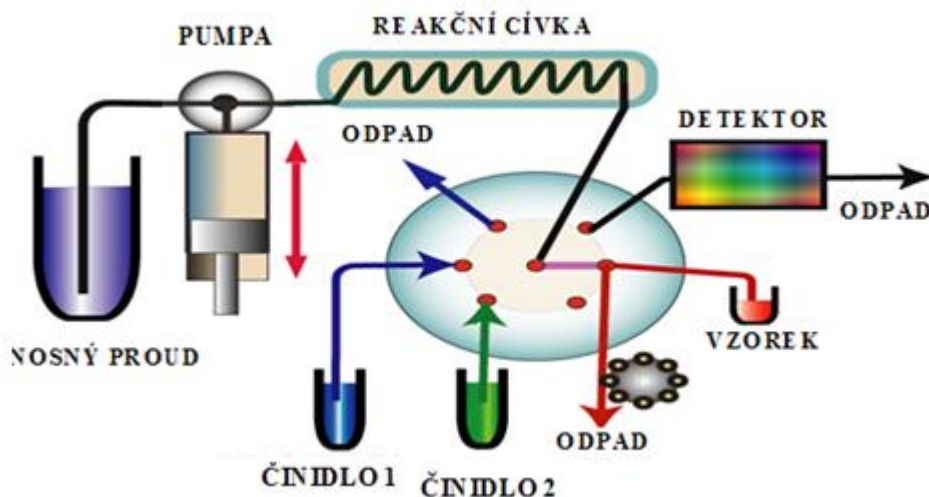


Na začátku experimentu je pístová pumpa naplněna pouze nosným proudem (voda, tlumivý roztok, organické rozpouštědlo). Následovně je selekční ventil nasměrován k postupnému dávkování vzorku a činidla, dále dochází k obrácení toku nosného proudu a dojde k promíchání zón vzorku a činidla. Vniklý produkt je unášen do detektoru a zaznamenává se analytický signál ve tvaru píku. Při změně schématu dávkovaných chemikálií (jiné analytické stanovení) není nutný zásah do konstrukce aparatury (jako v režimu FIA), ale stačí pouze změnit průtokový program. Různé pozice selekčního ventilu mohou být při práci v režimu SIA využity k zavádění kalibračních standardů. Pro zoptimalizování funkce SIA aparatury je potřeba správně popsat a charakterizovat procesy ovlivňující prolínání zón vzorku a činidla. Překryv zóny vzorku a činidla představuje prostor, kde dochází k chemické reakci, jejíž produkty se detekují. Zvýšení překryvu zóny vzorku a zóny činidla se projeví ve větší citlivosti stanovení [14].

2.3.2 Komponenty metody SIA

Vícecestný ventil je středem systému SIA. Centrální vstup je spojen s vysoce přesnou pumpou poháněnou krokovým motorem [13].

Obrázek č. 6: Schéma SIA analyzátoru [13].



1. čerpadlo (mikropístová pumpa)
 - tok kapaliny poskytovaný pumpou by měl být přesně definovaný a reprodukovatelný
 - pumpa musí být schopna čerpat roztoky v obou směrech
 - pumpa musí umožňovat práci s malými objemy kapalin
 - pumpa je ovladatelná pomocí počítače [14]
2. dávkovací systém - vícecestný selekční ventil
 - ventil musí umožňovat libovolné kombinace nasávání roztoků z jednotlivých pozic
 - žádoucí je nulová kontaminace nasávaných roztoků roztoky nasávanými v předchozí fázi experimentu
 - existují selekční ventily s 6 až 28 vstupy pro vzorky a činidla (obvyklý počet je 10) [14]
3. spojovací hadičky
 - průměr 0,5 mm z teflonu [11]
4. reakční zóna
 - průtokové reaktory: dlouhé přímé trubice, reakční cívky, mísící komůrky, korálkové reaktory, uzlové reaktory [14]

- aparatura může být doplněna vedle reakční cívky o zadržovací cívku („holding coil“) sloužící v součinnosti se selekčním ventilem k zavedení zóny vzorku do aparatury [14]
5. světelný zdroj
 - LED 270 – 810 nm [13]
 - Tungsten (Deuterium, Halogen) D-2000 deuteriová lampa pro UV (215-400 nm), DH-2000 deuteriová a halogenová lampa pro UV/VIS/NIR (190 – 800+ nm) [15]
 6. průtoková cela
 - s optickými vlákny o délce 0,01 – 50 cm [13]
 7. detektor
 - při analytických stanoveních v režimu SIA lze použít stejné detektory jako v režimu FIA
 - spektrofotometrické detektory, které se v praxi používají nejčastěji (UV/VIS, fluorescenční, chemiluminiscenční), elektrochemické (amperometrické, potenciometrické, konduktometrické) detektory [14], dále také MS, AAS [13]
 8. software (FIALab, LABVIEW, FlowTEK) [13].

SIA byla miniaturizována do Lab-On-Valve (laboratoř na ventilu) formátu, kde jsou všechny komponenty (průtoková cela, hadičky a detektory) integrovány do mikrofluidního potrubí namontovaného na vícecestný ventil. Miniaturizovaná SIA slouží také jako základ pro BI a SIC [13].

2.3.3 Vlastnosti metody SIA

SIA představuje automatizovaný přístup ke zpracování vzorku umožňující plně nahradit manuální procesy zahrnuté v tradičních analytických postupech rychlým, přesným a účinným způsobem. Automatizované zpracování vzorků je řízeno počítačem, pracuje se s úzkými zónami vzorků za podmínek kontrolované disperze v úzkých trubičkách [14].

SIA metoda vyžaduje (v mikro SI formátu) velmi malé množství činidel. Hlavní výhodou SIA stanovení je minimální spotřeba vzorku a činidla, snížení generovaného odpadu, kompaktní velikost a programová všestrannost [13]. Metoda SIA se také vyznačuje značnou robustností [14].

U SIA techniky je možné provést změny dávkovaného objemu vzorku od jednotek až po stovky μl programováním a tím optimalizovat disperzi zóny vzorku a citlivost stanovení [11]. Všechny funkce systému – průtoková rychlost, dávkované objemy, pozice ventilu a sběr dat jsou počítačově kontrolovány a programovány. Problémem metody je fakt, že není lékopisná (standardizovaná), což brání jejímu rozšíření do klinických laboratoří [13].

2.3.4 Aplikace metody SIA

SIA je užívána v oblasti životního prostředí (laboratorní analýza vody a půdy znečištěné dusičnany, dusitany, amoniakem a fosfáty), chemického průmyslu (analýza organických syntéz, organických polutantů), farmacie (monitorování in vivo studií), biochemie (enzymová kinetika, inhibice, imunoanalýza), biologie (buněčné studie – receptorové studie, buněčné metabolity), monitorování fermentačních procesů (amoniak, glukosa, glycerol), analýza stopových prvků [13].

2.3.5 Srovnání FIA a SIA systémů

Sekvenční injekční analýza je průtoková analytická metoda, řešící některé nedostatky průtokové injekční analýzy (FIA). SIA také umožňuje snadnou automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků. Významnými rozdíly techniky sekvenční injekční analýzy a FIA techniky je odlišnost v geometrii nosného toku, kdy FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco SIA využívá změnu přímého a zpětného toku. Tím je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na výsledný produkt. Průtokové rychlosti jsou u FIA a SIA technik podobné [11].

Výhodou SIA techniky oproti FIA je jednokanálové uspořádání s jedním ventilem. Při zastaveném toku je možno provádět i kinetická měření stejně jako u FIA. Protože SIA využívá zastavení a změnu směru toku, jsou spotřeby vzorku a hlavně činidel podstatně nižší než u FIA, kde je čerpání kontinuální. Velkou výhodou SIA je i její flexibilita, daná snadnou změnou parametrů měření [11].

Nedostatky SIA ve srovnání s FIA jsou nižší vzorkovací frekvence a složitější mísení jednotlivých zón [13].

2.4 Mikročasticová analýza (BI)

2.4.1 Princip metody BI

BI je třetí generace průtokových technik. I když byl koncept BI navržen před více než 10 lety, uskutečnilo se mnoho pokusů, než se podařilo navrhnout efektivní a opakovatelnou metodu. Klíčové komponenty úspěšného přístupu byly navrženy v Lab-On-Valve modulu s přesným programováním průtokové rychlosti a daným objemem. Metoda BI otevírá cestu k řadě neprozkoumaných bioanalytických metod [13].

Princip metody č. 1: Činidlo imobilizované na mikročasticích

Tato BI experimentální metoda začíná vstříknutím malého množství suspenze mikročastic obsahující činidlo do nosného proudu. Mikročastice jsou zachyceny a naplněny v dobře definované geometrii – mikrokoloně (objem 2-10 μl). Dále je nadávkován vzorek a transportován po proudu na mikrokolonu. Když zóna vzorku dosáhne naplněné vrstvy mikročastic (mikrokolony), reaktivní skupiny na povrchu mikročastic zadrží molekuly analytu. Jak zóna vzorku protéká mikrokolonou, materiál matrice je vymyt a opustí mikročastice [13].

Princip metody č. 2: Analyt zachycený na mikročasticích

BI experiment začíná injekcí malého množství mikročastic do nosného proudu. Dále je nadávkován vzorek a transportován po proudu, kde mikročastice s vhodným iontoměničem nebo se skupinou C 18 vzorek zadržují. Cílový analyt je zachycen (adsorbován) na povrch mikročastic a součásti matrice jsou vymyty. Dále je vstříknut roztok vhodného chromogenního činidla, a když zóna činidla dosáhne vrstvy mikročastic, analyt reaguje s činidlem, formující druhy reakcí jsou zjistitelné detektorem. Na konec jsou mikročastice odstraněny [13].

2.4.2 Komponenty metody BI

2.4.2.1 Materiály a instrumentace

Velikost, tvar a materiál mikročastic jsou nezbytné vlastnosti, které musí být dodrženy pro BI aplikaci. Částice by měly být sférické o velikosti 20 – 150 μm . Menší částice se obtížněji zachycují a promývají, větší částice mohou být zachyceny

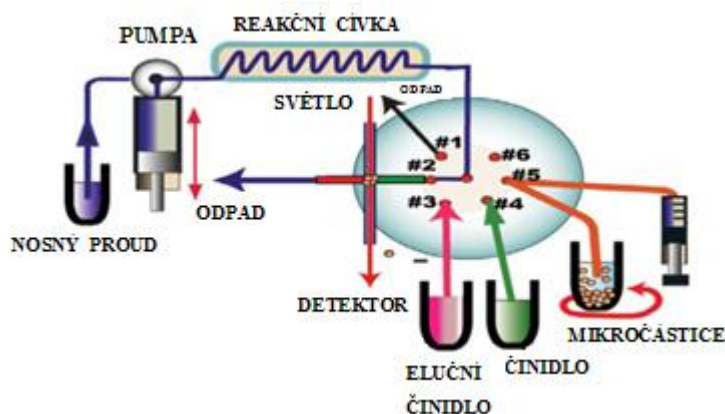
v průtokovém kanálu a vytvořit tzv. „mikročástečkový džem“. Jemné polymery mikročásteček jsou vhodnější, než tuhé, které mohou odřít ventil [13].

Pro BI spektroskopii je dalším požadavkem optická průhlednost. Sephadex a Sepharose mikročástečky jsou ideální pro BI aplikaci, protože plní všechna kritéria, jsou průhledné a mohou být monitorovány UV – VIS i fluorescencí. Sephadex a Sepharose mikročástečky jsou dostupné s širokou variantou funkčních skupin (katexy, anexy, nepolární C 18, protein A, G, avidin a streptavidin) pokryté mikročástečky jsou používány pro analýzu anorganických vzorků, pro zakoncentrování stopových prvků a pro selektivní zachycení biomolekul jako jsou protilátky a antigeny. Cytodex mikročástečky (velice jemné) jsou užívány jako nosiče pro vyšetřování živých buněk zkoumaných fluorescenční mikroskopií. Typické množství zachycených mikročásteček BI spektroskopii je 2 – 10 μl korespondující přibližně s 2 000 až 10 000 mikročásteček. Není nutné, aby velikost mikročásteček byla jednotná, zvláště je-li optika průtokové cely navržena u velkého počtu mikročásteček k integrování odezvy [13].

Počáteční práce u BI byla limitována užitím mikročásteček z agarosy z důvodu její průhlednosti, široké dostupnosti a nízké ceny. Sepharosa je vytvořena ze zesíťovaného, čistého polysacharidu (galaktosy), zatímco Sephadex je vytvořen ze zesíťovaného mikrobiálního polysacharidu (glukózy). Oba typy mikročásteček podporují široké užití pro afinitní chromatografii. Mikročástečky (o velikosti 20 – 180 μm) jsou dostupné s různými stupni zesíťování (4B nebo 6B). Sepharosa 4B mikročástečky jsou více elastické, Sepharosa 6B jsou zase více zesíťované. Tyto vlastnosti se řadí mezi tzv. mechanické [13].

2.4.2.2 Přístrojová konfigurace

Obrázek č. 7: Schéma BI analyzátoru [16].



1. čerpadlo (pístová pumpa)
2. dávkovací systém - vícecestný ventil
3. hadičky vedoucí do ventilu
 - o průměru 0,5 – 0,7 mm z teflonu
 - dávkovací hadička slouží zároveň jako míchadélko, u některých typů mikročástic může být použito i magnetické míchadélko (Dowex a grafitové částice) [13]
4. filtry, frity, „jet ring cell“ → cela s prstencovým/ kruhovým otvorem [13]
5. reakční zóna
 - průtokové reaktory: dlouhé přímé trubice, reakční cívky, mísící komůrky, korálkové reaktory, uzlové reaktory [14]
6. světelný zdroj
 - Cree Xlamp poskytující světlo pro fluorescenční excitaci (470 nm)
 - LED 270 – 810 nm [13]
 - Tungsten (Deuterium, Halogen) D-2000 deuteriová lampa pro UV (215-400 nm), DH-2000 deuteriová a halogenová lampa pro UV/VIS/NIR (190 – 800+ nm) [15]
7. průtoková cela
 - z optických vláken o délce 0,01 – 50 cm
 - fluorescenční spektroskopie užívá pár vláken konfigurovaných v pravém úhlu (mikročástice jsou drženy v místě vertikálním optickým vláknem)
 - současná UV-VIS a fluorescence užívá 3 optická vlákna (vertikální optické vlákno zachycuje mikročástice v místě)
 - BIS kombinována s mikrokolonovou chromatografií užívá 2 páry optických vláken (horní pár monitoruje kolonu, nižší pár monitoruje průtokovou celu, sloupec mikročástic je držen v místě optickým vláknem) [13]
8. detektory
 - spektrofotometrické, MS, AAS, fotonásobiče [13]
 - nejčastěji se používají spektrofotometrické detektory (BIS) [17]
 - používají se také fluorometrické a chemiluminiscenční, voltametrické a atomové fluorescenční spektrometry [17]
9. software

2.4.3 Vlastnosti a provedení metody BI

Hlavní výhodou BI je akumulace cílového analytu na povrchu mikročásteček, zatímco nezadržovaná matrice je odstraněna. Rozšířená citlivost měření a reálný čas monitorování cíle UV-VIS spektroskopii nebo fluorescencí patří mezi důležité funkce. BI technika v LOV formátu je nejenom proveditelná, ale také robustní a spolehlivá. Jedinečnou funkcí BI je automatické obnovení reaktivní pevné fáze, což představuje velkou výhodu. Tato vlastnost je důležitá pro rozvoj nových metod, kde jsou cílové analyty selektivně zachyceny z komplexní matrice a kvantifikovány [13].

Příklad provedení metody BI

Selektivním ventilem pomocí zpětného toku je aspirována suspenze mikročásteček do reakční cívky. Po přepnutí ventilu na jinou pozici, jsou mikročástečky nadávkovány do průtokové cely a jsou zachyceny dutou zástrčkou nebo optickým vláknem. Transport mikročásteček je prováděn mírnou průtokovou rychlostí (50 $\mu\text{l}/\text{sec}$). Následně je dávkována zóna vzorku, která proteče přes mikročástečky mající na povrchu vhodnou funkční skupinu a vzorek zachytí. Pro promývání roztokem vzorku je lepší zvolit pomalou průtokovou rychlost (typicky 1-5 $\mu\text{l}/\text{sec}$). Cílový analyt je zachycen (adsorbován) na povrch kuliček a součásti matrice jsou vymyty. Zadržované molekuly analytu jsou detekovány přímo spektroskopii nebo reagují in situ s vhodnou barvou nebo fluorescenční reagenty. Na konci metody jsou mikročástečky transportovány zpětným tokem na jiné místo nebo jsou odstraněny do odpadu. Odstranění mikročásteček probíhá jak je potřeba nebo na konci každého měřicího cyklu. Byla navržena pestrá nabídka přístupů pro manipulaci a zachycení mikročásteček, přesto byl nakonec navrhnut jednoduchý přístup, který využívá všestrannost programovaného toku a kombinuje přesně navolenou průtokovou rychlost a zpětný průtok pro dávkování, zachycení a promytí mikročásteček [13].

