

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Vývoj metody pro stanovení vybraných
vitamínů metodou kapalinové
chromatografie ve spojení s hmotnostní
detekcí

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Romana Uřinová, Ph.D.
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2018

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Romana Uřinová

Název práce: Vývoj metody pro stanovení vybraných vitamínů metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Typ práce: rigorózní

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2018

Anotace:

Vitamíny jsou esenciální organické sloučeniny nezbytné pro fyziologické fungování lidského organismu, ve kterém se účastní řady biochemických procesů. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu na stanovení vitamínů B₂, B₉, E a A v séru pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí.

Analýza vitamínů byla provedena na kapalinovém chromatografu Acquity UPLC-H Class (Waters, Milford MA, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem XEVO TQD (trojitý kvadrupól, Micromass, Manchester, UK). Separace látek probíhala na koloně BEH C18 RP (2,1x100 mm, 1,7 μm) za použití gradientové eluce s mobilní fází A (4 mmol/l mravenčan amonný, 0,2 % kyselina mravenčí ve vodě, v/v/v) a mobilní fází B (4 mmol/l mravenčan amonný, 0,2 % kyselina mravenčí v metanolu, v/v/v) s dobou analýzy 17 minut. Gradientová eluce měla následující průběh: 0-1,5 min 95% MF A, 1,6-4,0 min 40% MF A s postupným nárůstem až na 100% MF B, 4,5-9,0 min 100% MF B, 9,1-17,0 min 95% MF A. Úprava vzorku zahrnovala precipitaci proteinů pomocí ethanolu. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost byla validována podle pravidel FDA. Hodnoty variačních koeficientů se nacházely v rozmezí 3,1-11,7 % a hodnoty výtěžnosti v rozmezí 94,4-107,5 %. Vyvinutá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí umožňuje stanovení čtyř vitamínů s jednoduchou úpravou vzorku.

Klíčová slova: vitamíny, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Počet stran: 76

Počet příloh: 9

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Romana Uřinová

Title: Development of method for determination of selected vitamins by liquid chromatography with mass spectrometry

Type of thesis: Thesis

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

The year of submission: 2018

Annotation:

Vitamins are essential organic compounds that are involved in many biochemical processes and are essential for physiological functions of the body. The aim of this work was to develop and validate method for the determination of vitamins B₂, B₉, E and A in serum by liquid chromatography with mass detection.

The analysis of vitamins was performed using a liquid chromatograph Acquity UPLC-H-Class (Waters H-class UPLC system, Waters, Milford MA, USA) in combination with tandem mass spectrometry XEVO TQD (triple quadrupole, Micromass, Manchester, UK). The separation of the substances was carried out on a BEH C18 RP column (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) using a gradient elution of mobile phase A (4 mmol/L ammonium formate, 0.2% formic acid in water, v/v/v) and mobile phase B (4 mmol/L ammonium formate, 0.2% formic acid in methanol, v/v/v) with an analysis time of 17 minutes. The gradient elution was as follows: 0-1.5 min 95% MP A, 1.6-4.0 min 40% MP A with a gradual increase to 100% MP B, 4.5-9.0 min 100% MP B, 9.1-17.0 min 95% MP A. The preparation of a sample included precipitation of proteins using ethanol. The accuracy and precision were validated by the FDA rules. The coefficients of variation were in the range from 3.1 to 11.7% and a recovery in the range of 94.4 to 107.5%. This method of high performance liquid chromatography with mass spectrometry allows the determination of four vitamins with a simple preparation of a sample.

Keywords: vitamins, liquid chromatography, mass spectrometry

Number of pages: 76

Number of appendices: 9

Language: Czech

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 25.10.2018

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni v průběhu přípravy této práce:

- mému školiteli doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za odborné rady, konzultace a podporu při zpracování této práce
- pracovníkům Oddělení klinické farmakologie ÚLD Fakultní nemocnice Ostrava
- svým rodičům za podporu při studiu

Obsah

Seznam zkratk	7
Seznam příloh	9
Seznam obrázků	10
Seznam tabulek	11
ÚVOD	12
Teoretická část	13
1. <i>Vitamíny</i>	13
2. <i>Stabilita vitamínů s ohledem na podmínky uchovávání vzorků</i>	17
3. <i>Metody stanovení vitamínů</i>	19
4. <i>Matricový efekt při UHPLC-MS analýze</i>	23
5. <i>Úprava vzorku</i>	24
6. <i>Přehled publikovaných metod na stanovení vitamínů</i>	26
7. <i>Validace metody</i>	30
Experimentální část	34
8. <i>Příprava a testování</i>	34
9. <i>Výsledky a diskuze</i>	39
Závěr	59
Seznam literatury	61
Přílohy	68

Seznam zkratek

AMP	Adenosinmonofosfát
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization)
ATP	Adenosintrifosfát
BEH	Bridge ethyl hybrid
BHT	Terc-butylhydroxytoluen
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CV	Variační koeficient (Coefficient of variation)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis)
DAD	Detektor diodového pole (Diod-array detector)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMA	Europe Medicines Agency
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization)
FA	Kyselina listová
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavinmononukleotid
FN	Fakultní nemocnice
HIC	Hydrofobní interakční chromatografie (Hydrophobic interaction chromatography)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
ID	Vnitřní průměr (Internal diameter)
IS	Vnitřní standard (Internal standard)
K_D	Distribuční konstanta
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
LLE	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extraction)
LLOQ	Dolní limit kvantifikace (Lower limit of quantification)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit of quantification)

MALDI	Desorpce/ionizace laser za přítomnosti matrice (Matrix assisted laser desorption/ionization)
MECK	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar electrokinetic capillary chromatography)
MF	Mobilní fáze
MRM	Selektivní záznam více vybraných reakcí
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Multiple reaction monitoring)
PDA	Detektor diodového pole (Photodiode-array detector)
PEEK	Polyetheretherketon
PP	Srážení proteinů (Protein precipitation)
Q-TOF	Kvadrupól- průletový analyzátor (Quadrupole Time-of-flight)
SD	směrodatná odchylka
SPE	Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction)
TDP	Thiamindifosfát
TFA	Kyselina trifluoroctová
TOF	Průletový analyzátor (Time of flight)
TRC	Toronto Research Chemicals
TTP	Thiamintrifosfát
UHPLC	Ultra-vykoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-high performance liquid chromatography)
UV-VIS	Ultrafialová-viditelná oblast světla (Ultraviolet-visible)
x	průměr
5-M-THF	5-methyltetrahydrolistová kyselina

Seznam příloh

1. příloha č. 1: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 1
2. příloha č. 2: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 2
3. příloha č. 3: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 3
4. příloha č. 4: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 4
5. příloha č. 5: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 5
6. příloha č. 6: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 6
7. příloha č. 7: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 7
8. příloha č. 8: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 8
9. příloha č. 9: Chromatogram patientského vzorku

Seznam obrázků

1. Obrázek č. 1: Chromatogram kyseliny listové a vitamínu B₂ při gradientové eluci č. 1
2. Obrázek č. 2: Chromatogram vitamínů E a A při gradientové eluci č. 2
3. Obrázek č. 3: Chromatogram stanovovaných vitamínů při gradientové eluci č. 3
4. Obrázek č. 4: Chromatogram stanovovaných vitamínů při gradientové eluci č. 4
5. Obrázek č. 5: Kalibrační křivka kyseliny listové
6. Obrázek č. 6: Kalibrační křivka vitamínu B₂
7. Obrázek č. 7: Kalibrační křivka vitamínu A
8. Obrázek č. 8: Kalibrační křivka vitamínu E

Seznam tabulek

Tabulka I:	Zdroje vitamínů a jejich doporučené denní dávky
Tabulka II:	Referenční rozmezí vybraných vitamínů
Tabulka III:	Přehled publikovaných metod na stanovení vitamínů
Tabulka IV:	Příklady publikovaných LOQ
Tabulka V:	Koncentrace standardních roztoků vitamínů
Tabulka VI:	Rozmezí kontrol pro riboflavin a kyselinu listovou
Tabulka VII:	Rozmezí kontrol pro vitamíny A a E
Tabulka VIII:	Gradientové eluce
Tabulka IX:	Gradientová eluce č. 1 pro separaci vitamínů rozpustných ve vodě
Tabulka X:	Gradientová eluce č. 2 pro separaci vitamínů rozpustných v tucích
Tabulka XI:	Gradientová eluce č. 3
Tabulka XII:	Výsledný průběh gradientové eluce č. 4
Tabulka XIII:	Kvantifikační přechody, optimální hodnoty parametrů cone voltage a kolizní energie pro stanovované analyty
Tabulka XIV:	Výsledky testovaných postupů přípravy vzorku
Tabulka XV:	Dolní limit kvantifikace pro vitamín A, B ₂ , E a kyselinu listovou
Tabulka XVI:	Výsledky opakovatelnosti měření pro vitamín A, B ₂ , E a kyselinu listovou
Tabulka XVII:	Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro vitamín A, B ₂ , E a kyselinu listovou
Tabulka XVIII:	Výsledky pravdivosti měření pro vitamín B ₂ a kyselinu listovou
Tabulka XIX:	Výsledky pravdivosti měření pro vitamín E a A
Tabulka XX:	Koncentrace vitamínů naměřené u pacientů (muži)
Tabulka XXI:	Koncentrace vitamínů naměřené u pacientů (ženy)