Pro zachycení mikročásteček ve fixní geometrii průtokového kanálu se využívají filtry nebo frity, jestliže se filtry ucpou, rychle selhávají. Mikročástečky mohou být zachyceny celou s prstencovým/kruhovým otvorem, která má vnější průměr menší než je vnitřní průměr kanálu. Typické rozměry jsou: kanál vnitřního průměru 1,63 nm, zátka 1,6 nm, mezera 15 μm , která udrží mikročástečky větší než 40 μm [18]. Otvor umožňuje kapalině projít, zatímco mikročástečky (40 - 150 μM) jsou zachyceny na vrch zátky [13]. Když mají být mikročástečky odstraněny je tok rychle obrácen, síla protiproudu unese mikročástečky na jiné požadované místo nebo do odpadu. Konfigurace cely

s prstencovým/kruhovým otvorem se na rozdíl od frit nebo filtrů mikročasticemi neucpává [18].

Klíč k úspěšnému provedení BI spočívá v:

- dávkování mikročastic a jejich transportu
- zachycení mikročastic a jejich promytí
- monitorování změn optických vlastností mikročastic [13].

U metody BI by měla být splněna následující kritéria:

- dávkování fixního objemu suspenze mikročastic
- mikročastice musí být zachyceny v dráze světla
- mikročastice musí být zachyceny v dobře definované geometrii
- světelný paprsek musí pojmout většinu mikročastic
- na konci měřicího cyklu by měly být všechny mikročastice odstraněny z průtokové cely
- u dávkování mikročastic je nezbytné udržovat dobře rozmíchanou (homogenní) suspenzi, aby nedošlo k ucpání kanálu
- délka vedení mezi míchací nádobkou a LOV by měla být minimalizovaná, aby nedocházelo k nereprodukovatelným výsledkům
- hadička mezi rozmíchanými mikročasticemi a LOV by měla být automaticky naplněna před dávkováním další suspenze mikročastic [13].

Problémy BI metody

- mikročastice mohou ucpat průtokový kanál
- kontrola přesného množství vstříknutých mikročastic je obtížnější
- hustota sloupu zachycených mikročastic není zcela opakovatelná
- ztracené mikročastice mohou být zachyceny v kanálu a mohou způsobit vzájemnou kontaminaci
- sloupec mikročastic nemusí být vždy zcela homogenní
- mikročastice nemusí být úplně odstraněny z průtokové cely
- světelná absorpce mikročasticemi dělá přímé spektroskopické měření nespolehlivým [13].

2.4.4 Aplikace metody BI

Metoda BI se může použít v mnoha odvětvích (vybrané metody budou níže stručně popsány):

Biochemie: bioligandová interakční metoda, DNA metoda, enzymatická metoda, detekce patogenů, mikroafinitní chromatografie.

Analýza životního prostředí: analýza kovů, metoda radio-nuklidů, analýza organických polutantů.

Chemická oceánografie: analýza stopových prvků, živin.

Biologické studie: buněčný metabolismus (spotřeba kyslíku a glukózy, vypuzení laktátu), buněčné receptorové studie (stanovení farmaceutického antagonismu), redoxní procesy v živých buňkách.

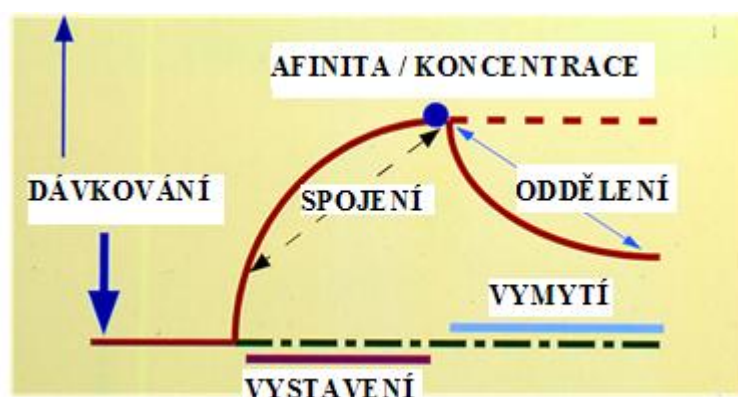
Biotechnologie: imuno-metody, monitorování real-time proteinové imobilizace, [13].

2.4.4.1 Bioligandová interakční metoda

Princip: reakce antigen – protilátka

Bioligandová interakční metoda (BIA) proveditelná na povrchu, který může být automaticky obnoven, poskytuje měření UV – VIS spektra mikročástic Sepharosy, které jsou zachyceny mezi 2 optická vlákna. Nativní proteiny jsou monitorovány UV spektrofotometrií v rozsahu 220 - 280 nm. Kromě toho mohou být označené molekuly monitorovány VIS spektrofotometrií nebo fluorescencí, možné je monitorování nativních a značených molekul současně. U BIA metody je zaznamenána odezva během spojení cílových biomolekul (protilátky) se specifickým bioligandem (antigen) připevněným na povrch mikročástic a při vystavení připevněných biomolekul mycímu pufru. Slabě vázané biomolekuly jsou odděleny (plná čára), zatímco silně vázané zůstanou připevněné (přerušovaná čára) [13].

Obrázek č. 8: Průběh bioligandové interakční metody [13].



2.4.4.2 DNA metoda (neselektivní adsorpce)

Biotinylovaná DNA (na DNA navázán biotin) je zachycena na Streptavidinových mikročásticích pokrytých agarosou a následuje spojení s fluorescenčním barvivem (oligreen) [13].

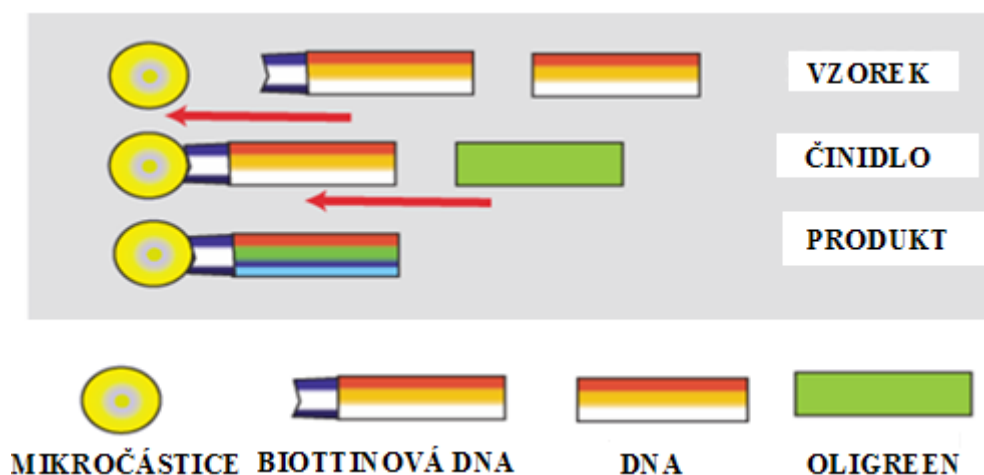
Krok č. 1: Zachycení Streptavidinových mikročástic pokrytých agarosou v průtokové cele.

Krok č. 2: Promytí mikročásticové vrstvy biotinylovanou DNA, následuje promytí zachycené DNA s barvivem.

Krok č. 3: Monitorování DNA fluorescenčním měřením.

Krok č. 4: Odstranění zbytkových kuliček zpětným tokem [13].

Obrázek č. 9: DNA metoda [13].



Cílem této metody je zvýšit možnost stanovení telomerázy, enzymu, který prodlužuje ss-DNA. Zachycení biotinové ss-DNA na mikročástice, zajistí separaci prodloužené biotinové ss-DNA od jiných DNA molekul a akumulaci na mikročásticích. Kuličky s barvivem poskytují citlivou detekci. Detekční limit BI fluorescenčních metod je 111 pg DNA [13].

2.4.4.3 Analýza kovů

Dva rozdílné přístupy: zpopelnění mikročástic, na kterých byl analyt zachycen a určení v ETAAS detektoru, nebo přímá eluce analytu do ETAAS detektoru. Pro stanovení Ni se používají mikročástice Sephadex C-25 katex. Oba způsoby mají přibližně stejné detekční limity 10 ng Ni/l [13].

2.4.4.4 Redoxní procesy v živých buňkách.

Degradace peroxidu vodíku živými buňkami a monitorování intracelulárního peroxidu vodíku [13].

Živé buňky produkují H_2O_2 jako odpověď na buněčný stres. H_2O_2 je pro buňky škodlivý a může hrát roli v buněčné apoptóze a stárnutí. Kataláza je enzym rozkládající H_2O_2 . Jedná se o enzym, který byl navržen jako klíčová komponenta buněčného obranného mechanismu proti oxidativním procesům. Sledování stupně rozložení H_2O_2 živými buňkami voltametričným stanovením v LOV, pomocí rtuťové elektrody [13].

2.4.4.5 Imuno-metody

Značený inzulin a neznačená protilátka

Selektivní separace mikrogramového množství inzulinu z buněčných vzorků provedena užitím inzulinové protilátky, která je zachycena na mikročásticích proteinu A. Pro metodu se užívá fluorescenčně značený inzulin a neznačená inzulinová protilátka. Cílem metody je vytvořit komplex inzulin-protilátka-mikročástice, nejprve vytvoření komplexu protein A + protilátky a následně navázání značeného inzulinu. Dávkování protilátky a následně dávkování značeného inzulinu nemusí vždy vyústit v tvorbu komplexu protilátka – antigen. Eluce komplexu protilátka – inzulin kyselinou je okamžitá [13].

2.5 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

2.5.1 Princip SPE

Extrakce na tuhou fázi je technika přípravy vzorků, jejíž význam neustále roste [19] a během posledních 20 let se SPE stala nejpoužívanější technikou, která je k dispozici pro rychlou a selektivní přípravu vzorku předcházející analytické chromatografii [20]. SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení [19]. SPE rozšiřuje životnost chromatografického systému, zdokonaluje kvalitativní i kvantitativní analýzu [20]. Metoda je rychlá, přesná a reprodukovatelná. SPE umožňuje současné zpracování 12, 24 a 96 vzorků, metodu je možné i automatizovat [19].

SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fázi musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn. Princip sorpce je obdobný jako u kapalinové chromatografie, a také nabídka sorbentů je široká. Nejdůležitějším krokem je volba správného sorbentu [19].

Podle typu sorbentu v kolonce rozdělujeme SPE na normální, iontově-výměnnou a reverzní.

Metoda reverzní fáze (RP)

Metoda reverzní fáze SPE je ve srovnání s normální SPE nebo iontově výměnnou považována za nejméně selektivní retenční mechanismus. Jinými slovy může být obtížné pro RP rozlišit mezi molekulami, které jsou strukturně podobné. Nicméně RP zadrží většinu molekul s hydrofobním charakterem [20].

Tabulka č. 1: Charakteristika reverzní fáze [20].

Retenční mechanismus	Nepolární nebo hydrofobní interakce. <ul style="list-style-type: none">• van der Waalsovy síly nebo disperze
Matrice vzorku	Vodné vzorky. <ul style="list-style-type: none">• tělní tekutiny (sérum, plazma, moč)• punktáty• vzorky vody• víno, pivo a další vodné vzorky
Charakteristika analytu	Analyty s nepolárními vlastnostmi. <ul style="list-style-type: none">• většina organických analytů• alkyl, aromatické, alicyklické funkční skupiny

Eluční režim	Narušení RP interakce rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel vhodného nepolárního charakteru. <ul style="list-style-type: none"> • metanol, acetonitril, dichlormetan • směs rozpouštědel
Běžné aplikace	<ul style="list-style-type: none"> • drogy a metabolity v tělních tekutinách • analýza vod • punktáty tkání

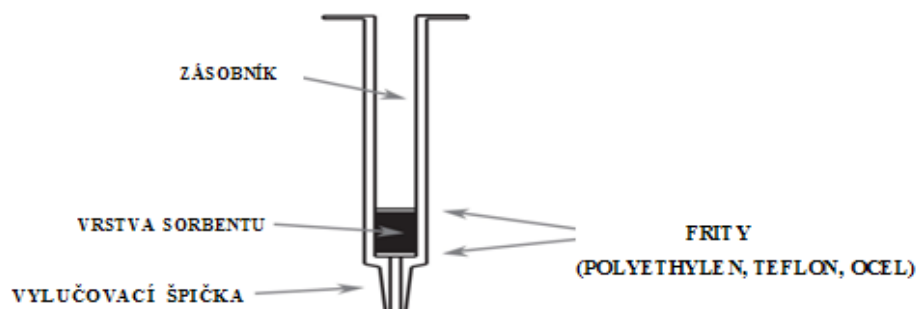
2.5.2 Komponenty SPE

Sorbent je uložen v trubičkách (kolonky tzv. cartridge) z polypropylenu, ze skla anebo je slisován se skelnými vlákny do disků [19].

KOLONKY

- tvar injekční stříkačky bez pohyblivého pístu [21]
- naplněny povrchově modifikovanými sorbenty o různé velikosti částic [21]

Obrázek č. 10: Popis SPE kolonky [22].



V charakteristice SPE kolonky by měly být uvedeny tyto údaje:

- typ tuhé fáze
- objem kolonky [0,4 - 15 ml]
- maximální průtoková rychlost
- kapacita [1 - 500 (2800) mg]
- minimální eluční objem [10 μ l - 50 ml]
- materiál kolonky [PP, sklo] [21]

EXTRAKČNÍ DISKY

Disky jsou vyráběny ze skelných vláken tvořících matrici, na kterých jsou "zakotveny" částice čistého nebo modifikovaného silikagelu - výsledkem je tuhý disk na rozdíl od SPE, kde je kolona naplněna klasickými částicemi sorbentů [23].

Obrázek č. 11: Extrakční disk [23].



- moderní forma SPE [21]
- obsahují ve svém materiálu tuhý sorbent [24]
- kompozitní tenké membrány z teflonu a příslušného modifikovaného sorbentu (až 90 váh. %) [21]
- membrány umístěny v SPE kolonkách, předřazen sedmivrstevný filtr [21]
- velká hustota disku [21]
- na promývání kapalinou se používá vakuum [24]
- jejich použití se technicky podobá nejvíce filtraci, jde ovšem o filtraci chemickou [24].

Výhody:

- není omezena průtoková rychlost
- zakoncentrování vzorku ve velmi úzké zóně membrány
- k eluci stačí řádově μl rozpouštědla, a proto odpadá odpařování nadbytečného rozpouštědla před chromatografickou analýzou vzorku
- možnost použití několika (až desítek) SPE kolonek či disků současně zkracuje dobu potřebnou k přípravě vzorků [21].

MIKROEXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ

Další modifikací extrakce tuhou fází je mikroextrakce tuhou fází (*Solid Phase MicroExtraction* – SPME). Je to revoluční postup přípravy organických vzorků

k analýze bez použití rozpouštědel. Nevyžaduje složitou instrumentaci. Vlákno z taveného křemene pokryté zakotvenou fází je ponořeno do kapalného vzorku nebo umístěno nad kapalný vzorek do prostředí nasyceného těkavými analyty. Po určitou dobu se nechá probíhat sorpce na tuhou fázi. Následuje analytický stupeň, kterým je obvykle plynová chromatografie. Vlákno necháme v dávkovacím zařízení termicky desorbovat při teplotách kolem 300 °C a analyty vstoupí do chromatografické kolony, kde se provede separace. Z důvodu mechanické ochrany bývá vlákno zasunuto v duté ocelové jehle a napojeno na ocelový píst [24].

2.5.3 Obecný postup SPE:

Obecný postup je složen z 6 fází:

1. Příprava vzorku před extrakcí

Cílem je vytvořit vzorek, jehož fyzikální a chemické vlastnosti podporují zadržení analytů v extrakční kolonce. Tuhé vzorky je nutno převést do roztoku. Jindy mohou být tuhé látky extrahovány kapalinou před použitím SPE. Vzorky obsahující tuhé nečistoty vyžadují filtraci. Obsahuje-li vzorek částičky látky, na které se analyty adsorbují, musí se analyty nejdříve z těchto částiček desorbovat. Podobně, jestliže jsou analyty chemicky vázány na velké molekuly ve vzorku (např. léčiva vázaná na proteiny), pro dosažení účinné extrakce musí být vazby rozrušeny [24].

2. Předúprava kolonky

Solvatace kolonky

Aby částičky silikagelu zadržovaly analyt, je nezbytné smáčení fáze vázané na silikagel matricí vzorku. Smáčivost zajistíme solvatací. Kolonku promýváme metanolem, acetonitrilem nebo jiným organickým rozpouštědlem [24].

Předrovnovážná úprava (kondicionování) kolonky

Po solvataci provedeme nasycení kolonky čistým rozpouštědlem analytu. Ustaví se rovnováha mezi sorbentem v kolonce a tímto rozpouštědlem. Např., je-li vzorkem pufovaná fyziologická tekutina, je vhodné prolít kolonu odpovídajícím puforem; je-li extrahován vzorek v organickém rozpouštědle, kolona by se měla upravit tímž organickým rozpouštědlem. Tento stupeň vytváří podmínky podporující retenci analytu [24].