ÚVOD

Vitamíny patří mezi mikronutrienty, bohužel lidský organismus není schopen je syntetizovat v dostatečném množství a proto je nutný jejich příjem potravou. Snížený příjem vitamínů je pro organismus obecně problematický a nejvíce jsou jím ohroženi lidé vyššího věku (převážně nad 65 let) zejména z důvodu neadekvátního složení stravy s nízkým obsahem mikronutrientů, což má za následek zvýšení morbidity. [1, 2]

Vitamíny se dělí podle rozpustnosti na rozpustné ve vodě a v tucích. Mezi vitamíny rozpustné ve vodě patří vitamín C (kyselina askorbová) a osm vitamínů skupiny B: B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin, kyselina nikotinová), B₅ (kyselina pantotenová), B₆ (pyridoxin), B₇ (biotin, vitamín H), B₉ (kyselina listová) a B₁₂ (kobalamin). Mezi vitamíny rozpustné v tucích se řadí vitamíny A (retinol), E (tokoferol), D (kalciferol), K (fylochinon) a karotenoidy. [2, 3]

Koncentraci vitamínů lze v séru, plazmě a moči stanovit imunochemickými, elektromigračními a chromatografickými metodami. Imunochemické metody jsou výhodné z hlediska nízké náročnosti na přípravu vzorku a rychlosti stanovení, v současnosti však stojí v popředí chromatografické metody ve spojení s hmotnostní detekcí umožňující stanovit současně koncentraci několika vitamínů v poměrně krátkém čase.

Cílem práce bylo:

1. zhodnocení možností a významu stanovení koncentrací vitamínů v biologických vzorcích
2. vývoj, optimalizace a validace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení kyseliny listové, vitamínu B₂, A a E
3. zavedení metody do rutinní praxe

Teoretická část

1. Vitamíny

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které se v lidském organismu účastní řady biochemických procesů. Obvykle se dělí podle rozpustnosti na vitamíny rozpustné ve vodě a v tucích. Terminologie není u vitamínů jednotná, používají se jak triviální názvy, tak i skupinová označení pro více látek s podobnou biologickou aktivitou. Označují se také velkými písmeny a případně číselným indexem. [2, 3]

Mezi vitamíny rozpustné ve vodě patří vitamín C (kyselina askorbová) a osm vitamínů skupiny B: B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin, kyselina nikotinová), B₅ (kyselina pantotenová), B₆ (pyridoxin), B₇ (biotin, vitamín H), B₉ (kyselina listová) a B₁₂ (kobalamin). Mezi vitamíny rozpustné v tucích patří vitamín A (retinol), vitamín E (tokoferol), vitamín D (kalciferol), vitamín K (fylochinon) a karotenoidy. Deficit vitamínů rozpustných v tucích je typický pro děti s cystickou fibrózou, naopak jejich nadměrný příjem může vést k hypervitaminóze, kdy mohou být kumulovány v tukové tkáni. Vitamíny rozpustné ve vodě v organismu nejsou ukládány a jejich vysoké dávky jsou dobře tolerovány, protože nevyužitá část je vylučována ledvinami. Případné hypovitaminózy způsobené nedostatečným příjmem potravou jsou u vitamínů rozpustných ve vodě v našich zeměpisných šířkách vzácností. [1-4]

1.1 Vitamín B₂

Riboflavin se skládá z heterocyklického isoalloxazinového jádra připojeného na alkohol ribitol. Je termostabilní, světlem se rozkládá.

Fosforylací riboflavinu v cytoplazmě za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) vzniká aktivní forma flavinmononukleotid (FMN). Druhou aktivní formou je flavinadenindinukleotid (FAD), který je syntetizován v další reakci s ATP, při níž je zbytek adenosinmonofosfát (AMP) z ATP přenesen na FMN. [2, 3, 5]

FMN a FAD slouží jako prosthetické skupiny oxidoredukčních enzymů označovaných také jako flavoproteiny. Mnohé flavoproteiny obsahují jeden nebo více kovů, např. molybden a železo, označované jako metaloflavoproteiny.[6] Flavoproteinové enzymy jsou součástí dehydrogenáz a oxidáz. Tím se podílí na řadě redoxních procesů, oxidativních fosforylací, syntézy a odbourávání mastných kyselin. Přestože se riboflavin

podílí na řadě metabolických reakcí, jeho nedostatek nezpůsobuje větší potíže. Mezi projevy jeho nedostatku patří fotofobie a zánět ústních koutků, rtů a jazyka. [3, 7] Absorpce riboflavinu probíhá v proximálním úseku tenkého střeva po hydrolýze vazebných koenzymů a je závislá na Na^+ . V krvi je riboflavin vázán na albumin a imunoglobuliny, jeho nadbytek je vylučován ledvinami. [3, 4, 6]

1.2 Kyselina listová

Kyselina listová (FA) a od ní odvozené foláty se skládají z pteridinu s navázanými molekulami kyseliny p-aminobenzoové a glutamové. FA je základní substancí více než 100 modifikovaných folátů.

Deriváty kyseliny listové jsou štěpeny ve střevě na monoglutamylfolát. Aktivní formou je tetrahydrofolát, který vzniká ve střevních buňkách redukcí enzymem folátreduktázou. Jednouhlíkové zbytky přenášené H_4 -folátem představují řadu různých stádií oxidace, jako je methyl, methylen, methenyl, formyl a formimin. Hlavním zdrojem methylenových jednouhlíkových zbytků je serin, tyto skupiny jsou reverzibilně přenášeny na H_4 -folát za vzniku glycinu a $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -methylentetrahydrofolátu. Ten je důležitý v metabolismu jednouhlíkových skupin, může být redukován na N^5 -methylentetrahydrofolát a má významnou roli při metylaci homocysteinu na methionin za pomoci methylkobalaminu jako kofaktoru a vitamínu B_{12} . Další možností je jeho oxidace na $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -methylentetrahydrofolát, který pak může být hydratován na N^5 -formyltetrahydrofolát (kyselina folinová) nebo N^{10} -formyltetrahydrofolát. $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -methylentetrahydrofolátu dodává methylovou skupinu pro tvorbu thimidylátu, nezbytného pro syntézu prekurzoru DNA a tvorbu erytrocytů. Dále se účastní syntézy purinů, metabolismu lipidů a hraje klíčovou roli v růstu, dělení a diferenciaci buněk. Velmi důležitý je příjem kyseliny listové v těhotenství jako prevence defektu neurální trubice plodu. [2, 3]

Polyglutamáty přijaté potravou jsou štěpeny enzymy střevní mukózy na dobře rozpustný monoglutamát, který je aktivně vstřebáván v proximální části tenkého střeva s pomocí glukózy či galaktózy. V plazmě je kyselina listová transportována jako volná nebo vázaná na albumin.

Deficit kyseliny listové může být způsoben nejen jejím sníženým příjmem v potravě, ale také malabsorpcí, hepatobiliárním onemocněním, zvýšeným katabolismem FA a některými léky (methotrexat, fenytoin). Mezi příznaky nedostatku kyseliny listové patří

makrocytární anemie, trombocytopenie, postižení gastrointestinálního traktu (pálení jazyka, záněty sliznic, průjmy, nevolnost) a neurologické a psychiatrické příznaky (deprese, psychická nestabilita). Nízké hladiny kyseliny listové jsou spojeny s vyšším rizikem onkologických a neurodegenerativních onemocnění. [1, 8-10] Mírný deficit kyseliny listové má vliv na patogenezi kardiovaskulárních onemocnění a aterosklerózy. Tento deficit vede ke zvýšení koncentrace homocysteinu, protože dostatečně neprobíhá regenerace methioninu z homocysteinu.[10, 11]

1.3 Vitamín A

Molekula retinolu je tvořena beta-jonovým kruhem a pěti konjugovanými dvojnými vazbami, z nichž čtyři jsou v postranním řetězci, které mohou vytvářet cis a trans-izomery. Pouze *all-trans* a *13-cis, trans* izomery jsou biologicky účinné. Retinol tvoří žluté jehlicovité krystaly a je nerozpustný ve vodě. Strukturně je podobný karotenoidům, z nichž může v organismu vznikat. [2, 3] Aktivita vitamínu A je v organismu zajištěna retinolem a jeho dvěma deriváty, retinalem a kyselinou retinovou. V játrech je retinol ukládán ve formě retinyl esteru v lipocytech a v plazmě je transportován vázaný na retinol-vázací protein. Kyselina retinová se v plazmě váže na albumin.

Vitamín A se podílí na mechanismu fotoresorpce světločivých elementů sítnice a na syntéze steroidů a glykoproteinů. Důležitý je také pro reprodukci a embryogenezi, buněčnou proliferaci a diferenciaci. Retinoidy mají protirakovinné účinky. [3, 5, 9, 10] Příznaky deficitu retinolu se projevují šeroslepostí, xeroftalmií, zánětem jazyka, keratinizací epitelálních buněk respiračního, gastrointestinálního a močového traktu, zvýšenou kazivostí zubů a nechutenstvím. Příznaky toxicity se mohou objevit při 20- násobném překročení doporučené denní dávky u dětí a 100- násobném u dospělých. U těhotných je tento vitamín při předávkování teratogenní. [3, 9, 10]

1.4 Vitamín E

Vitamín E zahrnuje čtyři tokoferoly a čtyři tokotrienoly patřící mezi deriváty 6-chromanolu substituovanými nasycenými (tokoferoly) nebo částečně nasycenými (tokotrienoly) izoprenoidy s postranními řetězci a jednou až třemi methylovými skupinami. Největší biologický význam má α -tokoferol, který je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v tucích.

Deriváty vitamínu E mají silné redukční vlastnosti, jsou přirozenými fluorescenty a jsou poměrně stabilní i při zvýšené teplotě a v alkalickém prostředí. α -tokoferol je intracelulární antioxidant, který inhibuje mutageny v zažívacím traktu a působí na integritu membrán buněk tím, že brání oxidaci volných radikálů. V plazmě je transportován lipoproteiny a působí synergicky se selenem. Snižuje potřebu selenu tím, že brání jeho vylučování z organismu. [2, 3, 5] Zvýšený přísun α -tokoferolu je nutný u těhotných a kojících žen a u novorozenců. Nemoci doprovázené zhoršenou resorpcí tuků mohou vést k jeho nedostatku a následně k neurologickým potížím vlivem morfologické a funkční změny periferních nervů, k rozvoji anémie a také ke zvýšené agregabilitě trombocytů. Příznaky deficitu vitamínu E jsou však u lidí vzácné. Zvýšené sérové koncentrace se naopak vyskytují při obstrukčních jaterních onemocněních a ledvinném selhání a jsou doprovázeny hyperlipidemií. [3, 5, 9, 10]

1.5 Zdroje vitamínů

V tabulce č. I jsou uvedeny zdroje příjmu a doporučené denní dávky pro jednotlivé vitamíny. Doporučené denní dávky jsou odlišné pro ženy a pro muže. [2, 10]

Tabulka I: Zdroje vitamínů a jejich doporučené denní dávky

vitamín	zdroj	doporučená denní dávka (mg)	
		ženy	muži
vitamín A	játra, mléčné výrobky, tučné ryby, vaječný žloutek	0,80	1,0
		1,10 (těhotné ženy)	
		senioři 1,50	
vitamín B ₂	sýry, vejce, játra, maso, brokolice, petržel, kvasnice, mléčné produkty	1,3 (< 50 let)	1,7 (< 50 let)
		1,1 (> 50 let)	1,3 (> 50 let)
vitamín E	obilné klíčky, mák, ořechy, vaječný žloutek	8-10 (< 50 let)	10 (< 50 let)
		15 (> 50 let)	15 (> 50 let)
		13 (těhotné ženy)	
kyselina listová	kvasnice, listová zelenina, ořechy, vnitřnosti (játra, ledviny), pomerančová šťáva	0,18 (< 50 let)	0,20 (< 50 let)
		0,40 (> 50 let)	0,40 (> 50 let)
		těhotné ženy 0,60	

1.6 Referenční rozmezí vitamínů

Vitamíny mohou být stanovovány v různých biologických maticích (sérum, plazma, moč). Pro některé vitamíny byly stanoveny referenční meze pro zmíněné matrice (Tab. II). [2]

Tabulka II: Referenční rozmezí vybraných vitamínů

vitamín	biologická matrice	referenční rozmezí ($\mu\text{mol/l}$)
vitamín B ₂	sérum	0,133-0,478
	plná krev	0,361-1,770
kyselina listová	sérum-dospělí	> 0,0135
	sérum-novorozenci	0,016-0,072
	erytrocyty	>0,360
vitamín A	sérum-muži	1,05-2,27
	sérum-ženy	0,83-1,75
	sérum-novorozenci	1,22-2,60
	sérum-děti	1,05-2,80
vitamín E	sérum-dospělí	19-35

2. Stabilita vitamínů s ohledem na podmínky uchovávání vzorků

Vitamíny jsou chemické látky, které jsou více či méně citlivé na světlo, teplotu, pH prostředí a složky biologické matrice.

Vitamín A v séru je stabilní při teplotě +20 až +25 °C po dobu 2 dnů, při teplotě +4 až +8 °C 1 týden a při teplotě -20 °C 1 rok. [12] Zásobní roztoky vitamínu A jsou stabilní 8 měsíců uložené při teplotě -70 °C. Extrahované vzorky udržované v autosampleru při teplotě 4 °C jsou stabilní 1 týden. [13]

Vitamín E v séru je stabilní při teplotě +20 až +25 °C 3 dny, při teplotě +4 až +8 °C 4 týdny a při teplotě -20 °C 20 týdnů [12], při -20 °C 3 měsíce. [14] Zásobní roztoky jsou stabilní při teplotě -20 °C po dobu 6 měsíců [14] a při teplotě -70 °C 8 měsíců. [13] Na základě publikovaných dat je obecně vhodné zásobní roztoky vitamínů skladovat při teplotě -70 až -80 °C, přičemž zásobní roztoky vitamínů použité pro tuto rigorózní práci byly uloženy při teplotě -80 °C. V autosampleru jsou extrahované vzorky stabilní při teplotě -4 °C 1 týden. [13]

Khan a kol. testovali stabilitu *all-trans* retinolu a α -tokoferolu v séru a standardních roztocích, kdy při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly standardní roztoky stabilní nejméně jeden měsíc a vitamíny obohacené sérum 24 hod. Při běžné laboratorní teplotě zásobní roztoky ani sérum obohacené o vitamíny stabilní nebyly. [15]

V práci autorů Karppi a kol. byla testována rovněž stabilita retinolu, α -tokoferolu a karotenoidů v extrahovaném vzorku uloženém v autosampleru při teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 týdne. Koncentrace retinolu se zvýšila o 16 %, což naznačuje, že došlo k odpaření rozpouštědla v lahvičce, zatímco molekula retinolu zůstala v průběhu testovaného období stabilní. Výška píku vnitřního standardu se snížila o 7 %, a to poukazuje na jeho degradaci v průběhu testovaného období. V případě hladiny tokoferolu a dalších karotenoidů byl zjištěn mírný pokles. Zásobní roztoky retinolu, α -tokoferolu a karotenoidů obsahující 0,01% (v/v) butylhydroxytoluenu byly při skladování při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabilní po dobu 8 měsíců. [13]

Kyselina listová je stabilní v séru při teplotě $+20$ až $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ pouze 30 minut, při teplotě $+4$ až $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 hodin a při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 týdnů. [12] De Brower a kol. popsali, že kyselina listová (FA) a kyselina 5-methyltetrahydrolistová (5-M-THF) byly relativně stabilní při různém pH (2-10) ať s nebo bez tepelné úpravy ve fosfátovém pufru obsahujícím 1% kyselinu askorbovou (v/v) a 2% 2-merkptoethanol (v/v). [16] Kirsch a kol. zjistili, že FA a 5-M-THF jsou stabilní při teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu více než 24 hodin ve vodném roztoku s nebo bez přídavku kyseliny askorbové při různém pH. [17] Zheng a kol. testovali stabilitu FA a 5-M-THF v plazmě na třech koncentračních hladinách (1, 10 a $100\text{ }\mu\text{g/ml}$) a zjistili, že FA a 5-M-THF v plazmě rychleji degraduje bez přídavku 2-merkptoethanolu. Testováním také ověřili, že FA a 5-M-THF jsou stabilní 7,5 hodiny při laboratorní teplotě a 50 dní při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a to jak primární vzorek, tak i extrakt. Vzorek byl stabilní v autosampleru při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ 10 hodin, při laboratorní teplotě 12 hodin a při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 hodin. [18]

Vitamín B₂ je stabilní v plazmě uložené ve tmě při teplotách $+20$ až $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 dny (CV $<20\text{ }%$). [19] Koncentrace riboflavinu v extrahovaném vzorku uloženém při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ 24 hodin ve tmě byly porovnávány s koncentracemi naměřenými ihned po úpravě vzorku. Průměrný negativní bias 2,9 % poukazuje na relativní stabilitu extrahovaného vzorku po více než 24 hodin. [19] Hustad testoval stabilitu vitamín B₂, FMN a FAD v plné krvi, v hemolyzované krvi a v plazmě. Vitamíny byly stabilní nejméně 5 hodin v plné krvi a nejméně 1 hodinu v krvi s 1% hemolýzou. Koncentrace FMN a FAD 1% hemolýza neovlivnila. Vzorky plazmy

s endogenními vitamíny a vzorky plazmy doplněné o 500 nmol/l riboflavinem, FNM nebo FAD byly uloženy ve tmě při teplotě +23 °C po dobu 1, 4, 8 a 14 dní. Bylo zjištěno, že v plazmě je vitamín B₂, FNM a FDA stabilní 14 dní. [6]

3. Metody stanovení vitamínů

Vitamíny lze stanovit imunochemickými, [20-22] elektromigračními a chromatografickými metodami. [6, 23-26] Imunochemické metody jsou výhodné z hlediska nízké náročnosti na přípravu vzorku a rychlosti stanovení. K analýze se používá sérum nebo plazma bez předchozí úpravy. Určitým problémem je zde omezená nabídka komerčních kitů.