3. Aplikace vzorku

Vzorek se nalije do kolonky a nechá se dostatečný čas protékat. Příliš rychlé provedení by mohlo způsobit, že se analyt nezadrží úplně [24]. Průtok pro optimální retenci je 1-2 kapky za sekundu [20]. Podle druhu pevné fáze a vzorku dochází ke specifickým reakcím látek s pevnou fází. Žádaná skupina látek se selektivně sorbuje a nesorbované látky (matrice) procházejí volně kolonkou [21].

4. Promývání kolonky

Účelem jednoho nebo více promývacích kroků je selektivně eluovat nežádoucí sloučeniny z vázaných fází, aniž by byly eluovány analyty. Často jsou velmi vhodnou volbou rozpouštědla, ve kterých jsou analyty nerozpustné [24]. Propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem vede k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky; žádané látky zůstávají sorbovány na pevné fázi [21]. Průtok pro eluci příměsí by měl být řízen. Při velkém průtoku by se nemusely příměsí dostatečně vymýt [24].

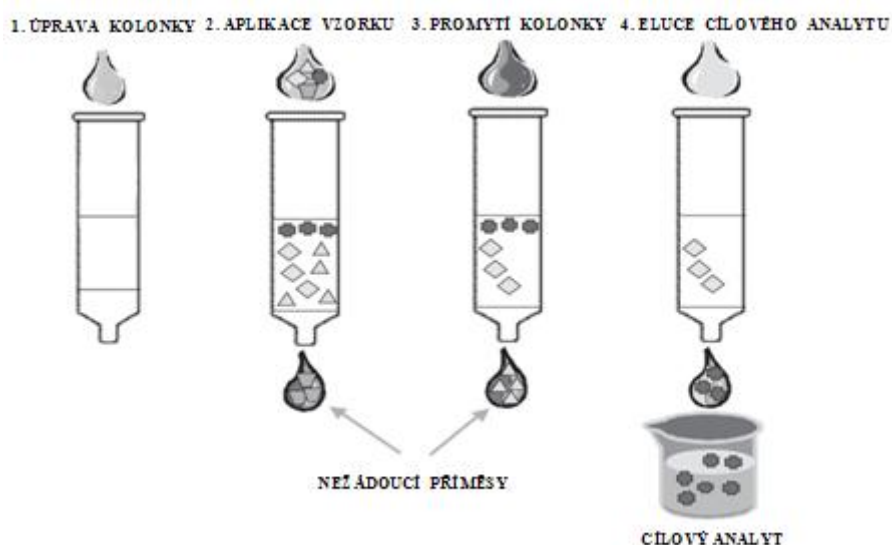
5. Sušení

Pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku [21].

6. Eluce analytu z kolonky

Kolonka se promývá elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci žádaných látek z pevné fáze a k jejich vymytí z kolonky. Eluát se jímá a dále upravuje, např. pro chromatografickou analýzu [21]. Běžným minimálním elučním objemem je 250 μl na 100 mg sorbentu. Opět je nezbytná kontrola rychlosti průtoku, protože při rychlém průtoku se nemusí vymýt všechen analyt [24].

Obrázek č. 12: Obecný postup provedení SPE [22].



2.5.4 Vlastnosti SPE - použití, výhody, nevýhody a aplikace

Použití SPE:

- odstranění rušivých složek matrice
- selektivní obohacení (zakoncentrování) vzorku
- izolace stopových látek
- změna rozpouštědla vzorku [21].

Výhody SPE:

- zakoncentrování analytu pro zvýšení citlivosti
- odstraňuje interference k zjednodušení chromatografie a zlepšení kvantifikace
- chrání analytické kolony před kontaminanty [20].

Výhody SPE ve srovnání s LLE:

- práce s menšími objemy vzorků, větší bezpečnost
- jednoduché provedení
- rychlejší a levnější (snížená spotřeba organických rozpouštědel)
- snadné skladování a transport vzorků zakoncentrovaných na kolonkách (skladování až 8 měsíců při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo 3 - 4 měsíce při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) [21].

Nejdůležitější výhodou oproti extrakci kapalina-kapalina je snížení spotřeby organických rozpouštědel [19].

Nevýhody SPE:

- pro některé specifické izolace nejsou na trhu vhodné SPE kolonky, i když sortiment SPE kolonek se neustále vyvíjí a zdokonaluje [21]

SPE aplikace:

- farmaceutické sloučeniny a jejich metabolity v tělních tekutinách
- drogy v tělních tekutinách
- znečištění pitné a odpadové vody
- pesticidy a antibiotika v potravinách/zemědělských matricích
- odsolování proteinů a peptidů
- frakcionace lipidů
- voda a vitaminy rozpustné v tucích [20].

2.6 Použitý materiál při extrakci

2.6.1 Krevní sérum

Krev patří mezi tělní tekutiny, proudí v uzavřené cévní soustavě. Rozlišujeme krev nativní (srážlivou) a nesrážlivou [25].

Nativní krev je krev bez antikoagulačních přísad. V této krvi se za normálních okolností aktivují srážecí procesy a dochází k jejímu srážení. Odebereme-li nativní krev do zkumavky, pozorujeme, že se krev již za několik minut sráží. Vzniká červená rosolovitá hmota. V průběhu několika hodin se z této hmoty vylučuje slámově žlutá, průhledná tekutina – **krevní sérum**. Objem krevní sraženiny se přitom zmenšuje a sraženina se mění na tuhý a pružný krevní koláč – krevní koagulum [25].

Nesrážlivá krev je krev, ve které jsou antikoagulační přísady. Po centrifugaci vzniká **plazma** [25].

2.6.2 Složení krve

Krev obsahuje:

- plazmu (asi 55 % z celkového objemu krve)
- buněčné součásti (asi 45 % z celkového objemu krve) [25]

Plazma obsahuje:

- vodu 92 %
- bílkoviny 7 %
- ostatní (anorganické a organické) látky 1 %

Mezi buněčné součásti patří:

- červené krvinky (erytrocyty)
- bílé krvinky (leukocyty)
- krevní destičky (trombocyty) [25].

Lyofilizovaná plazma

Lyofilizace (vymrazování, sublimační sušení) je jedním z komerčně využívaných způsobů sušení. Při tomto postupu se materiál určený k sušení rychle zmrazí, a to tak, aby se minimalizovalo poškození struktury vznikajícími krystalky ledu. Potom se materiál umístí do sušárny, v které je udržován tlak nižší, než je tlak vodní

páry v trojném bodu (610,5 Pa) a voda tak ze zmrazeného materiálu sublimuje, tzn. přechází z pevné fáze (ledu) přímo do fáze plynné (vodní páry). Sušený materiál si tak v maximální míře zachová svou původní texturu a aroma. Vodní pára se odvádí ze sušicího prostoru a kondenzuje ve výparníku. Potřebné teplo (sublimační teplo vody) se přivádí do sušeného materiálu buď vedením, nebo mikrovlnným zářením [26].

3. Praktická část

3.1 Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků

3.1.1 Použité přístroje a pomůcky

- analytické váhy SARTORIUS ANALYTIC A200S
- centrifuga EBA 21, Hettich
- spektrofotometrický detektor Ocean Optics USB4000-FL
- spektrofotometrický detektor Ocean Optics USB2000
- digitální pH-metr Hanna instruments pH212
- hadičky teflonové - vnitřní průměr 0,5 a 0,75 mm, Upchurch Scientific
- lampa MICROPACK DH 2000, Deuterium, Halogen
- MicroSIA přístroj, FIALab instruments, Inc., vybavený 8 – cestným selekčním ventilem a nástavcem LAB-ON-VALVE
- automatické pipety Biohit M
- průtoková cela s optickou délkou 20 mm (teflon), FIALab
- spektrofotometr Agilent 8453
- třepačka IKA MS3 basic
- ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100
- zkumavky ependorf 1,5 ml
- kolona na SIC - Chromolith® FastGradient 50x2mm RP-18e (Merck)
- přístroj SICrom, FIALab instruments, Inc., vybavený 8 – cestným selekčním ventilem a silnější pumpou Sapphire
- dvoupolohový ventil na přepnutí kanálu (ruční ovládání)

3.1.2 Použité chemikálie

- methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich, Praha)
- acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, Praha)
- voda ultra-čistá, Millipore
- LYOHUM N 10x5, 1, LOT 141407
- vitamin D₂, standard Ergocalciferol $\geq 98\%$ (směs enantiomerů, HPLC), Sigma-Aldrich
- vitamin D₃, standard Cholecalciferol $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich
- kyselina octová ledová $\geq 99\%$

- sorbenty Waters Oasis HLB, Lichrolut MERCK RP-18, DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, DSC-PH, DSC-CN

3.1.2.1 Charakteristika sorbentu waters Oasis HLB

Sorbent Waters Oasis HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance Sorbent, hydrofilně-lipofilně vyvážený sorbent reverzní fáze [27].

Oasis HLB je výjimečně čistý, vysoce reprodukovatelný, patentovaný kopolymer syntetizovaný v unikátním složení, které je hydrofilně a lipofilně vyvážené jak pro retenci silnou reverzní fází tak pro smáčivost s vodou. Sorbent je kompatibilní se vzorkem nebo rozpouštědlem o pH 1 – 14 [27].

Sorbent se používá k adsorpci polárních i nepolárních sloučenin současně z vodného prostředí. Mezi typické aplikace patří analýza léčiv a jejich metabolitů z biologických tekutin a analýza látek, které znečišťují vodu. Sorbent HLB má širší spektrum retence a je reprodukovatelnější než sorbent C18 a všechny ostatní křemičité sorbenty a polymery založené na reverzní fázi [27].

Velikost pórů: 80 Å

Velikost částic: 30 µm

Funkční skupiny: kopolymer m-divinylbenzenu a N-vinylpyrrolidonu [27].

3.1.3 Příprava roztoků

3.1.3.1 Příprava roztoku na aktivaci sorbentu

Roztok zvolený pro aktivaci sorbentu byl 70% acetonitril. Roztok byl připraven smísením 21 ml acetonitrilu a 9 ml vody.

3.1.3.2 Příprava nosného proudu a promývacího roztoku

Nosný proud byl připraven okyselením ultra-čisté vody ledovou kyselinou octovou na pH 3. Tento roztok byl také použit pro promytí sorbentu v kroku, kdy se kondicionoval sorbent a dále také pro vymývání balastu matrice ze sorbentu.

3.1.3.3 Příprava pracovních roztoků standardů

Koncentrace zásobních roztoků byla 1000 µM vit D₂ a D₃ v ACN.

Pracovní roztoky byly připraveny v postupně se snižující koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 2,5 $\mu\text{mol/l}$ a 1 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka č. 2: Pracovní roztoky standardu vitamínu D₂.

Č.	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Objem zásobního roztoku vitamínu D ₂ (μl)	Objem nosného proudu (μl)
1.	50	75	1425
2.	25	37,5	1462,5
3.	10	15	1485
4.	5	750 ze směsi 10 μM	750
5.	2,5	750 ze směsi 5 μM	750
6.	1	750 ze směsi 2,5 μM	750
7.	BLANK	0	1500

Tabulka č. 3: Pracovní roztoky standardu vitamínu D₃.

Č.	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Objem zásobního roztoku vitamínu D ₃ (μl)	Objem nosného proudu (μl)
1.	50	75	1425
2.	25	37,5	1462,5
3.	10	15	1485
4.	5	750 ze směsi 10 μM	750
5.	2,5	750 ze směsi 5 μM	750
6.	1	750 ze směsi 2,5 μM	750

Tabulka č. 4: Pracovní roztoky standardů vitamínu D₂ a D₃.

Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Objem zásobního roztoku vitamínu D ₂ (μl)	Objem zásobního roztoku vitamínu D ₃ (μl)	Objem nosného proudu (μl)
50	37,5	37,5	1425

3.1.3.4 Příprava vzorku

Vzorek byl připraven z lyofilizované lidské plazmy LYOHUM N 10x5, 1, LOT 141407. Po otevření lahvičky bylo přidáno 5 ml ultra čisté vody, lahvička byla stabilizována 30 minut při laboratorní teplotě. Před analýzou bylo nutné vysrážet bílkoviny z plazmy a následně použít nebílkovinnou frakci plazmy. Bylo pipetováno 500 μl plazmy, 500 μl acetonitrilu a 75 μl vitamínu D₂. Vzorek byl stočen na centrifuze 5 minut při 5 000 otáčkách. Sražené bílkoviny byly zachyceny na stěnách zkumavky-ependorf. Ze zkumavky byla stažena pouze plazma bez bílkovin, ke stažené plazmě

bylo přidáno 500 μ l nosného proudu. Byl připraven i BLANK, který byl vytvořen stejným způsobem (bez přidání vitamínu D₂).

3.1.3.5 Příprava sorbentu

V této práci byly mikročástice nahrazeny sorbentem z SPE kolonek. Po vyjmutí sorbentu z SPE kolonky (vytvořením malé dírky šroubovákem a jeho následným vysypáním do zkumavky-ependorf) bylo odváženo přibližně 25 mg sorbentu a následně byl sorbent rozpuštěn v 3 ml 70% acetonitrilu.

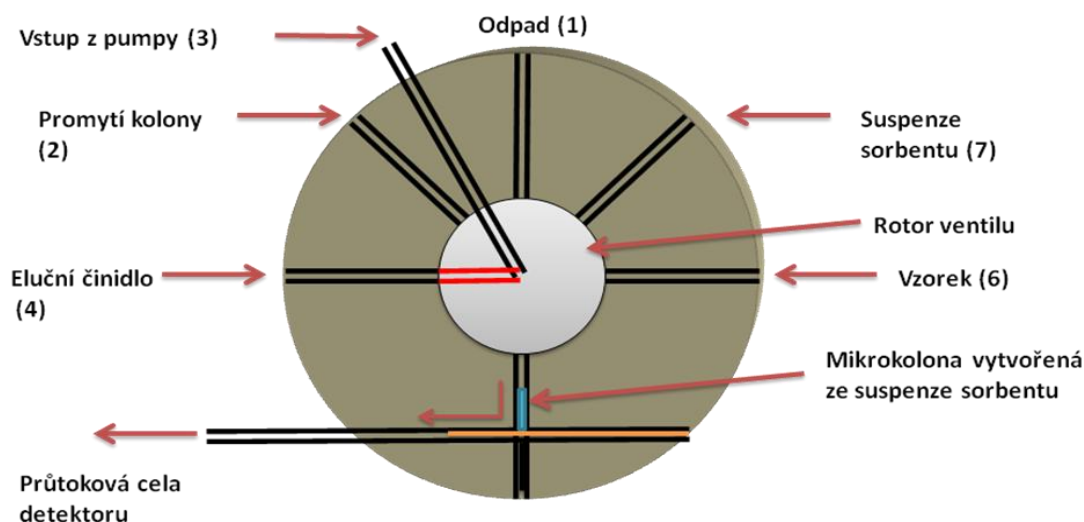
3.1.3.6 Příprava elučního roztoku

Roztok 100 % acetonitrilu v 50 ml nádobce.

3.1.4 Schéma BI přístroje a popis provedení

MicroSIA přístroj, na kterém bylo měření provedeno, byl sestaven z pístové pumpy opatřené dvoucestným ventilem, osmicestného selekčního ventilu, průtokové cely, UV-lampy a detektoru.

Obrázek č. 13: Schéma přístroje používaného v diplomové práci.



Průběh analýzy

Před každou analýzou byla připravena suspenze sorbentu. Vytvořená suspenze byla dávkována selekčním ventilem z pozice č. 7 do reakční cívky pomocí zpětného toku. Po přepnutí ventilu na pozici č. 5, byla suspenze nadávkována do průtokové cely, kde došlo k zachycení sorbentu dutou zástrčkou, optickým vláknem. Následně byl sorbent promyt nosným proudem z portu č. 3. Po promytí sorbentu, byl dávkován vzorek z pozice č. 6. Po dávkování vzorku, byl sorbent promyt opět z pozice č. 3 nosným proudem, aby došlo k vymytí balastu. Dále byl sorbent promyt elučním roztokem z pozice č. 4, aby došlo k eluci analytu zachyceného na sorbentu. Proces od dávkování vzorku až po vymytí analytu byl detekován UV spektrofotometrem. Na konci metody byl sorbent odstraněn do odpadu pozicí č. 1.

4. Vývoj a výsledky metody

4.1 Vývoj a optimalizace metody

4.1.1 Výběr vhodného sorbentu

Na začátku práce bylo vybráno 6 sorbentů, na kterých se daná metoda testovala. Nejprve byla provedena metoda SPE manuálně. Pomocí pístu z injekční stříkačky byly provedeny všechny kroky obecného postupu SPE metody, od aktivace sorbentu až po eluci analytu. Důvodem manuálního provedení SPE metody byla potřeba zjistit, jaké chemikálie jsou pro fungování daného sorbentu nejvhodnější. Materiál byl z jednotlivých kroků postupu získáván do zkumavek-ependorf a následně byl analyzován na spektrofotometru Agilent. Spektrofotometr měřil při vlnové délce 200 - 300 nm.

Použité sorbenty:

Lichrolut MERCK RP-18, DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, DSC-PH, DSC-CN.