Z elektromigračních metod se v analýze vitamínů v potravinách, farmaceutických a biologických vzorcích uplatňuje hlavně kapilární elektroforéza (CE), [27] kapilární zónová elektroforéza (CZE) [26, 28-31] a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). [24, 32, 33] Výhodou CE je krátká doba analýzy, nízká cena činidel a minimální spotřeba vzorku.[4] V současné době se CE, CZE a MECK používají ve spojení s UV detekcí [26, 28, 29, 32], laserově indukovanou fluorescenční detekcí [27] a hmotnostní detekcí, což umožňuje jejich široké využití. [4, 34]

V současnosti se však nejčastěji pro stanovení vitamínů ve vzorcích s různou maticí (potravin, potravinové doplňky, biologické vzorky) využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV-VIS, fluorescenční [35], elektrochemickou a hmotnostní detekcí. [36-40] Taguchi a kol. vyvinuli pro stanovení vitamínů rozpustných ve vodě a v tučných metodou založenou na spojení superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní detekcí. [41]

2.1 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi pokročilé a instrumentálně náročné separační metody s širokou oblastí použití. Lze jí analyzovat asi 80 % veškerých známých látek, a to ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Metoda je založena na ustálení rovnováhy mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi (mobilní a stacionární). Pohyblivou mobilní fází je kapalina, tj. eluční činidlo (rozpuštědlo, pufr apod.), kterým jsou jednotlivé složky z kolony vymývány. Mobilní fáze však nesmí porušovat stacionární fázi v koloně ani při

delším používání a neměla by poškozovat kapiláry a spojovací části kapalinového chromatografu (např. tetrahydrofuran, který leptá PEEKové kapiláry). [42] Rozpoštědla pro přípravu mobilních fází by měla mít dostatečnou čistotu, tj. HPLC grade případně hypergrade pro hmotnostní spektrometrii. Jejich viskozita a toxicita by měly být co nejnižší. Mobilní fáze měla by stabilní po dlouhou dobu a poskytovat minimální signál v detektoru. [43, 44]

Mobilní fáze unáší vzorek kolonou, ve které dochází k separaci na základě opakovaných interakcí se stacionární fází. Touto interakcí jsou složky vzorku selektivně brzděny v pohybu, míra brzdění je úměrná vazebné síle interakce. Afinitu analytů ke stacionární fázi lze vyjádřit jako distribuční konstantu (K_D), která je dána podílem koncentrace složky ve stacionární fázi ke koncentraci složky v mobilní fázi. Složky vzorku s odlišnými K_D budou (při dostatečné účinnosti chromatografického děje) od sebe odděleny a u složek se stejnou K_D nedojde k rozdělení při průchodu separačním prostorem. K_D nezávisí pouze na vlastnostech separované látky, ale také na vlastnostech mobilní a stacionární fáze. Z toho plyne, že jedna látka může mít několik různých hodnot K_D v závislosti na použité mobilní a stacionární fázi. [45]

Nepohyblivou, tj. stacionární fázi tvoří materiál, kterým je plněna chromatografická kolona, a který se volí podle povahy analyzovaných látek. Stacionární fáze lze dělit podle chromatografického módu, který je použit pro separaci na normální, reverzní, ionexy, HILIC, HIC, gelové a afinitní. Další možností je rozdělení stacionární fáze podle chemického složení. Běžné jsou tyto skupiny fází: a) anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, hlinitý a titaničitý), b) chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, c) polymerní fáze, d) hybridní fáze, e) stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku. Významná je také forma stacionární fáze. Rozeznávají se fáze částicové, které jsou běžnější, a fáze monolitické. Částice konvenčních stacionárních fází jsou charakterizovány několika parametry: a) průměrnou velikostí částic a distribucí velikostí částic, tvarem částic, měrným objemem pórů a relativním objemem pórů, měrným povrchem a průměrnou hodnotou velikostí pórů. [46] Separační fáze monolitická je tvořena jedním kusem porézního pevného materiálu. Oproti klasickým kolonám s velikostí částic 3-5 μm mají lepší hydrodynamické vlastnosti a dosahují obdobnou nebo vyšší účinnost separace při nižším zpětném tlaku. [47, 48] Monolitické kolony byly použity pro stanovení vitamínu C v plazmě [49] a vitamínů A a E v séru. [50]

2.2 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC) umožňuje vysokou účinnost separace použitím částic chromatografického sorbentu s průměrem pod dva mikrometry. Efektivní separace na stacionárních fázích s malými částicemi probíhá za vysokých zpětných tlaků (100 MPa a více). [51].

Na stacionární fázi jsou kladeny zvýšené nároky s ohledem na mechanickou stabilitu sorbentu. Tyto nároky velmi dobře splňuje silikagel, přičemž nejčastěji je využíván porézní silikagel (částice sorbentu má póry v celém svém objemu). Vedle plně porézních částic se s výhodou používají i částice povrchově porézní, které jsou podobné částicím neporézním, ale mají větší nepropustné jádro a vrstva stacionární fáze je silnější. Tlaky na koloně plněné těmito částicemi jsou nižší než na kolonách s neporézními sorbenty, naopak sorpční kapacita je větší a oproti plně porézním částicím je dosaženo lepší účinnosti separace. [52] Velmi populární jsou i hybridní sorbenty. Nové hybridní stacionární fáze jsou tvořeny kombinací anorganického silikagelu a polymeru. Tyto fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu, s nejlepšími vlastnostmi polymerů. Vyznačují se rovněž chemickou a teplotní stabilitou a nižším množstvím volných silanolových skupin na povrchu částic, které jsou nepříznivé pro separaci většiny látek. [46, 48, 52]

Pro analýzu vitamínů jsou v současné době nejčastěji používány částice o velikosti 1,5-5,0 μm plněné do kolon o délce 50-250 mm, viz kapitola 6 „Přehled publikovaných metod pro stanovení vitamínů“. Wang a kol. testovali pro stanovení metabolitů kyseliny listové pět kolon: Ultimate AQ-C18 (250 mm x 4,6 mm I.D., 5 μm), Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm x 50 mm I.D., 1,8 μm), Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm x 100 mm I.D., 1,8 μm), Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm x 50 mm I.D., 1,7 μm) a Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm x 100 mm I.D., 1,7 μm). Nejlepší separace a nejkratších retenčních časů bylo dosaženo při použití kolony Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm x 50 mm I.D. 1,7 μm Waters, USA). [36].

2.3 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

V současnosti se často využívá spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Řada hmotnostních spektrometrů umožňuje poměrně rychlé skenování (typicky jednotky-desítky Hz podle použitého analyzátoru). To dovoluje jejich spojení s vysoko a ultra-vysokoučinnými chromatografickými technikami. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které ionty vytvoří, převede je do plynného stavu a následně do vakua. Plynnou směs iontů a jejich fragmentů potom separuje podle jejich efektivních hmotností m/z . Principy a vlastnosti běžně používaných hmotnostních spektrometrů jsou diskutovány v přehledových člancích El-Aneed a kol. [53] a Ho a kol. [54] Pro analýzu biologických materiálů je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií velmi výhodné, protože přináší synergisticky efektivní přečištění vzorků, separaci jednotlivých složek i řadu informací pro jejich identifikaci. Hlavním aspektem tohoto spojení s ohledem na analýzu biologických materiálů je věnováno několik prací. [51, 55-57]

Pro analýzu některých vitamínů, jako např. isomerů vitamínu E, vitamínů B₂ a B₆ se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu. [35, 58-60] Nimalaratne a kol. naproti tomu použili pro stanovení devíti vitamínů rozpustných v tucích a jejich derivátů v potravinových doplncích a dětské výživě chemickou ionizaci za atmosférického tlaku. Výhodou zde byla nižší citlivost k matricovým efektům než je tomu u elektrospreje. [61]. Mezi hmotnostní analyzátory používané při analýze vitamínů patří trojitý kvadrupól nebo průletový analyzátor (TOF) [7], případně kombinace kvadrupólu a průletového analyzátoru (Q-TOF). [62] Kromě nejběžnějšího iontového zdroje ESI lze ke stanovení vitamínů použít i desorpce-ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI) ve spojení s TOF analyzátorem. Toto spojení se kromě vitamínů využívá hlavně pro analýzu proteinů, DNA a lipidů. MALDI je stejně jako ESI velmi citlivá ionizační technika. [53] Mandal a kol. ve své práci použili desorpce-ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI) ve spojení s průletovým analyzátorem pro stanovení riboflavinu a kobalaminu v moči. [7]

4. Matricový efekt při UHPLC-MS analýze

Stanovování analytů za použití UHPLC-MS může být ovlivněno matricovými efekty, které lze definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látek vycházejících z kolony spolu s analyzovanou látkou (zejména organické a anorganické makrosložky přítomné ve vzorku, metabolity, degradační produkty a další). Matricové efekty vznikají jako výsledek soupeření mezi složkami matrice a analytem při produkci iontů. Mechanismů, které způsobují matricové efekty, je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny. Rozdíly v mechanismech ovlivnění ionizace se samozřejmě liší i podle použité ionizační techniky. Předpokládá se, že hlavní příčina vychází z principu ionizace. Matricový efekt může zahrnovat jak potlačení tak zvýšení ionizace. Matricové efekty nejsou předvídatelné a mohou být způsobeny celou řadou látek. Za všechny je vhodné zmínit endogenní fosfolipidy u vzorků s biologickou matricí, některé složky mobilní fáze a exogenní látky, jako jsou polymery obsažené v různých odběrových plastických nádobách nebo některá antikoagulantia (např. heparin litný), ale také přítomnost aditiv (kyseliny, zásady a pufrů) v mobilní fázi. Mezi běžně používaná aditiva patří kyselina trifluoroctová (TFA), mravenčí, octová, hydroxid amonný, octan amonný a mravenčan amonný. Optimální koncentrace aditiv mohou zlepšit ionizaci stanovovaného analytu. Ionizace za atmosferického tlaku (APCI) je vůči matricovým efektům méně citlivá než elektrosprej. [51, 63, 64] Mallet a kol. sledovali vliv různých aditiv (kyselina mravenčí, octová, trifluoroctová, hydroxid amonný, mravenčan amonný a bifosfát amonný) v mobilní fázi na intenzitu MS signálu. [65]

Pro hodnocení matricového efektu se běžně používají dvě metody, a to metoda post-kolonové infúze a metoda post-extrakčního přídatku. Post-kolonovou infúzí se zjišťuje kvalitativní matricový efekt, kdy je na kolonu nastříkovan slepý vzorek a za kolonu je přímou infúzí přimícháván roztok analytu. Změny v odezvě analytu zapříčiněné složkami slepého vzorku separovanými na koloně potom ukazují, na které části chromatogramu dochází k matricovým efektům. Tento způsob lze použít u stanovení s malým počtem analytů nebo u vzorků se stejnou biologickou matricí. U metod s velkým počtem stanovovaných analytů se používá metoda post-extrakčního přídatku. Matricový efekt je zde zjišťován přímo řadou analýz. Měří se několik vzorků o stejné koncentraci analytu a vnitřního standardu v roztocích bez matrice a s matricí. Jako blank matrice se použije stejná matrice vzorku jako pro přípravu standardů nebo kalibrátorů, který se získá od více dárců. Za matricový efekt je považováno, jestliže rozdíl odezvy ve vzorcích s matricí je

větší než 15 % oproti odezvě ve vzorcích bez matrice. Pokud je nižší, lze metodu použít ke kvantifikaci. Pro testování matricového efektu by mělo být použito nejméně pět vzorků z různých zdrojů. [51, 63]

5. Úprava vzorku

Vitamíny jsou stanovovány v potravinách, potravinových doplncích a ve vzorcích s biologickou matricí (krev, sérum, plazma, moč, likvor). Vzhledem ke komplexnosti těchto vzorků je obvykle nezbytné provést před analýzou jejich vhodnou úpravu. U biologických vzorků se nejčastěji používá precipitace proteinů (PP), extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce na tuhou fázi (SPE) nebo jejich kombinace. Rychlým a jednoduchým způsobem úpravy vzorku je precipitace proteinů pomocí methanolu [36], acetonitrilu [66], kyseliny trichloroctové [67], kyseliny chloristé nebo jejich kombinace. Midttun a kol. stejně jako Lu a kol. ve své práci použili kyselinu trichloroctovou (TCA). [59, 68] Nelson a kol. použili pro precipitaci proteinů v séru a v plazmě 50% kyselinu metafosforečnou (m/m), [39] Losa a kol. 7,2% kyselinu chloristou. [69] Liu a kol. testovali výtěžnost PP za pomoci acetonitrilu, methanolu a 20% kyseliny chloristé. Zjistili, že acetonitril nemá signifikantní vliv na odezvu v porovnání s ostatními dvěma testovanými médii. [66] Wang a kol. pro PP v séru zvolili methanol. [36] Zheng a kol. provedli PP pomocí směsi metanolu, 10 mg/ml 2-merkaptoethanolu a 0,025% (v/v) hydroxidu amonného. [18]

Nevýhodou precipitace proteinů je, že neposkytuje čistý extrakt. Nedojde totiž k účinnému odstranění solí a lipidů (hlavně fosfolipidů), které mohou být jednou z příčin matricového efektu, přičemž methanolvý extrakt obsahuje více reziduí fosfolipidů než acetonitrilový extrakt. Vysoká účinnost precipitace proteinů je dosažena směsí methanolu a acetonitrilu v poměru 2:1, zde je uváděna účinnost 98 % a vyšší. [51, 63]

Klasická extrakce kapalina-kapalina je často používaná a velmi důležitá analytická separační metoda. Oproti PP poskytuje čistější extrakt. Přesto má své nevýhody, jako je používání nebezpečných chemikálií, v některých případech použití velkého objemu vzorku a konečný extrakt nemusí být kompatibilní s počátečními podmínkami separace na reverzní fázi. V takovém případě je nutné odpaření extrakčního činidla ze vzorku a následné rozpuštění odparu v mobilní fázi. [63] Základem této extrakce je kvalitativní pravidlo „podobné se rozpouští v podobném.“ Pro zvýšení extrakční účinnosti a vyšší čistoty extraktu se používá vícezkroková extrakce nebo kombinace jednotlivých extrakčních

činidel. Může se také volit kombinace precipitace proteinu s extrakcí kapalina-kapalina, což zvýší účinnost extrakce a čistotu vzorku. [13, 14, 70] LLE hexanem je často využívána pro přípravu vzorků k analýze vitamínů rozpustných v tucích. Karppi a kol. použili při stanovení retinolu, α -tokoferolu a šesti karotenoidů v plazmě pro přípravu vzorků kombinací precipitace proteinu pomocí ethanolu a LLE pomocí hexanu. [13] Stejný postup pro stanovení retinolu a α -tokoferolu byl zvolen i v další práci, výtěžnost zde byla uváděna 93%. [70] Podobný postup při přípravě vzorku na stanovení retinolu a retinol-palmitátu zvolili Breemen a kol. [71] Karpinska a kol. pro stanovení retinolu, α -tokoferolu a koenzymu Q₁₀ v plazmě použili PPT methanolem a následně LLE do hexanu. [72] Khan a kol. ve své práci na stanovení *all-trans* retinolu a α -tokoferolu použili pro PP ethanol:methanol (95:5, v/v), následovala LLE směsí n-hexanu:dichlormethanu (70:30, v/v). [15]

Velmi populárním postupem úpravy vzorku je i extrakce na tuhou fázi (SPE). Jako pevná fáze se využívá silikagel, oxid hlinitý (polární fáze) nebo reverzní fáze C₁₈ (nepolární fáze). SPE má několik výhod oproti tradiční LLE. Disponuje obvykle vyšší selektivitou a poskytuje jak čistější extrakty, tak vyšší výtěžnost. Významnou výhodou je možnost automatizace (tzv. on-line SPE) a dále schopnost zakoncentrování vzorku. Současně může ale dojít i k zakoncentrování látek, které mohou být příčinou matricového efektu. Z tohoto důvodu je třeba optimalizovat selektivitu celého přečištění, tj. složení promývacího a elučního roztoku. SPE je možné kombinovat s PP i s LLE v závislosti na „znečištění vzorku“. [51, 64]

SPE je používáno pro stanovení vitamínů v potravinách, potravinových doplňcích [38] a multivitaminových přípravcích. [73] On-line SPE byla použita pro přípravu vzorků na stanovení kyseliny listové a jejich katabolitů v séru, mateřském mléce a moči. SPE byla provedena na cartridge Hysphere MM anion exchange (10 mm x 2 mm, částice 25-35 μ m) Spark Holland. [74] Kirsch a kol. použili pro stanovení folátů v séru kolonky Oasis MAX (Waters). [17] V další práci byly pro stanovení 5-methyltetrahydrolistové kyseliny v séru a plazmě použity kolonky Sep-Pak Vac 3cc (Waters). [39]

6. Přehled publikovaných metod na stanovení vitamínů

Vitamíny jsou stanovovány v potravinách, jako je dětská výživa, zelenina, rostlinné oleje, vaječný žloutek a mouka [35, 37, 38], dále v potravinových doplňcích (multivitaminové tablety) [73, 75] a v neposlední řadě v biologických vzorcích (plazma, sérum, moč). [14, 19, 67, 70, 76] Pro separaci vitamínů autoři nejčastěji volili kolony se stacionární fází C_{18} (např. Zorbax-EclipseXDB- C_{18} , Tracer Spherisorb ODS 2 C_{18} , Nova-Pak C_{18}) – (viz. Tab. III), případně C_8 [77]. Pouze Pinheiro-Sant'Ana a kol. použili pro separaci isomerů vitamínu E (α , β , γ , δ) a tokotrienů (α , β , γ , δ) v potravinách stacionární fází s normální fází (NP LiChrosorb Si60). [35] S volbou stacionární fáze v systému reverzní fáze souvisí složení mobilních fází. Při použití spektrofotometrických a fluorescenčních detektorů se používá methanol, acetonitril, voda, dihydrogenfosforečnan draselný, octan amonný, octan sodný, tetrahydrofuran a jejich kombinace (viz. Tab III). [19, 35, 37, 38, 70] Při LC/MS experimentech se pro přípravu mobilní fáze používají směsi vody a acetonitrilu nebo metanolu, často s přidavkem kyseliny mravenčí, octové nebo octanu amonného nebo mravenčanu amonného. [36, 39] Jak bylo zmíněno výše, při použití hmotnostní spektrometrie se nejčastěji volí jako způsob ionizace elektrosprej ve spojení s trojitým kvadrupólem [7, 36, 39, 75, 77], ve dvou pracech byla použita ionizace za atmosférického tlaku. [61, 71]

V následující tabulce jsou uvedeny příklady stanovení vitamínů v potravinách a potravinových doplňcích, způsoby úpravy vzorků, složení mobilní fáze, použité stacionární fáze a způsob detekce.