Tabulka zobrazuje podmínky, za kterých bylo provedeno první manuální provedení SPE.

Tabulka č. 5: Zkoušené podmínky manuálně prováděné SPE.

Činnost	Použité činidlo
Aktivace sorbentu	1,5 ml 100% metanolu
Solvatace sorbentu	2 ml vody
Aplikace vzorku	1425 μ l vody+ 75 μ l vitamínu D ₂
Promytí balastu	1,5 ml 5% metanolu (75 μ l metanolu a 1425 μ l vody)
Eluce analytu	1,5 ml 100% metanolu

U všech sorbentů byla naměřena nejvyšší absorbance ve fázi aplikace vzorku, ve fázi eluce analytu byla absorbance výrazně nižší. Z výsledků vyplynulo, že stanovené podmínky nebyly pro efektivní extrakci vhodné.

Byla provedena změna v kroku aktivace sorbentu, sorbent byl aktivován 100% acetonitrilem a 100% etanolem. Provedené změny neměly žádný vliv na účinek extrakce, stále více dávkovaného vitamínu D proteklo, než bylo zachyceno. Byla provedena extrakce, ve které byl vitamin D rozpuštěn ve zředěné kyselině octové o pH 3. Provedená změna byla okamžitě pozorována v efektivitě extrakce. Z těchto výsledků

vyplývalo, že je nutné pracovat s tímto roztokem. Po tomto úspěšném kroku bylo přistoupeno k optimalizaci jednotlivých kroků postupu extrakce. Byla testována aktivace sorbentu 100% metanolem a 100% acetonitrilem, u všech sorbentů se lepší výsledky dostavily po aktivaci sorbentu acetonitrilem. Dále byla provedena změna v kroku č. 2, sorbent byl promýván vodou a zředěnou kyselinou octovou. Lepších výsledků bylo dosaženo po promytí sorbentu zředěnou kyselinou octovou. Tabulka zobrazuje výsledné podmínky, za kterých bylo provedení SPE nejlepší.

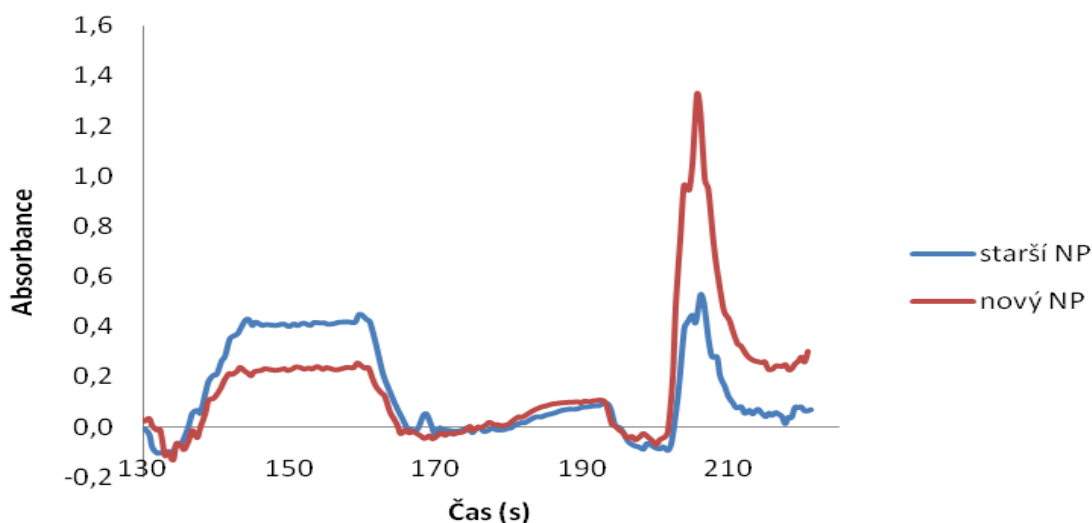
Tabulka č. 6: Výsledné podmínky manuálně prováděné SPE.

Činnost	Použité činidlo
Aktivace sorbentu	100% acetonitril
Solvatace sorbentu	Zředěná kyselina octová o pH 3
Aplikace vzorku	1425 μ l okyselené vody + 75 μ l vitamínu D ₂
Promytí balastu	Zředěná kyselina octová o pH 3
Eluce analytu	100% acetonitril

Zředěná kyselina octová byla záměrně použita i pro provedení 4. kroku extrakce, aby příprava před samotnou analýzou byla co nejjednodušší a aby byla v systému používána stále stejná činidla.

Zředěná kyselina octová byla zvolena i jako nosný proud. Bylo zjištěno, že pokud uběhl od přípravy roztoku delší čas, zvýšilo se pH a to mělo značný vliv na výsledky. Analýza neprobíhala, tak jako, když byl nosný proud připraven v den analýzy. Po upravení pH se analýza viditelně zlepšila. Obrázek č. 14 porovnává záznamy analýzy provedené se starším nosným proudem a s nově připraveným nosným proudem o pH 2,99. V grafu jsou uvedeny analýzy 50 μ M pracovního roztoku, analyzovaných za stejných podmínek, jen při odlišném stáří přípravy nosného proudu.

Obrázek č. 14: Ovlivnění analýzy vitamínu D₂ pH nosného proudu.



Z grafu je patrné, že pH nosného proudu mělo vliv na průběh celé analýzy, při pH cca 3 sorbent lépe zadržuje vitamin D. Při zvýšení pH se odezva snižuje a většina vzorku sorbentem proteče bez zachycení.

Byly vybrány dva sorbenty, na kterých bylo prováděno další testování, sorbent DSC-PH, jelikož měl v prováděné extrakci dlouhodobě nejlepší výsledky a sorbent Lichrolut MERK RP 18, který byl vybrán z důvodu porovnání rozdílných výrobců sorbentů. Po určité době testování sorbentů bylo zjištěno, že sorbenty z důvodu nesmáčivosti s vodou a velké jemnosti sorbentu byly rozptýleny po systému, dostávaly se do pumpy a pumpu ucápaly. Z toho důvodu nebylo další testování na sorbentech možné a práce byla ukončena. V práci bylo pokračováno se sorbentem HLB OASIS, který je smáčivý s vodou a do systému by se neměl dostávat, což bylo po použití sorbentu potvrzeno.

Výsledné podmínky byly následně dodrženy v analýze na BI. Do vytvořeného programu byly zahrnuty jednotlivé fáze obecného postupu. V programu byly dodrženy stejné podmínky, za jakých bylo provedeno manuální stanovení metody SPE.

4.1.2 Vývoj průtokové rychlosti a dávkovaného objemu analytu

V průběhu vývoje bylo testováno několik průtokových rychlostí, které byly v jednotlivých krocích metody měněny. V systému byly testovány průtokové rychlosti 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 $\mu\text{l/s}$. Při větších průtokových rychlostech byla celá analýza rychlejší, nevýhodou vyšších průtokových rychlostí je nepřesné dávkování. Při vyšších průtokových rychlostech dochází také k rychlejšímu opotřebování pístové pumpy.

Nejčastěji byly v systému používány průtokové rychlosti 10, 20 a 30 μl . Záleželo na fázi, ve které se analýza nacházela, nasávání objemů probíhalo při vyšších průtokových rychlostech (urychlení analýzy), dávkování do průtokové cely a promývání sorbentu v průtokové cele probíhalo při nižších průtokových rychlostech z důvodu lepšího zachycení sorbentu v průtokové cele, pomalého průtoku analytu sorbentem a důkladnějšího promytí sorbentu.

U dávkování analytu byl vyzkoušen objem 100, 200, 300 a 500 μl . S objemy 100 a 500 μl bylo pracováno nejvíce a byly považovány za nejdůležitější a nejvíce vypovídající.

4.1.3 Vývoj dávkovacího objemu suspenze

Musel být stanoven dávkovací objem suspenze, testování dávkovaného objemu bylo zahájeno objemem 150 μl a bylo ukončeno objemem 400 μl .

Tabulka č. 7: Stanovení dávkovaného objemu suspenze.

Dávkovaný objem (μl)	Poznámka
150	Málo suspenze v průtokové cele.
170	Málo suspenze v průtokové cele.
190	Málo suspenze v průtokové cele.
210	Málo suspenze v průtokové cele.
230	Suspenze v průtokové cele dost, ale špatné plnění, zachycení na stěnách, nevytvoření sloupce.
250	Dobré množství suspenze i tvar sloupce. Průtoková cela naplněna ze $\frac{3}{4}$.
330	Dobré plnění cely.
400	Nadměrné plnění cely.

Podle měření byl za ideální dávkovaný objem suspenze určen objem 250 μl , u objemu bylo nejlepší plnění cely suspenzí sorbentu. U nižších objemů bylo plnění cely suspenzí nedostatečné. U vyšších objemů bylo plnění cely zbytečně velké až nadměrné.

Při volení dávkovacího objemu byla zkoušena i opakovatelnost plnění průtokové cely. Při dávkovaném objemu 250 μl byla dobrá, kolona se plnila přibližně stejně. Malé odchylky ve tvaru sloupce byly způsobeny jemností sorbentu.

4.1.4 Vývoj způsobu detekce a vlnové délky

Detekce analytu byla zahájena použitím fluorimetru z důvodu citlivé detekce. Nejprve byl detekován průběh celé analýzy, následně byla zvolena k detekci jen část analýzy od aplikace vzorku po vymytí analytu. Od detekce průběhu celé analýzy bylo ustoupeno z důvodu problémů s reprodukovatelností analýzy. Jelikož je fluorimetr velice citlivý detektor, zaznamenával každou výchytku (nejčastěji vniknutí bulbiny) v průběhu analýzy a analýza nebyla reprodukovatelná, proto byl fluorimetr nahrazen spektrofotometrem. U spektrofotometru musela být zapnuta deuteriová lampa.

Analýza byla měřena při vlnových délkách: 450, 390, 267 a 583 nm. Vlnové délky byly stanoveny podle absorbanční křivky roztoku vitamínu D. Za nejdůležitější byla považována vlnová délka 267 nm, protože při této vlnové délce má vitamín D absorbní maximum. Při SIC analýze bylo měřeno při vlnových délkách 325, 265 a 290 nm.

4.1.5 Vývoj programu

Analýza byla ovládána počítačem, proto musel být vytvořen program pro provedení analýzy. Vývoj programu prošel mnoha změnami, než byl vytvořen konečný program podle, kterého byla analýza provedena. Byly zkoušeny různé možnosti složení programu. Jednou ze zkoušených možností byla analýza za podmínek, kdy suspenze sorbentu nebyla po analýze odstraněna do odpadu a analýza probíhala na stále stejné suspenzi. Analýza neměla dobré výsledky a následně nebyla použita.

Tabulka uvádí popis základního programu potřebného pro provedení extrakce metodou BI.

Tabulka č. 8: Popis programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
1.	Dvoucestný ventil	Poloha In
2.	Pumpa	Nasátí 500 μ l, rychlostí 30 μ l/s
3.	Dvoucestný ventil	Poloha Out
4.	Vícecestný ventil	Poloha 7 – sorbent (suspenze)
5.	Pumpa	Vytlačení 110 μ l, rychlostí 30 μ l/s
6.	Pumpa	Nasátí 250 μ l, rychlostí 20 μ l/s
7.	Pumpa	Zadržení, prodlení 3 s
8.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
9.	Pumpa	Vytlačení 400 μ l, rychlostí 10 μ l/s
10.	Vícecestný ventil	Poloha 3 – nosný proud
11.	Pumpa	Nasátí 150 μ l, rychlostí 30 μ l/s
12.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
13.	Pumpa	Vytlačení 200 μ l, rychlostí 10 μ l/s
14.	Vícecestný ventil	Poloha 6 – vzorek
15.	Pumpa	Nasátí 100 μ l, rychlostí 20 μ l/s
16.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
17.	Pumpa	Vytlačení 150 μ l, rychlostí 10 μ l/s
18.	Spektrofotometr	Měření absorbance
19.	Spektrofotometr	Měření referenčního spektra
20.	Vícecestný ventil	Poloha 3 – nosný proud
21.	Pumpa	Nasátí 150 μ l, rychlostí 30 μ l/s
22.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
23.	Pumpa	Vytlačení 200 μ l, rychlostí 10 μ l/s
24.	Vícecestný ventil	Poloha 4 – eluční činidlo
25.	Pumpa	Nasátí 150 μ l, rychlostí 30 μ l/s
26.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
27.	Pumpa	Vytlačení 200 μ l, rychlostí 10 μ l/s
28.	Spektrofotometr	Konec měření referenčního spektra
29.	Pumpa	Zadržení, prodlení 5 s
30.	Spektrofotometr	Konec měření
31.	Pumpa	Nasátí 250 μ l, rychlostí 30 μ l/s
32.	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
33.	Pumpa	Vyprázdni celý objem
34.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
35.	Pumpa	Nasátí 250 μ l, rychlostí 30 μ l/s
36.	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
37.	Pumpa	Vyprázdni
38.	Pumpa	Počká – konec analýzy

Tabulka uvádí popis základního programu potřebného pro provedení extrakce metodou SIC.

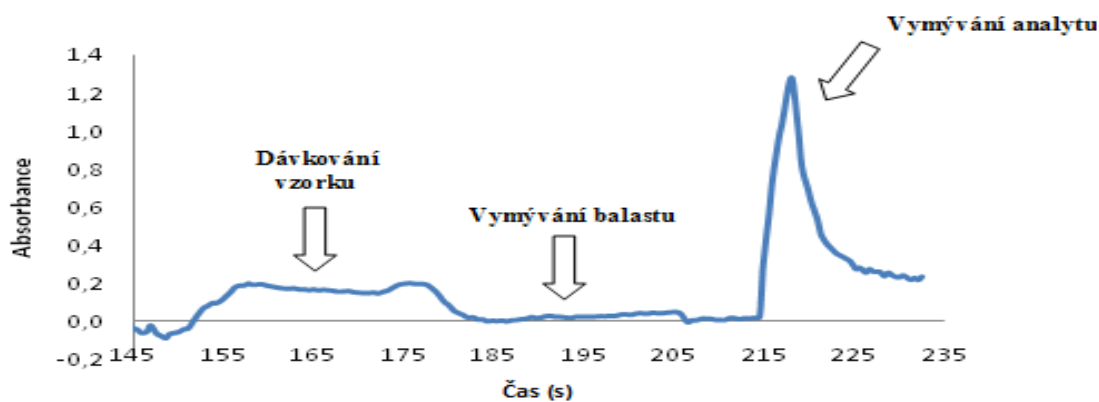
Tabulka č. 9: Popis programu č. 2.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
1.	Vícecestný ventil	Poloha-2
2.	Pumpa	Nasátí 2700 μl , rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$
3.	Pumpa	Zadržetí, prodlení 4 s
4.	Vícecestný ventil	Poloha-4
5.	Pumpa	Nasátí 20 μl , rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$
6.	Vícecestný ventil	Poloha-3-vzorek
7.	Pumpa	Nasátí 2710 μl , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
8.	Pumpa	Zadržetí, prodlení 10 s
9.	Spektrofotometr	Měření referenčního spektra
10.	Spektrofotometr	Měření absorbance
11.	Pumpa	Počká-konec analýzy, spektrometr přestane měřit

4.2 Výsledky analýzy vitamínu D₂ a D₃

Následující graf zachycuje průběh analýzy 50 μM pracovního roztoku standardu vitamínu D₂, která byla provedena za podmínek viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1. Graf zachycuje detekci spektrofotometrem od dávkování vzorku, přes promývání sorbentu nosným proudem pro odstranění balastu až k vymytí analytu elučním činidlem (záznam od bodu č. 18 do bodu č. 30 v programu č. 1). Záznam tohoto úseku z celé analýzy byl zvolen záměrně, protože zahrnuje nejdůležitější tři kroky analýzy (dávkování, promytí, eluce). Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

Obrázek č. 15: Průběh analýzy vitamínu D₂.

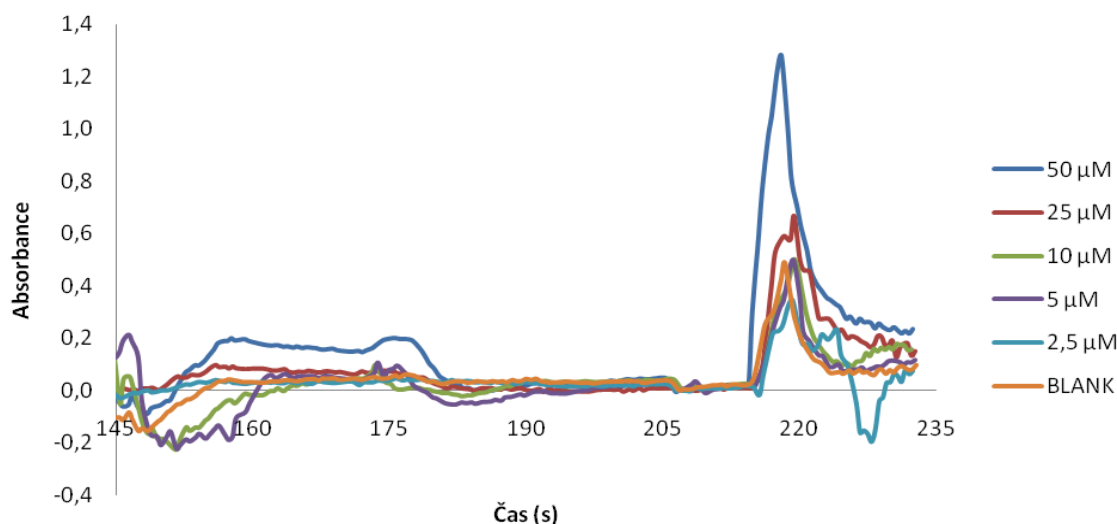


V čase cca 155 s je v grafu vidět oblast dávkování vzorku, je vidět nárůst odezvy, což značí, že sorbent nezachytil všechny vitamin D z roztoku a část vitamínu z roztoku

sorbentem protéká. V čase cca 185 s se začne sorbent promývat nosným proudem pro vymytí balastu, zde je vidět, že ve srovnání s vitamínem D se balastu vymývá poměrně málo (způsobeno čistotou standardu). V poslední části grafu je v čase cca 220 s vidět větší odezva. Odezva odpovídá části analýzy, ve které dochází k eluci vitamínu D ze sorbentu 100% acetonitrilem.