Tabulka III: Přehled publikovaných metod na stanovení vitamínů

Látka	materiál	příprava vzorku	vnitřní standard	mobilní fáze	stacionární fáze	detekce	odkaz
Riboflavin	plazma	PP-15% trichloroctová kyselina		MF A: dihydrogenfosforečnan draselný (20 mM, pH 2,5):methanol (75:25, v/v), mobilní fáze B: 100% methanol	RP Zorbax SB-C ₁₈ (3,0 x 50 mm, 1,8 μm)	fluorescenční	[19]
Isomery vitamínu E (α,β,γ,δ) a tokotrienů (α,β,γ,δ)	zelenina, rostlinné oleje, vaječný žloutek, mouka	LLE-hexan:ethylacetát (85:15,v/v)		hexan:isopropanol:kyselina octová (98:0,6:0,5, v/v/v)	NP LiChrosorb Si60 (250 x 4 mm, 5 μm)	fluorescenční	[35]
Nikotinamid, thiamin, riboflavin, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin, kyselina listová, kobalamin	umělé mateřské mléko	PP-4% trichloroctová kyselina		methanol:voda (15:85, v/v), 5 mmol/l oktansulfonová kyselina, 0,5% triethylamin	Tracer Spherisorb ODS 2 C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)	UV-VIS	[38]
Thiamin, riboflavin	cereálie	kyselá a enzymatická hydrolýza		12,5 mM octan sodný ve směsi metanol/voda (25:75, v/v): 2,5 mM heptasulfonát sodný	Purospher STAR RP-18e (250 x 4 mm, 5 μm)	UV-VIS	[37]
Thiamin, pyridoxal, nikotinamid, riboflavin, kobalamin, retinol, cholekalciferol, tokoferol	multivitaminové přípravky	SPE, SPEC C18 AR 3 ml		vitamíny rozpustné ve vodě: MF A: 0,05M octan amonný, MF B: methanol; vitamíny rozpustné v tucích: methanol:acetonitril (95:5, v/v)	RP Nova-Pack C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	UV-VIS	[73]
Retinol, α-tokoferol, α-karoten, β-karoten, lykopen, lutein, β-kryptoxantin	plazma	PP-ethanol, LLE-hexan	retinol acetát, tokoferol acetát	methanol:acetonitril:tetrahydrofuran (75:20:5,v/v/v) s 0,01% kyseliny askorbové	RP Nucleosid ODS1 (3,2 x 250 mm, 5 μm)	UV-VIS	[76]
Retinol, α-tokoferol	plazma	PP-ethanol, LLE-hexan	retinol acetát	100% methanol	Supelcosil (75 x 4,6 mm, 3 μm)	DAD	[70]

DAD –detektor diodového pole, LLE-extrakce kapalina-kapalina, MF-mobilní fáze, PP-precipitace proteinů, SPE-extrakce na tuhé fázi, UV-VIS – ultravioletová-viditelná oblast světla,

Tabulka III: Přehled publikovaných metod na stanovení vitamínů

Látka	materiál	příprava vzorku	vnitřní standard	mobilní fáze	stacionární fáze	detekce	odkaz
24,25-(OH) ₂ vitamín D ₃ , 25-(OH) vitamín D ₃ , vitamín A, vitamín E	plazma	PP-ethanol, LLE- n-hexan	retinol acetát	gradient MF: methanol: voda (90:10, v/v), lineární gradient do 4 min methanol: isopropanol (90:10, v/v), od 15. min methanol:isopropanol (50:50, v/v), 25. min methanol: voda (90:10, v/v)	Ultrabase C ₁₈ (250x4 mm, 5μm)	DAD	[14]
Retinol, lutein, zeaxanthin, β-kryptoxantin, lykopen, α-karoten, β-karoten, α-tokoferol,	plazma	PP-ethanol-0,01% BHT (w/v), LLE-hexan-0,01% BHT (w/v)	β-Apo-8'-karotenal, α-tokoferol acetát	acetonitril:methanol:chloroform (60:25:15, v/v/v) s příměsí 0,01% terc-butylhydroxytoluen	Synergy Hydro-RP 80A, (150x4,6 mm, 4μm) Phenomenex C ₁₈	DAD	[13]
Thiamin, riboflavin, nikotinamid, kyselina nikotinová, pyridoxin, pyridoxal, kyselina listová, kobalamin, inosin	dětská výživa, cereálie, ovocné produkty	hydrolyza, homogenizace	metoda externího standardu	gradient: 0-13 min 10 mM fosfátový pufr, 13-14 min lineární gradient acetonitril:fosfátový pufr (6:94,v/v), 14-20 min acetonitril:fosfátový pufr (6:94,v/v), 20-21 min lineární gradient acetonitril:fosfátový pufr (12:88,v/v), 21-31 min acetonitril:fosfátový pufr (12:88,v/v), 31-46 min 10 mM fosfátový pufr	RP-Amide-C ₁₈ , 5 μm	PAD	[78]
Thiamin, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin, kobalamin	živočišné a rostlinné potraviny	enzymatická hydrolyza		methanol: fosfátový pufr (10:90, v/v) s přísávkem 18 mM triethylaminu, pH 3,55	RP C ₁₈ (250x4,6 mm, 5μm)	DAD a elektrochemická	[40]
5-methyltetrahydrolistová kyselina	plazma, sérum	SPE, Sep-Pac Vac 3cc SPE kolona (C ₁₈ , 500 mg)	13C5-methyltetrahydro-listová kyselina	MF A: kyselina mravenčí:voda (0,01:99,9, v/v), MF B: kyselina mravenčí: methanol (0,01:99,9, v/v) , 25 mmol/l mravenčan amonný ve vodě: 25 mmol/l mravenčan amonný v methanolu	RP Ace C ₁₈ kolona (150x4,6 mm, 5μm) NovaPak phenyl RP Ace C ₁₈ kolona, (150x3,9 mm, 4μm)	ESI-MS/MS	[39]
Kyselina listová, 5-methyltetrahydrofolát, 5-formyltetrahydrofolát, homocystein, S-adenosylmethionin, S-adenosylhomocystein	sérum	PP-methanol		MF A: kyselina mravenčí:voda (0,1:99,9, v/v) MF B: acetonitril	Acquity BEH C ₁₈ (2,1x50 mm, 1,7 μm)	ESI-MS/MS	[36]
Thiamin, riboflavin, kyselina pantotenová, pyridoxin, biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, nikotinamid, kyselina nikotinová, taurin	multivitaminové tablety	extrakce v alkalickém prostředí	kyselina hippurová	MF A: 5mM heptafluorobutanová kyselina MF B:methanol	Johnson Spherigel C ₁₈ silica (250x4,6 mm, 5μm)	ESI-MS/MS	[75]

BHT-terc-butylhydroxytoluen, DAD(PDA)-detektor diodového pole, ESI-elektrosprej, MF-mobilní fáze, LLE-extrakce kapalina-kapalina, PP-precipitace proteinů, SPE-extrakce na tuhé fázi, MS/MS - tandemová hmotnostní spektrometrie

Tabulka III: Přehled publikovaných metod na stanovení vitamínů

Látka	materiál	příprava vzorku	vnitřní standard	mobilní fáze	stacionární fáze	detekce	odkaz
Pyridoxal, pyridoxin 5'-fosfát, pyridoxamin, pyridoxamin 5'-fosfát, 4-pyridoxalová kyselina, riboflavin, flavinmononukleotid, flavinadeninukleotid	plazma	PP-TCA (50g/l)	d ₂ -pyridoxal 5'-fosfát, d ₃ -pyridoxal, d ₈ -riboflavin	MF A: 650 mM kyselina octová, MF B: 100 mM kyselina heptafluorobutanová, MF C: 90% acetonitril	RP SB C ₈ (150x4,6 mm, 3,5μm)	ESI-MS/MS	[77]
Riboflavin, kobalamin	moč	PP-krystaly kyseliny šťavelové	metoda externího standardu	metanol: 1 mM trifluorooctová kyselina (1:4, v/v)	Zorbax-EclipseXDB-C ₁₈ (150x4,6 mm, 5μm)	UV-VIS, MALDI-TOF	[7]
Thiamin, riboflavin, nikotinamid, kyselina pantotenová, pyridoxal, kyselina listová, α-tokoferol, β-karoten	listová zelenina	LLE	kyselina hippurová, trans-β-Apo-8'-karoten	*MF A: 10 mM octan amonný, MF B: kyselina octová:methanol (0,01:99,9, v/v), MF C: kyselina octová:methanol (0,03:99,7, v/v) **methyl-terc-butyl ether: methanol:voda:triethylamin (90:10:4:0,1, v/v/v/v)	*ACE-100 C ₁₈ (100x2,1 mm, 3 μm) **YMC C ₃₀ (250x4,6 mm, 5μm)	DAD ESI-MS/MS	[58]
Riboflavin, 5 forem vitamínu B6 (pyridoxal 5'-fosfát, pyridoxal, kys. 4'- pyridoxalová, pyridoxin, pyridoxamin), tryptofan, 6 metabolitů tryptofanu (kynurinin, kys. kynureninová, kys. anthranilátová, 3-hydroxykynurenin, 3- hydroxyanthranilát, xanthureninová kyselina), cystation, neopterin, kotinin	plazma	PP-TCA (60g/l)	2H8-riboflavin, 2H3-pyridoxal, 2H4-pyridoxin, 2H2-PA, 2H2-HAA, 2H4-AA, 2H5-tryptofan, 2H5-KA, 2H5-cystathion, 2H3-kotinin	MF A: 600 mM kyselina octová MF B: 100 mM kyselina tetrafluorobutanová MF C: acetonitril	RP Zorbax SB-C ₈ (150x4,6 mm, 3,5μm)	ESI-MS/MS	[59]
Retinol, retinol palmitát	sérum	PP-ethanol, LLE hexan	retinol acetát	MF A: methanol:voda:kyselina octová (50:50:0,5, v/v/v) MF B: methanol:methyl-terc-butylether:kyselina octová (50:50:0,5, v/v/v)	RP-YMC C ₃₀ (100x2,0 mm)	APCI-MS/MS	[71]
Retinol, retinol acetát, retinol palmitát, cholekalciferol, α,β,γ,δ-tokoferol, α-tokoferol acetát, β-karoten, lutein, zexantin	doplňky stravy, dětská výživa	LLE-hexan:ethylacetát (9:1, v/v s 0,01% BHT)		mobilní fáze A: methanol:voda (90:10, v/v) mobilní fáze B: methyl-terc-butylether:methanol (80:20, v/v)	RP-YMC C ₃₀ (100x2,0 mm, 3μm)	APCI-MS/MS	[61]