Pro měření bylo připraveno 5 pracovních roztoků standardu vitamínu D₂ s postupně se snižující koncentrací. První měřená koncentrace roztoku byla 50 dále 25, 10 a 5 $\mu\text{mol/l}$, poslední měřená koncentrace byla 2,5 $\mu\text{mol/l}$. Pro měření byl připraven i roztok blanku. Analýza byla provedena za podmínek viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

Obrázek č. 16: Analýza vitamínu D₂ včetně analýzy blanku.



V grafu je vidět průběh analýzy jednotlivých zásobních roztoků standardu vitamínu D₂ i průběh analýzy blanku. Z první části grafu je patrné, že při dávkování roztoků s vyšší koncentrací je i vyšší odezva (více vitamínu proteče a nezachytí se na sorbentu), s nižší koncentrací se zároveň snižuje i množství nezachyceného vitamínu. Odezva při eluci zachyceného vitamínu ze sorbentu se snižuje se snižující se koncentrací. U nižších koncentrací je patrné, že dosahují přibližně stejných hodnot jako má analýza blanku, zřejmě se jedná o odchylku měření.

Pro srovnání s analýzou vitamínu D₂ byla stanovena i analýza vitamínu D₃. Byly analyzovány pracovní roztoky standardu vitamínu D₃ od koncentrace 50 μM v postupně se snižující koncentraci 25, 10, 5 a 2,5 μM , byla provedena i analýza 1 μM pracovního

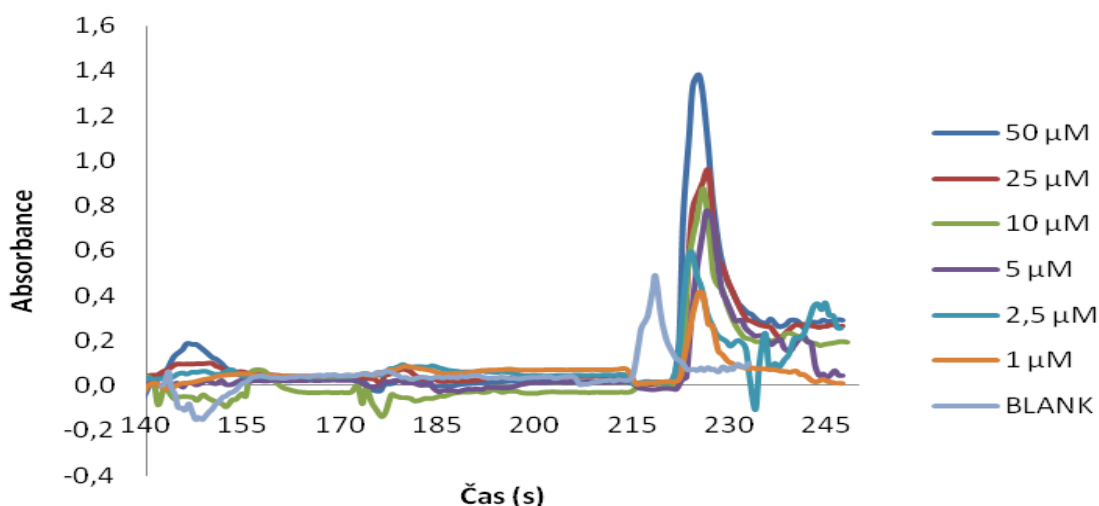
roztoku standardu. Při analýze vitamínu D₃ byly provedeny změny v programu č. 1 v krocích č. 2, 17, 23, 27.

Tabulka č. 10: Změny č. 1 v programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
2.	Pumpa	Nasátí 1000 μ l, rychlostí 100 μ l/s
17.	Pumpa	Vytlačení 200 μ l, rychlostí 10 μ l/s
23.	Pumpa	Vytlačení 250 μ l, rychlostí 10 μ l/s
27.	Pumpa	Vytlačení 250 μ l, rychlostí 10 μ l/s

Byly zvýšeny objemy vytlačování pumpou pro lepší promytí sorbentu v průtokové cele. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

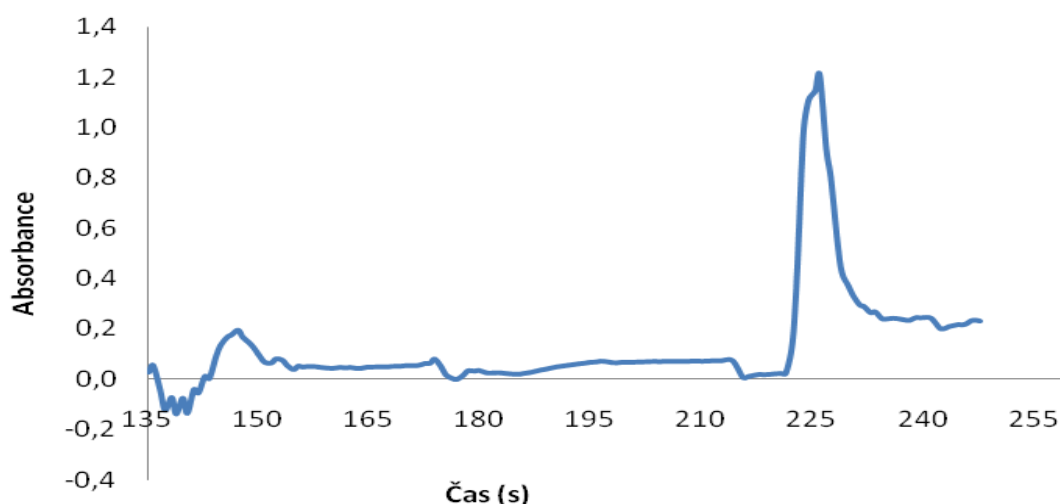
Obrázek č. 17: Analýza vitamínu D₃.



Analýza vitamínu D₃ vyšla podobně jako analýza vitamínu D₂ s tím rozdílem, že odezvy v části, kdy se dávkuje vzorek, byly mírně nižší a odezvy u eluce analytu byly vyšší. Analýza potvrdila, že výsledky u nižších koncentrací už nelze vnímat jako odezvy, ale patrně se jedná o odchylky měření. U analýzy vitamínu D₃ se také potvrdilo, že za stávajících podmínek jsou nízké koncentrace neměřitelné.

Byla provedena i analýza 50 μ M směsi pracovního roztoku standardu vitamínu D₂ a D₃, bylo zkoušeno, zda dojde k neaditivnímu nárůstu odezvy anebo částečné separaci obou vitamínů - vytvoření „dvojpíku“. Analýza byla provedena za stejných podmínek jako samotná analýza vitamínu D₃. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

Obrázek č. 18: Současná analýza vitamínu D₂ a D₃.



Analýza není nijak výrazně odlišná od analýzy jednotlivých pracovních roztoků standardů vitamínu D₂ a D₃. K nárůstu odezvy nedošlo a k vytvoření „dvojpíku“ také ne.

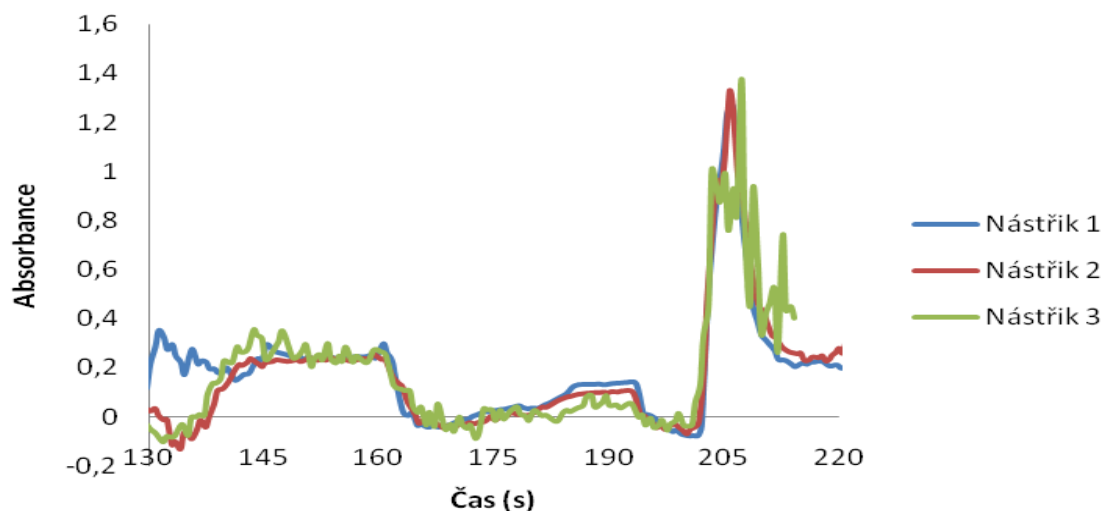
4.2.1 Opakovatelnost analýzy

U metody byla zkoušena opakovatelnost plnění kolony a opakovatelnost samotné analýzy. Opakovatelnost plnění kolony byla popsána výše. Následující graf ukazuje opakovatelnost analýzy 50 μ M pracovního roztoku standardu vitamínu D₂. Při analýze byla provedena změna v programu č. 1 v kroku č. 2. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

Tabulka č. 11: Změny č. 2 v programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
2.	Pumpa	Nasátí 500 μ l, rychlostí 100 μ l/s

Obrázek č. 19: Opakovatelnost analýzy vitamínu D₂.

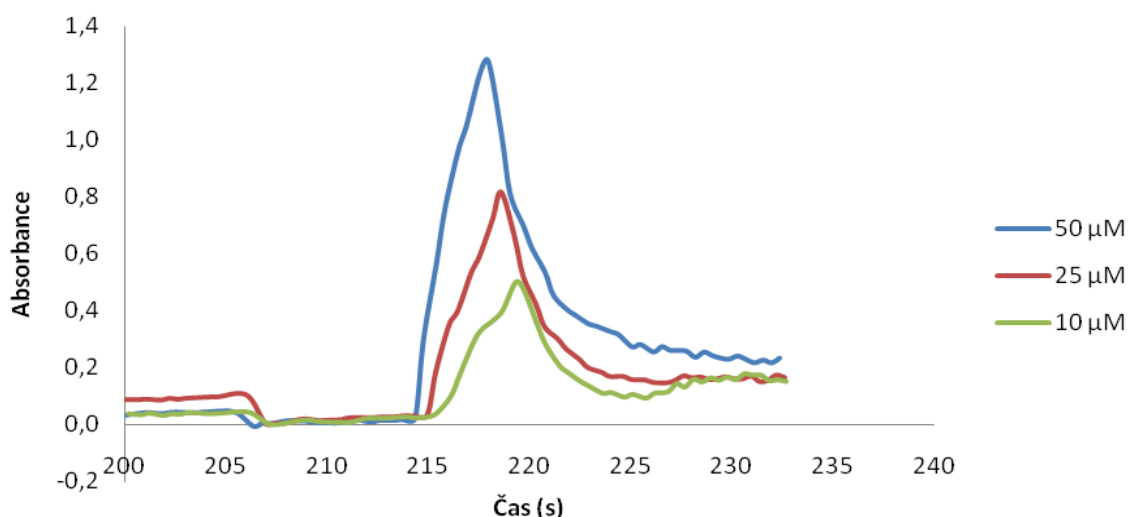


Jak je vidět z analýzy, 2 analýzy proběhly téměř stejně, ale třetí analýza byla odlišná. Dá se říct, že je to charakteristický znak metody. Vždy proběhly 2 analýzy podobně a u třetí v řadě se vyskytly problémy, nejčastěji ve formě bublin, které znemožnily reprodukovatelnost celé analýzy.

4.2.2 Stanovení linearity odezvy

Byla provedena analýza řady pracovních roztoků standardu vitamínu D₂ s postupně se snižující koncentrací 50, 25, a 10 µM. U těchto 3 roztoků byla změřena lineární odezva absorbance a byla vytvořena kalibrační křivka. Analýza byla provedena za stejných podmínek, jaké jsou uvedeny viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1. Korelační koeficient vyšel 0,9993 a reziduální odchylka 0,0204. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

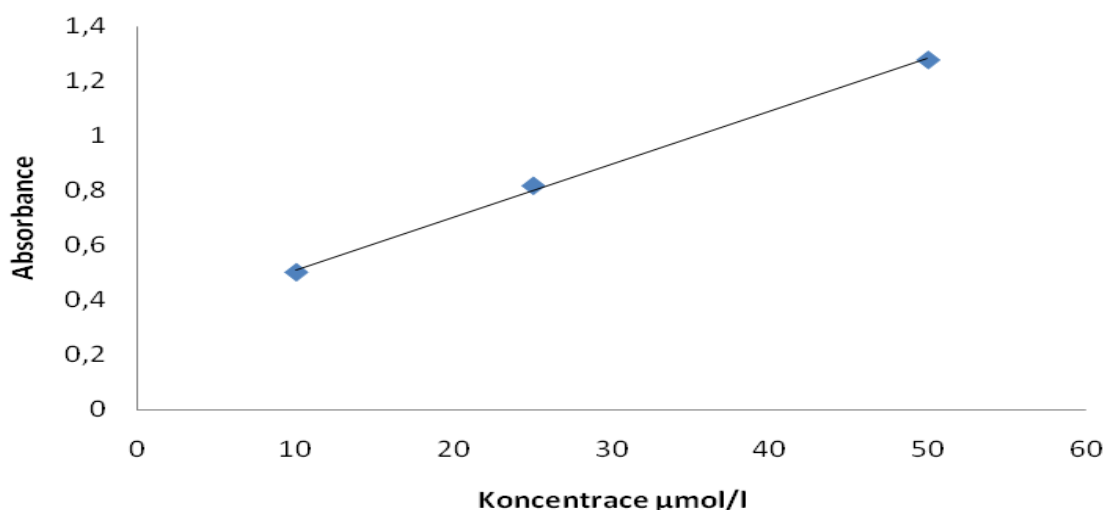
Obrázek č. 20: Roztoky vitamínu D₂ s postupně se snižující koncentrací.



Tabulka č. 12: Data pro kalibrační křivku vitamínu D₂.

Koncentrace µmol/l	Absorbance	Počet bodů	n=3	
50	1,278	Směrnice	k=0,0194	±0,0007
25	0,817	Absolutní člen	q=0,3168	±0,0234
10	0,500	Korelační koeficient	r=0,9993	
		Reziduální odchylka	s=0,0204	

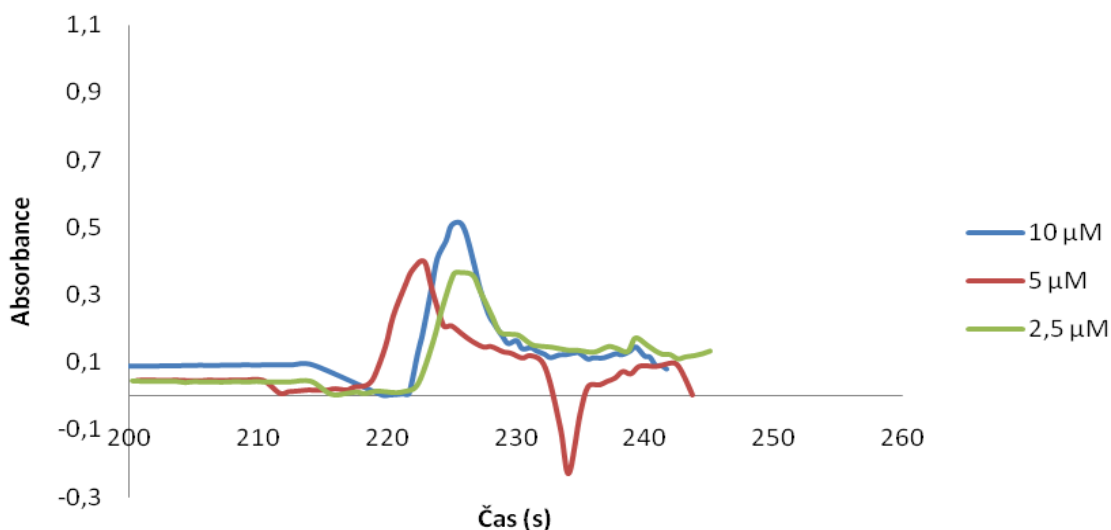
Obrázek č. 21: Kalibrační křivka vitamínu D₂.



Z kalibrační křivky a z hodnoty korelačního koeficientu je vidět, že se odezva vyšších koncentrací dá považovat za lineární.

Další provedenou analýzou byla analýza řady pracovních roztoků standardu vitamínu D₂ s postupně se snižující koncentrací 10, 5 a 2,5 μM , u těchto 3 roztoků byla změřena lineární odezva absorbance a vytvořena kalibrační křivka. Při analýze roztoků byly provedeny změny v programu v krocích č. 2, 17, 23, 27 viz Tabulka č. 10: Změny č. 1 v programu č. 1. Korelační koeficient vyšel 0,9939 a reziduální odchylka 0,0120. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

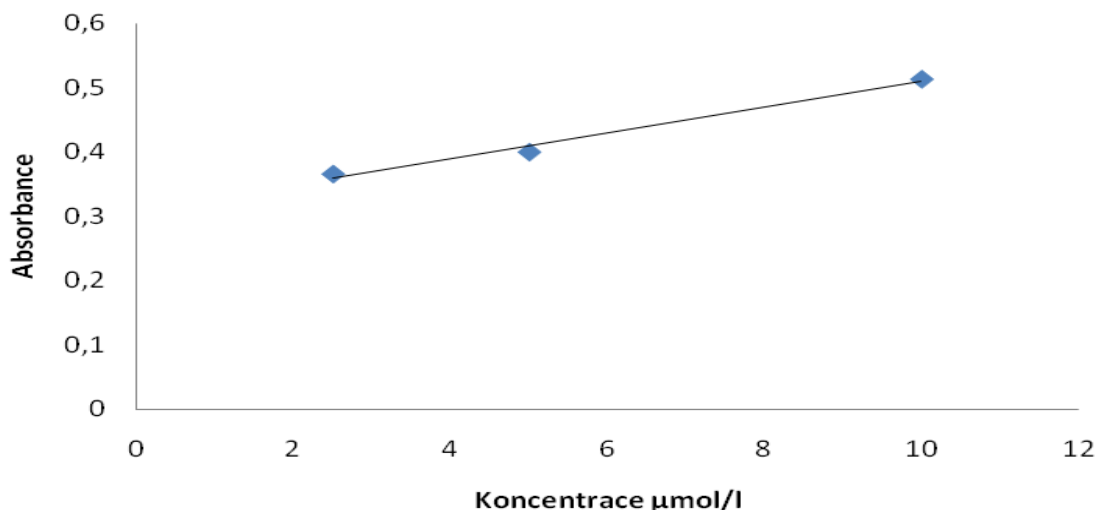
Obrázek č. 22: Roztoky vitamínu D₂ s nižší koncentrací.



Tabulka č. 13: Data pro kalibrační křivku (nižší koncentrace) vitamínu D₂.

Koncentrace μmol/l	Absorbance	Počet bodů	n=3	
10	0,513	Směrnice	k=0,0200	±0,0022
5	0,400	Absolutní člen	q=0,3095	±0,0147
2,5	0,366	Korelační koeficient	r=0,9939	
		Reziduální odchylka	s=0,0120	

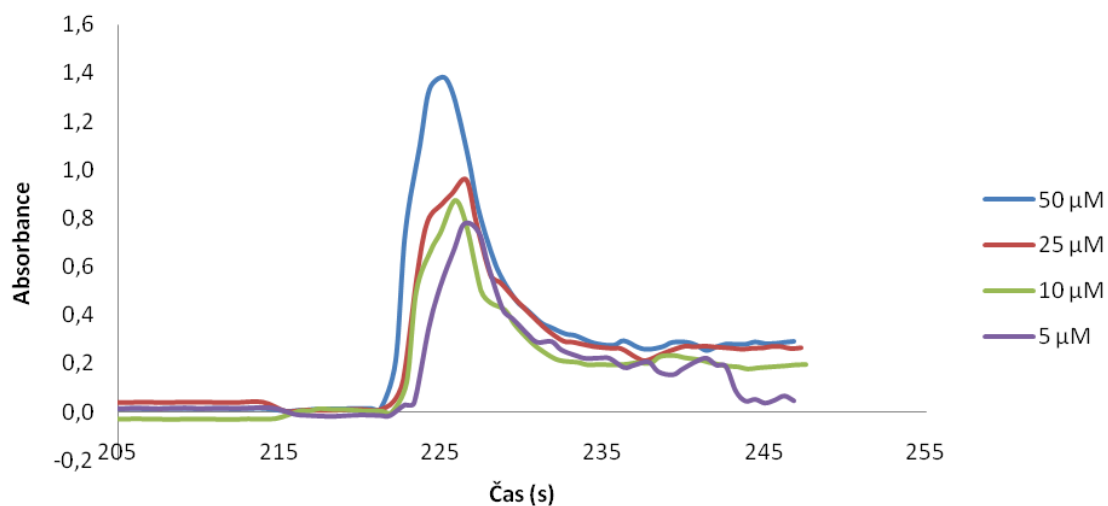
Obrázek č. 23: Kalibrační křivka roztoků s nízkými koncentracemi vitamínu D₂.



Z kalibrační řady a z hodnoty korelačního koeficientu nižších koncentrací je patrné, že se odezva dá stále považovat za lineární, ale linearita je horší, než u předešlého měření.

Byla provedena také analýza řady pracovních roztoků standardu vitamínu D₃ s postupně se snižující koncentrací 50, 25, 10 a 5 μM, u těchto 4 roztoků byla změřena lineární odezva absorbance a také vytvořena kalibrační křivka. Při analýze roztoků byly provedeny změny v programu v krocích č. 2, 17, 23, 27 viz Tabulka č. 10: Změny č. 1 v programu č. 1. Korelační koeficient vyšel 0,9816 a reziduální odchylka 0,0622. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

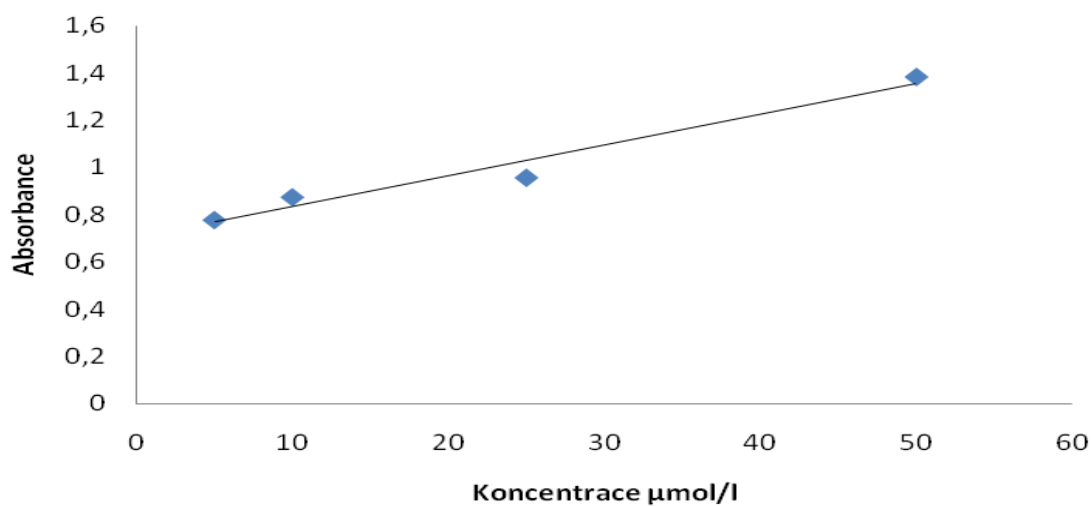
Obrázek č. 24: Roztoky vitamínu D₃ s postupně se snižující koncentrací.



Tabulka č. 14: Data pro kalibrační křivku vitamínu D₃.

Koncentrace μmol/l	Absorbance	Počet bodů	n=4	
50	1,382	Směrnice	k=0,0129	±0,0018
25	0,957	Absolutní člen	q=0,7075	±0,0506
10	0,875	Korelační koeficient	r=0,9816	
5	0,779	Reziduální odchylka	s=0,0622	

Obrázek č. 25: Kalibrační křivka vitamínu D₃.



Odezva se nedá považovat za lineární, je to vidět jak z kalibrační křivky, tak z hodnoty korelačního koeficientu.

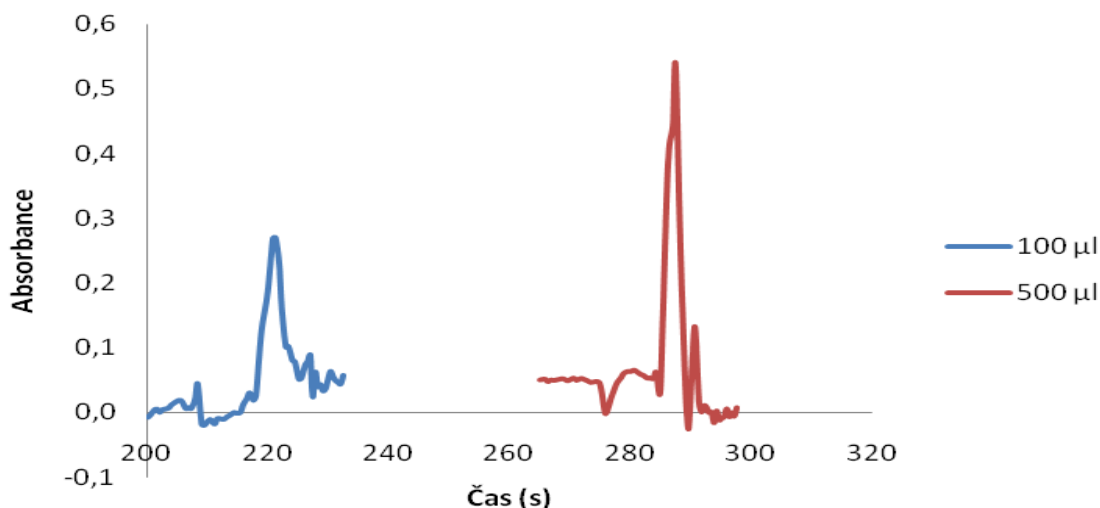
4.2.3 Změna dávkování u analýzy vitamínu D₂

Jelikož se při analýze pracovních roztoků standardu jak vitamínu D₂, tak vitamínu D₃ potvrdilo, že je měření nízkých koncentrací nereprodukovatelné, byla provedena analýza 5 µM pracovního roztoku standardu vitamínu D₂ za změněných podmínek analýzy v krocích č. 15 a 17. V grafu je porovnávána analýza 5 µM pracovního roztoku standardu vitamínu D₂ stanoveného za podmínek původních viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1 s analýzou se změněnými podmínkami viz Tabulka č. 15: Změny č. 3 v programu č. 1. Hlavní rozdíl spočívá v dávkovaném objemu roztoku. První odezva patří 5 µM roztoku, kterého bylo dávkováno 100 µl a druhá odezva patří 5 µM roztoku, kterého bylo dávkováno 500 µl. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

Tabulka č. 15: Změny č. 3 v programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
15.	Pumpa	Nasátí 500 µl, rychlostí 20 µl/s
17.	Pumpa	Vytlačení 650 µl, rychlostí 10 µl/s

Obrázek č. 26: Změna objemu dávkování 5 µM pracovního roztoku standardu D₂.

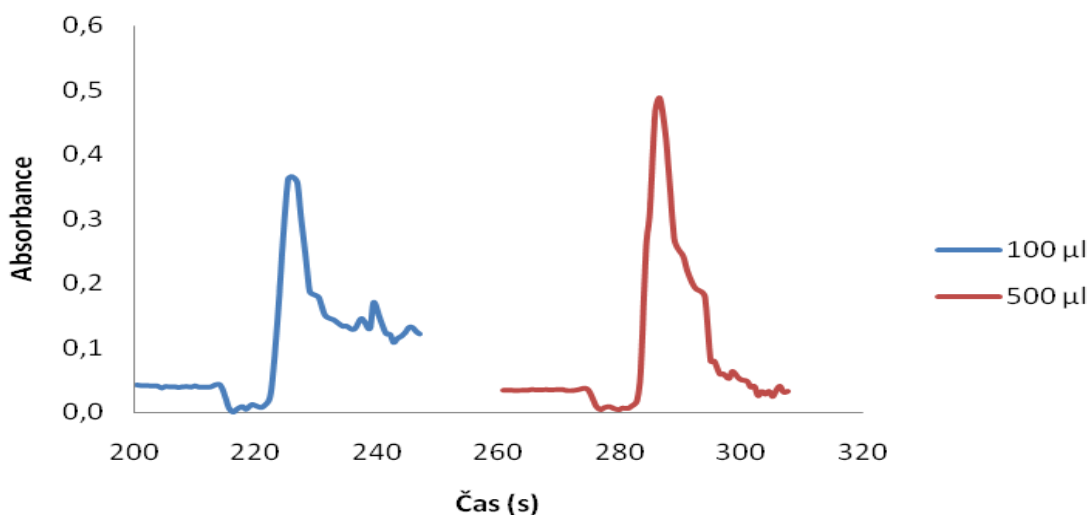


Došlo k nárůstu odezvy i u nízké koncentrace, potvrdilo se, že se zvýšením dávkovaného objemu se zvýší odezva.

Stejný experiment byl proveden s koncentrací 2,5 µM pracovního roztoku standardu vitamínu D₂, byly ponechány změněné podmínky analýzy viz Tabulka č. 15: Změny č. 3 v programu č. 1. V grafu je porovnávána analýza 2,5 µM pracovního roztoku

standardu vitamínu D₂, stanoveného za původních podmínek viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1 s analýzou se změněnými podmínkami. Koncentrace roztoku je stejná 2,5 μM. Dávkovaný objem u první odezvy je 100 μl a dávkovaný objem u druhé odezvy je 500 μl. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

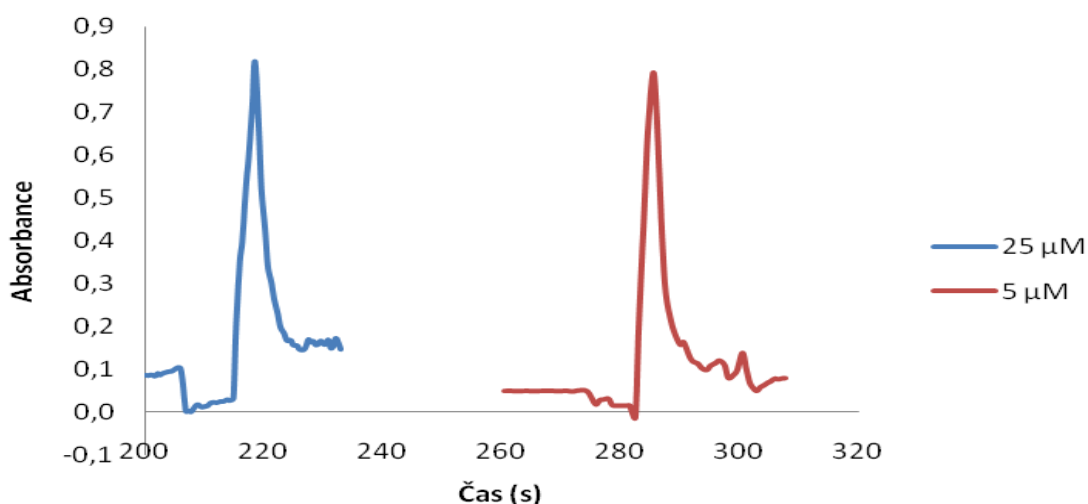
Obrázek č. 27: Změna objemu dávkování 2,5 μM pracovního roztoku standardu vitamínu D₂.



Došlo k nárůstu odezvy i u nízké koncentrace. Tvrzení, že se zvýšením dávkovaného objemu se zvýší odezva, se potvrdilo.

Následující graf ukazuje porovnání odezvy 25 μM pracovního roztoku standardu vitamínu D₂ za podmínek uvedených viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1 a odezvu 5 μM za podmínek, kdy došlo ke změně v krocích č. 15 a 17 viz Tabulka č. 15: Změny č. 3 v programu č. 1. U první odezvy patřící 25 μM roztoku byl dávkovaný objem 100 μl, u druhé odezvy patřící 5 μM byl dávkovaný objem 500 μl. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

Obrázek č. 28: Dávkování 100 μl 25 μM roztoku a 500 μl 5 μM roztoku vitamínu D_2 .



Odezvy jsou přibližně stejně velké a vzájemně si odpovídají.