APCI-MS/MS- chemická ionizace za atmosferického tlaku ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, BHT-terc-butylhydroxytoluen, DAD-detektor diodového pole, ESI-MS/MS elektrosprej ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, MALDI-TOF - desorpce/ionizace laser za přítomnosti matrice ve spojení s průletovým analyzátoem, MF- mobilní fáze, LLE-extrakce kapalina-kapalina, PP-precipitace proteinů, SPE-extrakce na tuhé fázi, TCA- kyselina trichlorooctová, UV-VIS - ultravialová-viditelná oblast světla, * složení MF pro separaci vitamínů rozpustných ve vodě, ** složení MF pro separaci vitamínů rozpustných v tucích

7. Validace metody

Validace metody se provádí pro každou novou analytickou metodu či metodu převzatou z literatury. Jedná se o proces, který má prokázat schopnost dané metody poskytovat přesné, správné a pravdivé výsledky. Validace metody by se měla řídit pravidly pro validace analytických metod např. „Guideline on bioanalytical method validation“ dle EMA [79] nebo „Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation“ dle FDA.[80] Hlavními charakteristikami analytické metody, které jsou nezbytné k zajištění spolehlivosti analytických výsledků: selektivita, mez detekce a kvantifikace, funkce odezvy a rozsah kalibrace, linearita, přesnost, preciznost a robustnost. Dále zde patří zjištění matricového efektu, stabilita analytu (analytů) v biologické matrici a stabilita analytu a vnitřního standardu v zásobních roztocích a extraktech po celou dobu skladování. [81, 82] Stabilita jednotlivých analytů je podrobně popsána v kapitole 2. „Stabilita vitamínů“.

7.1 Vnitřní standardy

Pro kvantifikaci analytu v neznámém vzorku je nutné použít vhodný vnitřní standard (IS), který má podobnou strukturu jako stanovovaný analyt. V hmotnostní spektrometrii se doporučuje použití izotopově značených vnitřních standardů, je však nezbytné, aby byly ve vysoké čistotě a stabilní. [82] Nejčastěji se používají ^2H , ^{13}C , ^{15}N nebo ^{17}O . Rozdíl mezi analytem a izotopově značeným vnitřním standardem by měl být nejméně 3 hmotnostní jednotky. Nevýhodou je, že ne vždy je izotopově značený vnitřní standard komerčně dostupný. [36, 51, 63] Izotopově značené vnitřní standardy byly použity i při stanovení vitamínů (např. pyridoxal 5'fosfát- d_2 , pyridoxal- d_3 , riboflavin- d_8 , methyltetrahydro-listová kyselina- $^{13}\text{C}_5$, riboflavin- ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$, kyselina listová- d_4 , vitamín A- d_5 , α -tokoferol- d_6). [17, 39, 83]

7.2 Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody rozlišit stanovovaný analyt a IS od endogenních složek matrice a dalších složek ve vzorku. Selektivita se prokazuje za použití nejméně šesti vzorků matrice (tzn. vzorky krve/séra/plazmy získané od šesti dobrovolníků). V případě méně častých matric lze použít méně vzorků. [79, 81]

7.3 Limit kvantifikace

Pro validovanou analytickou metodu je stanovován limit kvantifikace (LOQ), který je definován jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být spolehlivě kvantifikována s přijatelnou přesností a precizností (viz Tab. IV). Dále je také možné pro validovanou analytickou metodu vyjádřit dolní limit kvantifikace (LLOQ), který je roven kalibračnímu standardu s nejnižší koncentrací. Signál analytu vzorku LLOQ by měl být alespoň 5-10 krát vyšší než signál slepého vzorku a měl by být přizpůsoben očekávaným koncentracím. [79, 81, 82] Pro analytické metody se častěji uvádí LOQ než LLOQ (viz Tab. IV). Zheng a kol. uvadějí ve své práci na stanovení kyseliny listové a 5-methyltetrahydrolistové v plazmě LLOQ. Pro kyselinu listovou činí 0,249 ng/ml (odpovídá 5,64 nmol/l). [18] V další práci autoři uvádí LLOQ pro kyselinu listovou 18,8 pmol/ml (odpovídá 18,8 nmol/l) [74] a pro vitamín B₂ 1 nmol/l. [19]

Tabulka IV: Příklady publikovaných LOQ

Látka	LOQ/LLOQ	rozsah kalibrace	citace
Kyselina listová	0,2 ng/ml (odpovídá 0,45 nmol/l)	10-500 ng/ml (odpovídá 2,2-2226 nmol/l)	[36]
Vitamín A	1,0 ng/ml (odpovídá 0,003 μ mol/l)	1-1000 ng/ml (odpovídá 0,003-3,5 μ mol/l)	[14]
	0,05 ng/ml (odpovídá 0,0002 μ mol/l)	0,001-3 μ g/ml (odpovídá 0,003-10,5 μ mol/l)	[84]
	0,028 μ mol/l	0,8-2,9 μ mol/l	[85]
Vitamín E	0,05 mg/ml (odpovídá 116 μ mol/l)	0,1-20 mg/ml (odpovídá 232-46400 μ mol/l)	[14]
	50 ng/ml (odpovídá 0,116 μ mol/l)	0,001-20 μ g/ml (odpovídá 0,002 – 46,4 μ mol/l)	[84]
	0,562 μ mol/l	8-42 μ mol/l	[85]

7.4 Kalibrační křivka

Kalibrační standardy se připravují v dubletu ze stejné matrice, jako je matrice analyzovaných vzorků a v rozsahu očekávaných koncentrací u analyzovaných vzorků. Rozsah kalibrační křivky by měl pokrývat rozsah očekávaných koncentrací v neznámých vzorcích. [81, 82] Pro sestavení kalibrační křivky se používá minimálně šest kalibračních standardů. [83] Sedm kalibračních roztoků na stanovení riboflavinu použil ve své práci Petteys a kol. [19]

7.5 Přesnost

Přesnost analytické metody je dána těsností shody mezi naměřenou hodnotou a nominální koncentrací analytu (vyjádřenou v procentech). Provádí se stanovením minimálně pěti vzorků pro minimálně 3-4 koncentrace, které pokrývají celý rozsah kalibrační křivky (LLOQ, střední a horní oblast kalibrační křivky) v krátkém časovém úseku. Následně jsou stejné koncentrace měřeny nejméně ve dvou různých dnech. Průměr koncentrací by měl být $\pm 15\%$ nominální koncentrace, pro LLOQ $\pm 20\%$. [13, 19, 59, 77, 81, 82]

7.6 Preciznost

Preciznost je těsnost shody mezi jednotlivými naměřenými koncentracemi. Mírou preciznosti je variační koeficient a relativní směrodatná odchylka. Preciznost je hodnocena za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Za podmínek opakovatelnosti se provádí stanovení minimálně 5 vzorků na minimálně 3-4 úrovních koncentrace v krátkém časovém úseku, které pokrývají celý rozsah kalibrační křivky (LLOQ, střední a horní oblast kalibrační křivky). Za podmínek reprodukovatelnosti jsou měřeny stejné koncentrace nejméně ve dvou různých dnech. Hodnoty variačních koeficientů by neměly překročit $\pm 15\%$ a pro LLOQ $\pm 20\%$. [13, 19, 59, 77, 81, 82]

7.7 Matricový efekt

Matricový faktor se vypočítá pro LLOQ a nejvyšší kalibrační standard pro každou stanovovanou látku a IS. Matricový faktor se stanoví jako poměr plochy píku získaný při analýze vzorku s matricí (po extrakci s analytem) k ploše píku ve vzorku bez matrice (čistý roztok analytu). Vyhovující matricový faktor musí být nižší než 15 %. [81, 82, 86] Při kvantitativním stanovení lze matricový efekt eliminovat použitím stabilního izotopově

značeného vnitřního standardu. [77] Midttun a kol. testovali MF vitamínu B₂ za použití devíti různých vzorků plazmy. Zjištěný matricový faktor byl 8 %, což je pro kvantifikaci vyhovující. [59]

7.8 Analýza vzorků

Po úplné validaci se provede měření série vzorků o neznámé koncentraci současně s analýzou slepého vzorku (matrice vzorku bez analytu a bez IS), nulového vzorku (připravený vzorek matrice s IS), kalibračních standardů na nejméně šesti koncentračních hladinách a kontroly kvality (alespoň 3 úrovně, nízká, střední a vysoká) připravených v dubletu. Všechny tyto vzorky (kalibrační standardy, vzorky kontroly kvality, neznámé vzorky) se připravují v pořadí, v jakém budou analyzovány. [81, 82]

Experimentální část

8. Příprava a testování

8.1 Přístroj

Pro chromatografickou analýzu byl použit ultravysokoúčinný kapalinový chromatograf Waters Acquity H-Class UPLC system (Waters, Milford, MA, USA), vybavený vysokotlakým čerpadlem Acquity quaterly solvent manager, autosamplerem- Acquity UPLC Autosampler, kolonovým termostatem- Acquity Column manager a tandemovým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem XEVO TQD (Micromass, Manchester, UK), ionizací elektrosprejem (Z-sprej). Všechny analýzy byly provedeny s použitím ionizace elektrosprejem s pozitivní ionizací.