4.2.4 Analýza plazmy naspikované vitamínem D_2

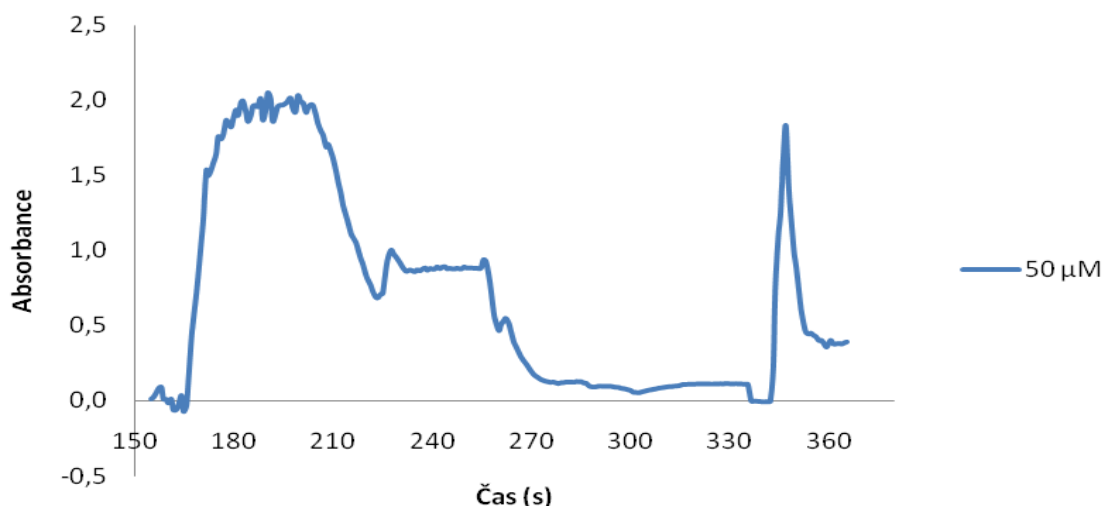
Po analýze standardu bylo přistoupeno k analýze 50 μM lyofilizované plazmy naspikované vitamínem D_2 . Situace měla simulovat analýzu lidského vzorku. Analýza byla provedena za podmínek, viz Tabulka č. 16: Změny č. 4 v programu č. 1 s přidanými kroky č. 54-57.

Tabulka č. 16: Změny č. 4 v programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
2.	Pumpa	Nasátí 1000 μl , rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$
15.	Pumpa	Nasátí 500 μl , rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$
17.	Pumpa	Vytlačení 700 μl , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
21.	pumpa	Nasátí 500 μl , rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$
23.	Pumpa	Vytlačení 600 μl , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
27.	Pumpa	Vytlačení 250 μl , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
Mezi 27. -28.	Pumpa	Zadržení, prodlení 3 s
53.	Dvoucestný ventil	Poloha In
54.	Pumpa	Nasátí 2000 μl , rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$
55.	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
56.	Pumpa	Vyprázdnění, rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
57.	Pumpa	Počká – konec analýzy

Graf průběhu analýzy 50 μM naspikované plazmy vitamínem D_2 . Dávkovaný objem byl 500 μl . Záznam spektrofotometru při vlnové délce 267 nm.

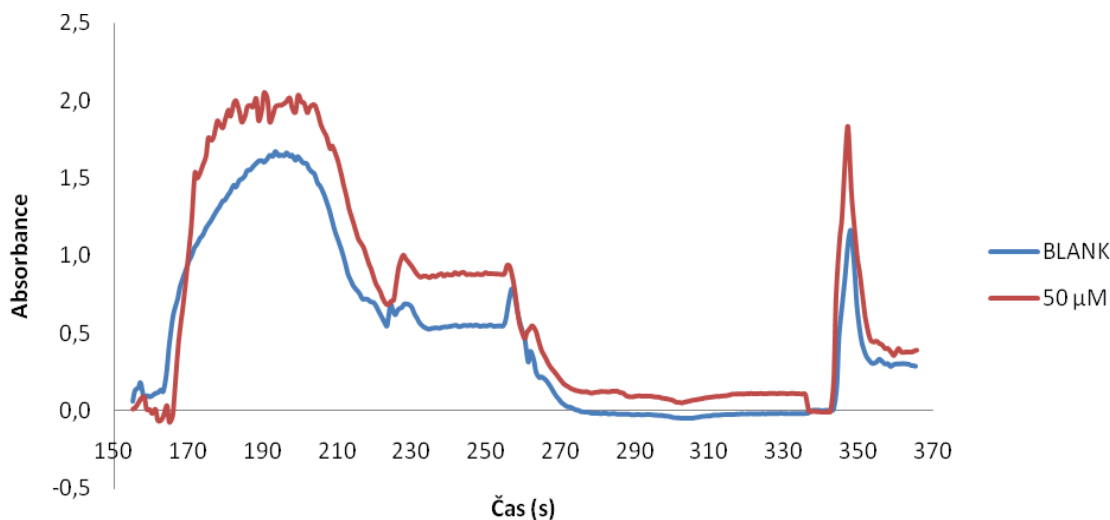
Obrázek č. 29: Analýza 50 μM naspikované plazmy vitaminem D_2 .



V první části grafu je v čase cca 180-210 s vidět velká odezva značící nezachycený vitamin D_2 a současně i látky obsažené v plazmě. V druhé části grafu v čase cca 240 – 270 s je vidět část, kdy byl vymyt balast ze sorbentu. V poslední části grafu v čase cca 340 s je odezva odpovídající eluovanému vitaminu D_2 . Z analýzy je patrné, že se část vitaminu D_2 z plazmy zachytí a větší část je nezachycena a sorbentem pouze projde.

Za stejných podmínek jako naspikovaná plazma byl měřen i blank (analýza čistě plazmy). V grafu je porovnání měřeného blanku a 50 μM naspikované plazmy. Analýza proběhla za stejných podmínek jako analýza naspikované plazmy. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 267 nm.

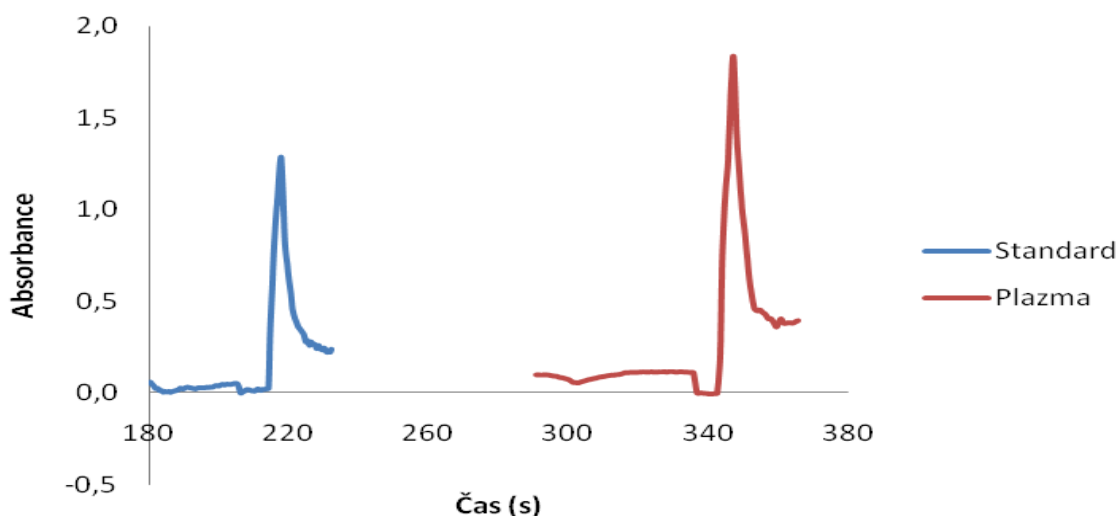
Obrázek č. 30: Porovnání blanku a 50 μM naspikované plazmy vitaminem D_2 .



Ze srovnání je patrné, že při stanovení nízkých koncentrací se opravdu jedná o odchylku měření. Reprodukovatelné výsledky pro stanovení nízkých koncentrací mohou být získány pouze při zvýšení dávkovaného objemu.

Graf srovnání odezvy 50 μM pracovního roztoku standardu vitamínu D_2 a analýzy 50 μM naspikované plazmy vitamínem D_2 . Analýza standardu byla provedena za podmínek, viz Tabulka č. 8: Popis programu č. 1, analýza naspikované plazmy byla provedena podle změněné analýzy, viz Tabulka č. 16: Změny č. 4 v programu č. 1.

Obrázek č. 31: Srovnání odezvy analýzy standardu a naspikované plazmy.



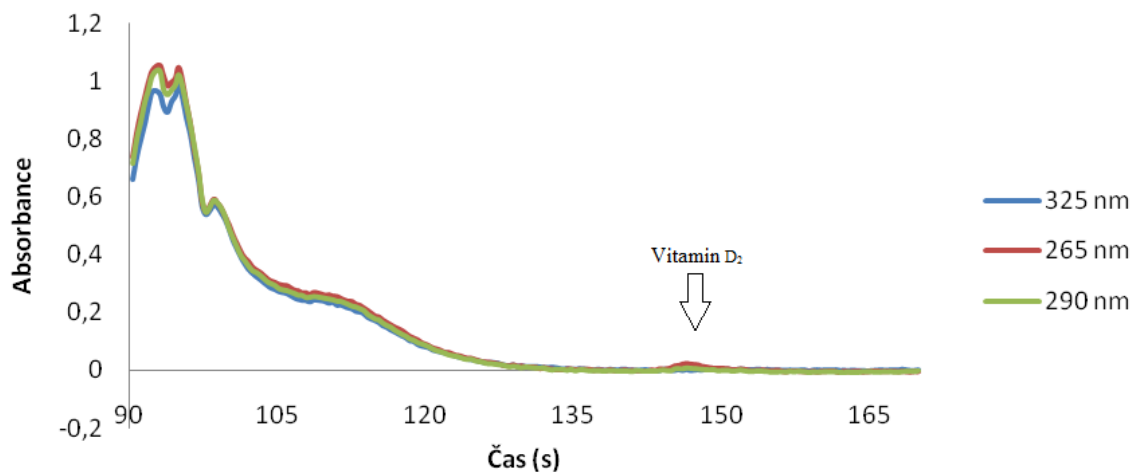
Pro srovnání je uvedena odezva po analýze pracovního roztoku standardu a po analýze naspikované plazmy. Je vidět, že odezvy si tvarem vzájemně odpovídají, neodpovídají si velikostí a to i přes stejnou koncentraci, důvodem větší odezvy je jiné dávkování. Naspikované plazmy bylo dávkováno 500 μl , pracovního roztoku standardu bylo dávkováno 100 μl . Absorbance 50 μM pracovního roztoku standardu vitamínu D_2 je 1,278 a absorbance 50 μM naspikované plazmy vitamínem D_2 je 1,831. Koncentrace se u analýzy plazmy zvýšila 5x. Odezva by měla odpovídat koncentraci 250 μM .

4.2.5 Analýza vzorku na SIC

Po analýze na BI byl eluovaný vitamin D_2 zachycen do zkumavky-ependorf. Na přístroj byl napojen ventil, který umožnil eluci analytu do zkumavky, po ukončení promývání sorbentu acetonitrilem, byl ventil otočen do polohy, která vývod uzavřela. Eluovaný analyt byl použit pro další detekci na SIC s kolonou Chromolith® FastGradient 50x2mm RP-18e (Merck) s mobilní fází 100% acetonitril a průtokem 0,6 ml/min, a nástřikem 20 μl . Analýza na SIC byla provedena z důvodu ověření,

zda se podařilo z plazmy opravdu nějaký vitamin D₂ zachytit a následně i eluovat. Analýza 50 μM naspikované plazmy vitaminem D₂. Analýza proběhla za podmínek, viz Tabulka č. 9: Popis programu č. 2. Měření bylo provedeno při 3 vlnových délkách: 325 nm, 265 nm a 290 nm.

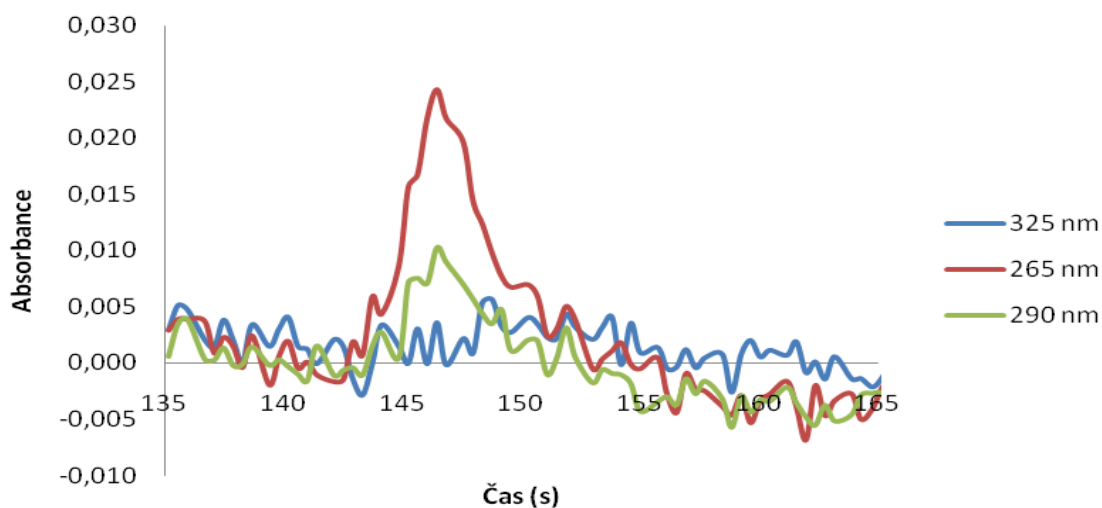
Obrázek č. 32: Podrobná analýza 50 μM naspikované plazmy vitaminem D₂.



Šipka označuje oblast analyzovaného vitaminu D₂, po předchozí analýze na BI. V dalších grafu je píků vitaminu D₂ zvětšen.

Graf zobrazuje podrobnou analýzu 50 μM naspikované plazmy vitaminem D₂.

Obrázek č. 33: Zobrazení píku vitaminu D₂ z 50 μM naspikované plazmy.



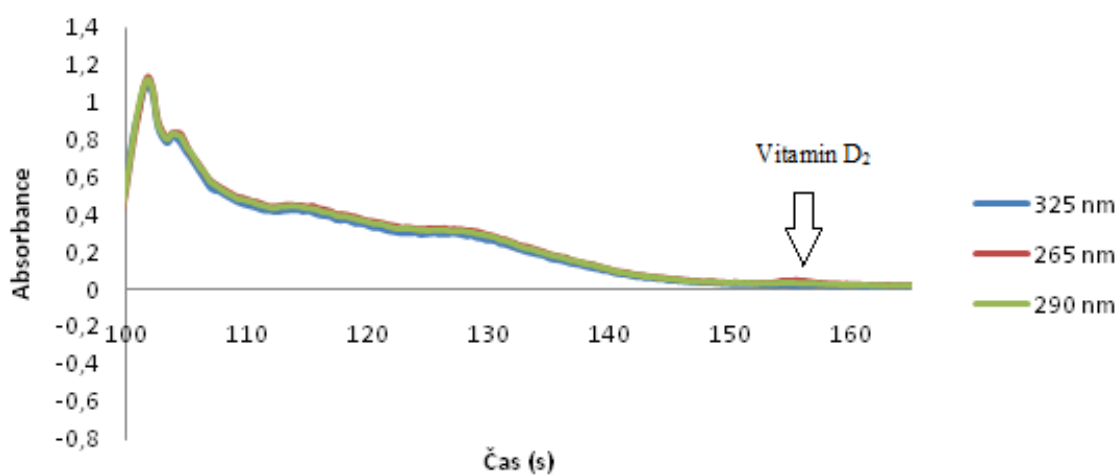
Po zvětšení je vidět, že při vlnové délce 265 nm je absorbance píku vitaminu D₂ 0,024. To znamená, že malá odezva vitaminu D₂ je po analýze metodou BI prokazatelná.

Analýza 5 μM naspikované plazmy vitaminem D_2 . Analýza na SIC proběhla za podmínek, viz Tabulka č. 17: Změna v programu č. 2 s úpravou v kroku č. 5 od původního programu.

Tabulka č. 17: Změna v programu č. 2.

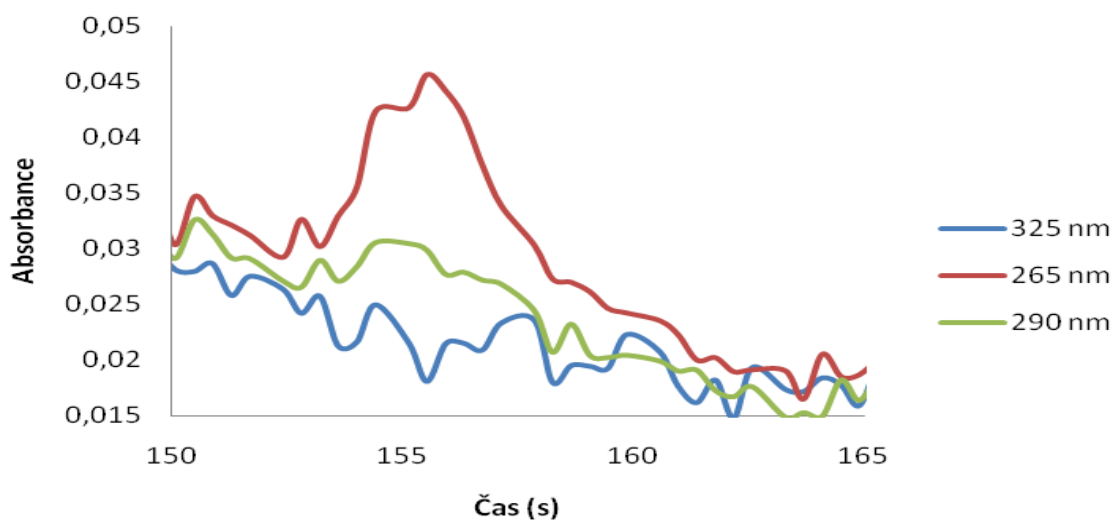
Krok č.	Jednotka	Příkaz
5.	Pumpa	Nasátí 50 μl , rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$

Obrázek č. 34: Podrobná analýza 5 μM naspikované plazmy vitaminem D_2 .



Šipka označuje místo, ve kterém se nachází pík vitaminu D_2 . V dalším grafu je znázorněna podrobnější analýza.

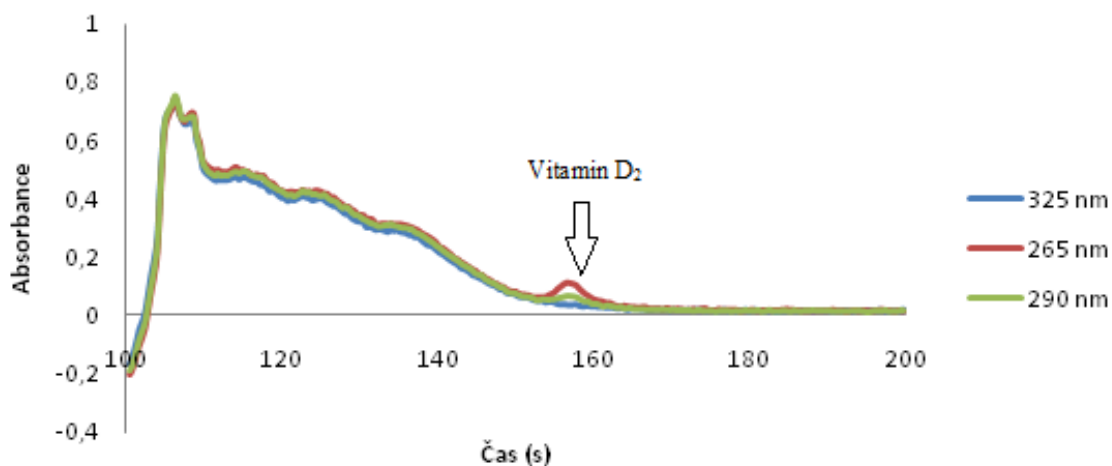
Obrázek č. 35: Zobrazení píku vitaminu D_2 z 5 μM naspikované plazmy.



Při vlnové délce 265 nm je absorbance píku vitaminu D_2 0,046. Zvětšení odezvy odpovídá zvětšení dávkovaného objemu z 20 μl na 50 μl .

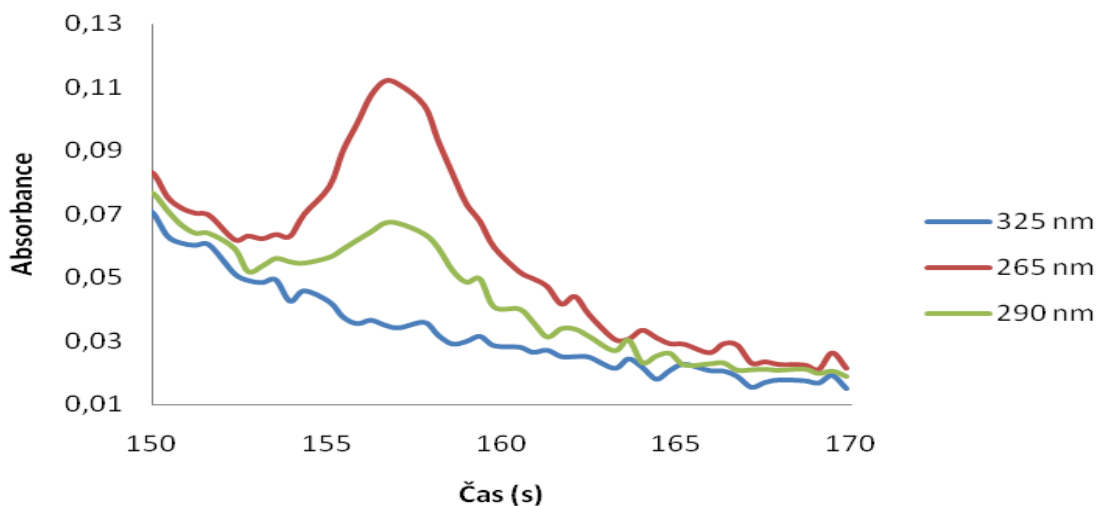
Analýza 5 μ M pracovního roztoku standardu vitamínu D₂ na BI a jeho následná analýza na SIC. Analýza na SIC byla provedena za podmínek, viz Tabulka č. 17: Změna v programu č. 2 s úpravou v kroku č. 5.

Obrázek č. 36: Analýza eluovaného standardu na SIC.



Šipka označuje místo, ve kterém se nachází pík vitamínu D₂. V dalším grafu je znázorněna podrobnější analýza vitamínu D₂.

Obrázek č. 37: Podrobná analýza standardu na SIC.



Absorbance píku vitamínu D₂ je při vlnové délce 265 nm 0,112.

4.2.6 Stanovení výtěžnosti metody

Absorbance vitamínu D₂ z naspikované plazmy je 0,046. Absorbance vitamínu D₂ z pracovního roztoku standardu je 0,112. Výtěžnost metody = (výška píku vzorku/výška píku vnitřního standardu) * 100 %. Výtěžnost = 0,046/0,112 * 100 % = 41,07 %. Výtěžnost metody je 41,07 %.

5. Diskuze

Velký vliv na průběh analýzy má druh použitého sorbentu. Vlastnosti sorbentu ovlivňují jak analýzu, tak i funkčnost celého systému. Před provedením extrakce touto metodou je třeba dobře znát vlastnosti daného sorbentu a používat pouze vodou smáčivé sorbenty. Špatně zvolený sorbent se může rozptýlit po systému a přístroj zanášet. Rozptýlený sorbent znesnadňuje, až znemožňuje provést analýzu a samozřejmě také hrozí riziko poškození systému.

Faktory, které ovlivňují fungování celé analýzy, jsou nejenom typ sorbentu, ale i práce s vybraným sorbentem, jeho aktivace, umístění v průtokové cele (vytvoření tzv. mikrokolony) a stabilita vytvořené kolony během provedeného měření. Nízká stabilita kolony během měření je zřejmě jedním z hlavních důvodů neúspěšnosti metody. Sorbent se uvolňuje, prochází průtokovou celou a tím dochází k ovlivnění výsledků analýz pracovních roztoků standardu a velké odezvy v průběhu měření slepého roztoku (blanku).

Výsledky analýzy jednotlivých koncentrací pracovních roztoků standardu vitamínu D jsou ovlivněny použitím dávkovaného objemu, při malých dávkovacích objemech je efektivita metody mnohem nižší, než při velkých dávkovacích objemech.

Dalším faktorem, který může ovlivňovat průběh analýzy, je pH nosného proudu. Optimální pH nosného proudu se pohybuje přibližně kolem 3. Roztoky s vyšším pH neposkytují efektivní extrakci.

Z dosažených výsledků je patrné, že metodu ovlivňují jakékoli změny v podmínkách provedené analýzy, z toho vyplývá, že zkoušená metoda je velice citlivá ke změnám podmínek a je tedy málo robustní.

6. Závěr

V práci bylo prokázáno, že nahrazení mikročástic v systému BI sorbentem z SPE kolonek je možné stejně jako technické spojení dvou navzájem nezávislých metod. Metodu SPE se podařilo miniaturizovat a zároveň automatizovat se všemi kroky, které jsou nutné pro správné provedení metody SPE. Po analýze plazmy naspikové vitamínem D mikročasticovou analýzou byla provedena analýza na sekvenční injekční chromatografii. Z výsledků vyplývá, že zkoušená metoda je schopna část vitamínu D extrahovat a následně je možné provést chromatografickou separaci.

Metoda se jeví jako lineární při stanovení vyšších koncentrací v rozsahu 50-10 $\mu\text{mol/l}$, korelační koeficient je 0,9993. U analýzy nižších koncentrací v rozsahu 10-2,5 $\mu\text{mol/l}$ je korelační koeficient 0,9939, což je možné stále považovat za lineární odezvu absorbance, ale u analýzy vitamínu D₃ pro koncentrace v rozsahu 50-5 $\mu\text{mol/l}$ je korelační koeficient 0,9816, což se za lineární odezvu považovat nedá. Důvodem neschopnosti přesně určit, zda je metoda lineární nebo ne, je nízká opakovatelnost analýzy. Nevýhodou je také nízký rozsah stanovených koncentrací.

U analýzy blanku a nízkých koncentrací za podmínek dávkování 100 μl jsou velikosti odezvy hodně podobné. Z toho vyplývá, že se pravděpodobně jedná o odchylku měření a za těchto podmínek není možné nízké koncentrace stanovit. Pokud chceme stanovit nižší koncentrace, je nutné používat dávkovací objem minimálně 500 μl .

Bylo provedeno manuální zpracování metody SPE, které bylo úspěšné a potvrdilo spolehlivost metody, složitost automatizace metody SPE spolehlivost metody neprokázala. V práci bylo testováno 7 sorbentů, za vhodný sorbent pro systém spojení SPE a BI může být označen pouze jeden HLB OASIS od firmy Waters.

Byla provedena optimalizace. Optimální podmínky pro analýzu jsou: analýzu provést se sorbentem HLB OASIS, rozmíchat (vytvořit suspenzi) cca 25 mg sorbentu v 3 ml 70% acetonitrilu (dojde k aktivaci sorbentu). Dávkovaný objem suspenze sorbentu je 250 μl . Jako nosný proud použít zředěnou kyselinu octovou o pH 3, dávkovaný objem nosného proudu pro promytí průtokové cely je 150 μl . Vzorek po deproteinaci metanolem smíchat se zředěnou kyselinou octovou v poměru 2:1 a dávkovat objem 500 μl . Balast ze sorbentu je vymyt nosným proudem o objemu 500 μl a analyt je eluován 150 μl 100% acetonitrilu. Zmíněné objemy jsou dávkované ze zásobníků, pro vytlačení do průtokové cely je nutný objem o 100 μl větší z důvodu

vytlačení celého obsahu aspirovaného objemu. Pro správnou analýzu je nutné dodržet přesné pořadí prováděných kroků. Dávkování suspenze sorbentu do průtokové cely, promytí cely nosným proudem, dávkování vzorku, promytí sorbentu nosným proudem, promytí sorbentu elučním činidlem a odstranění sorbentu do odpadu. Průtoková rychlost analýzy se pohybuje mezi 10 - 30 $\mu\text{l/s}$, záleží na fázi, ve které se analýza nachází. Nasávání objemů probíhá při vyšší průtokové rychlosti. Dávkování do průtokové cely probíhá při nižších rychlostech z důvodu lepšího zachycení sorbentu v cele, lepšího zachycení vzorku na koloně a lepšího promytí sorbentu. Hlavní vlnová délka při detekování spektrofotometrem je 267 nm.

Po analýze naspikované plazmy vitamínem D na BI bylo provedeno ověření zkoušené metody sekvenční injekční chromatografií, díky této analýze byl získán údaj o výtěžnosti. Výtěžnost systému je za optimálních podmínek 41,07 %.

Práce, která se snažila o automatizaci, miniaturizaci a zrychlení SPE metody ve spojení s BI byla metodou experimentální a šlo o první kroky ve vývoji. V práci je naznačeno, že určitá možnost spojení těchto dvou metod je možná, ale je nutný další vývoj. Z výsledku výtěžnosti vyplývá, že za stanovených podmínek a za současného provedení je metoda neefektivní. Navrhovala bych vyzkoušet jiné možnosti spojení metod extrakčních s metodou BI, protože potenciál spojení těchto metod je velký.

7. Literatura

- [1] HADAŠOVÁ, E. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. 601 s. ISBN 80-7262-168-8. Kapitola 14.7., Vitamíny a hormony ovlivňující kostní homeostázu, s. 421-428.
- [2] BURIANOVÁ, T. *Vitaminy rozpustné v tucích*. [online], poslední revize 23. 2. 2011 [cit. 5. 3. 2011]. Dostupné z: <<http://www.ordinace.cz/clanek/vitaminy-rozpustne-v-tucich/>>.
- [3] RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9. Kapitola 12., Metabolismus vápníku, hořčíku a fosforu, s. 105-112.
- [4] WIKIPEDIA. *Súbor:Ergocalciferol.png*. [online] [cit. 29. 11. 2010]. Dostupné z: <<http://sk.wikipedia.org/wiki/S%C3%BAbor:Ergocalciferol.png>>.
- [5] KOL. AUTORŮ. *Český lékopis 2009 (Doplněk 2010)*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010. 5358 s. ISBN 978-80-247-3436-1.
- [6] WIKIPEDIA. *Súbor:Cholecalciferol.png*. [online] [cit. 29. 11. 2010]. Dostupné z: <<http://sk.wikipedia.org/wiki/S%C3%BAbor:Cholecalciferol.png>>.
- [7] BLAHOŠ, J. *Vitamin D*. [online], publikováno 29. 1. 2009, [cit. 03. 01. 2011]. Dostupné z: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/vitamin-d-412191>>.
- [8] BÁLKOVÁ, O. *Kostní markery*. [online] [cit. 29. 11. 2010]. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/prolekare/kostni_markery_Roche_web_June08.pdf>.
- [9] ŠÁLEK, T. *25-OH vitamin D3*. [online] [cit. 27. 11. 2010]. Dostupné z: <http://www.kntb.cz/o-nemocnici/zdravotnicka-oddeleni/diagnosticke-obory-komplement/oddeleni-klinicke-biochemie/aktuality2/#25-OH_vitamin_D3>.
- [10] LAB TESTS ONLINE CZ. *Vitamin D*. [online], poslední revize 2. 5. 2010 [cit. 03. 01. 2011]. Dostupné z: <<http://www.labtestsonline.cz/tests/VitaminD.html?tab=3>>.
- [11] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE, katedra analytické chemie. *Sekvenční injekční analýza (Stanovení obsahu dusitanů rivanolovou metodou)*. [online] [cit. 5. 1. 2011]. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia.pdf>>.

- [12] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE, katedra analytické chemie. *Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí*. [online] [cit. 28. 12. 2010]. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/fia.pdf>>.
- [13] RUŽIČKA, J. *Flow injection analysis*. Tutorial on Flow Based microAnalytical Techniques [CD-ROM], 10/2009 [cit. 29. 1. 2011]. 4. vydání.
- [14] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. *Metody průtokové analýzy*. [online] [cit. 03. 01. 2011]. Dostupné z: <http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/prutok_anal.htm>.
- [15] FIALAB [online] [cit. 03. 01. 2011]. Dostupné z: <<http://www.flowinjection.com/index.aspx>>.
- [16] RUŽIČKA, J. a kol. *Immobilization of proteins on agarose beads, monitored in real time by bead injection spectroscopy*. *The Analyst*, 5/2006, vol. 131, s. 799-808.
- [17] MANUEL, M. a kol. *Recent developments in automatic solid-phase extraction with renewable surfaces exploiting flow-based approaches*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, vol. 27, no. 9, s. 749-761.
- [18] FIALAB. *FIALab instruments, Leaders in Flow Injection Technology*. [online] [cit. 03. 01. 2011]. Dostupné z: <<http://www.flowinjection.com/microfia/bead.html>>.
- [19] SIGMA ALDRICH. *Extrakce na tuhou fázi* [online] [cit. 16. 12. 2010]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>>.
- [20] SIGMA ALDRICH. *Solid Phase Extraction Overview* [online] [cit. 16. 12. 2010]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/learning-center/spe-overview.html>>.
- [21] COUFAL, P. *Extrakce*. [online] [cit. 16. 12. 2010]. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>>.
- [22] BIOTAGE. *Introduction to Solid Phase Extraction (SPE) for Reaction Work-up*. [online] [cit. 20. 12. 2010]. Dostupné z: <<http://www.biotage.com/Print.aspx?id=35833>>.

- [23] LABICOM S.R.O. *Membránové a SPEC disky, Captiva*. [online] [cit. 20. 12. 2010]. Dostupné z: <<http://www.labicom.cz/membranove-a-spec-disky--captiva-77/>>.
- [24] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. aktualizované vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [25] PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu, buňka a krvetvorba*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR s.r.o. 160 s. ISBN 80-86682-01-3.
- [26] ÚZEI. A-Z slovník pro spotřebitele: *Lyofilizace*. [online] [cit. 03. 01. 2011]. Dostupné z: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92019>>.
- [27] WATERS. *Waters Information Center SPE Sorbents**. [online] [cit. 14. 03. 2011]. Dostupné z: <http://www.waters.nl/SPE_CHEM.htm>.