8.2 Chemikálie

Pro experimenty byly použity následující chemikálie: voda pro HPLC (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA); síran zinečnatý heptahydrát ($\geq 99,5\%$, Sigma – Aldrich); acetonitril gradient grade pro kapalinovou chromatografii (Merck, Kenilworth, NJ, USA); methanol hypergrade pro LC-MS (Merck); mravenčan amonný ($\geq 99,99\%$, Merck); octan amonný ($\geq 98\%$, Merck); kyselina mravenčí (98-100%, Merck); diethylether pro plynovou chromatografii (Merck); dichloromethan pro plynovou chromatografii (Merck); n-hexan pro plynovou chromatografii (Merck); toluen pro plynovou chromatografii (Merck); chloroform p.a. (99,8% Penta, Praha, Česká republika); ethanol (96%, Penta, Praha, Česká republika); kyselina listová ($\geq 97\%$, TRC, Toronto, Kanada); kyselina listová-d₄ ($\geq 97\%$, TRC); riboflavin ($\geq 98\%$, TRC); riboflavin-¹³C, ¹⁵N₂ (TRC); α - tokoferol ($\geq 98\%$, TRC); α -tokoferol-d₆ ($\geq 98\%$, TRC); *all-trans*-retinol ($\geq 98\%$, TRC); vitamín A-d₅ acetát ($\geq 98\%$, TRC); hovězí albumin (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo); kontrolní vzorky pro vitamíny A a E ClinChek® Serum Controls, (Recipe, Mnichov, Německo) a sérum od zdravých dárců z Krevního centra FN Ostrava.

8.3 Pracovní pomůcky

Při přípravě vzorků byly použity skleněné zkumavky, stojany na zkumavky, kádinky, automatické pipety a špičky. Vzorky byly zamíchány na vortexu a centrifugovány

v centrifuze Abbott. Standardy vitamínů byly váženy na analytických vahách WA33 (Techma Robot). Připravené vzorky byly měřeny v měřicích vialkách.

8.4 Příprava standardních roztoků

Standardní roztoky vitamínů byly připraveny rozpuštěním odpovídajících množství standardů v methanolu tak, aby bylo dosaženo koncentrací uvedených v tabulce V. Zásobní standardní roztoky byly uloženy při teplotě -80 °C v hlubokomrazicím boxu.

Tabulka V: Koncentrace standardních roztoků vitamínů

standardní roztok	připravená koncentrace (μmol/l)
riboflavin	500,0
riboflavin- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	52,7
kyselina listová	250,0
kyselina listová-d ₄	112,2
<i>all-trans</i> -retinol	1000,0
vitamín A-d ₅	119,9
α-tokoferol	23220,0
α-tokoferol-d ₆	91,6

8.5 Vnitřní standard (IS)

Směsný roztok vnitřního standardu byl připraven ze standardního roztoku riboflavinu-¹³C, ¹⁵N₂, vitamínu A-d₅ a kyseliny listové-d₄ s doplněním methanolem na objem 25 ml. Výsledná koncentrace riboflavinu-¹³C, ¹⁵N₂ byla 1,2 μmol/l, vitamínu A-d₅ 9,59 μmol/l a kyseliny listové-d₄ 0,4 μmol/l. Roztok α-tokoferolu-d₆ o koncentraci 45,8 μmol/l byl přidáván ke vzorkům samostatně. Roztoky vnitřních standardů byly uloženy při teplotě -20 °C.

8.6 Kalibrační standardy

Ze zásobních roztoků standardů jednotlivých vitamínů byly postupným ředěním připraveny kalibrační roztoky s následujícími koncentracemi:

vitamín B₂: 5; 25; 50; 100; 250; 500; 1000 nmol/l

kyselina listová: 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 nmol/l

α -tokoferol: 0,5; 2,5; 5; 10; 25; 50, 100 $\mu\text{mol/l}$

vitamín A: 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 2500 nmol/l

Kalibrační roztoky byly uloženy při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ v hlubokomrazícím boxu.

8.7 Kontrolní vzorky

Směsné kontrolní vzorky na dvou hladinách byly připraveny ředěním ze zásobního roztoku kyseliny listové a riboflavinu a uloženy při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Koncentrace vitamínů ve směsných kontrolních vzorcích jsou uvedeny v tabulce VI.

Tabulka VI: Rozmezí kontrol pro riboflavin a kyselinu listovou

hladina	riboflavin		kyselina listová	
	střední hodnota (nmol/l)	deklarované rozmezí (nmol/l)	střední hodnota (nmol/l)	deklarované rozmezí (nmol/l)
I	20	15-25	120	90-150
II	200	150-250	600	450-750

Pro vitamín A a E byly použity komerční kontrolní vzorky firmy Recipe na třech hladinách (Tab. VII). Připravené roztoky byly dle doporučení výrobce skladovány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka VII: Rozmezí kontrol pro vitamíny A a E

hladina	vitamín A		vitamín E	
	střední hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	deklarované rozmezí ($\mu\text{mol/l}$)	střední hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	deklarované rozmezí ($\mu\text{mol/l}$)
I	1,85	1,48-2,22	24,8	19,9-29,7
II	3,56	2,85-4,26	36,2	29,0-43,4
III	5,20	4,15-6,25	51,5	41,3-61,8

8.8 Příprava vzorků

Vitamíny byly stanovovány v séru. Pro přípravu vzorku bylo testováno několik postupů založených na precipitaci proteinů pomocí methanolu, ethanolu a acetonitrilu. Dále byly testovány kombinované postupy založené na precipitaci proteinů a extrakci do organických rozpouštědel (hexan, dichlormethan, toluen, chloroform). Pro testování byly použity vitamíny v následujících koncentracích: vitamín B₂ 1000 nmol/l , vitamín A 2500 nmol/l , kyselina listová 250 nmol/l a izotopově značený vitamín E-d₆ o koncentraci 45,8 $\mu\text{mol/l}$. Izotopově značený vitamín E-d₆ byl použit místo standardu vitamínu E, u kterého

došlo k rozkladu vlivem nedodržení podmínek skladování během přepravy. Pro přípravu kalibračních standardů byly objednány nové standardy vitamínů. U všech testovaných postupů byl obsah zkumavky promíchán 1 minutu na vortexu a následovala centrifugace při teplotě +4 °C, 10 minut při 4000 ot/min. Během přípravy byly zkumavky obaleny alobalem, aby byly vzorky chráněny před světlem. Pro chromatografickou analýzu bylo nastříknuto 20 µl zpracovaného vzorku. Separace vitamínů probíhala při gradientové eluci mobilní fáze A a B (Tab. VIII) na koloně Acquity UPLC BEH C18 column (2.1x50 mm I.D., 1.7 µm, Waters, USA) a při teplotě +40 °C. Mobilní fáze A obsahovala 4 mmol/l mravenčanu amonného a 0,2% kyselinu mravenčí ve vodě, v/v, mobilní fáze B 4 mmol/l mravenčanu amonného a 0,2% kyselinu mravenčí v methanolu, v/v.

Tabulka VIII: Gradientové eluce

čas (min)	průtok (ml)	složení mobilní fáze (%)	
		mobilní fáze A	mobilní fáze B
0,0	0,150	95	5
1,0	0,150	95	5
1,5	0,200	60	40
2,0	0,200	60	40
3,0	0,300	20	80
4,0	0,400	0	100
12,0	0,400	0	100
13,0	0,250	50	50
14,0	0,250	95	5
18,0	0,150	95	5

Testované postupy přípravy vzorku:

1. 200 µl séra + 400 µl methanolu
2. 200 µl séra + 400 µl ethanolu + 50 µl vody
3. 200 µl séra + 400 µl ethanol:methanol (4:1, v/v) + 100 µl mobilní fáze (mobilní fáze A: mobilní fáze B, 19:1, v/v)

U postupů 4-7 byl supernatant přepipetován do čisté zkumavky a odpařen pod proudem dusíku, odparek byl následně rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze (mobilní fáze A: mobilní fáze B, 19:1, v/v).

4. 200 µl séra + 400 µl ethanolu + 500 µl hexanu
5. 200 µl séra + 400 µl ethanolu + 500 µl dichlormethanu
6. 200 µl séra + 400 µl ethanolu + 500 µl toluenu

7. 200 μl séra + 400 μl ethanolu + 500 μl chloroformu

U postupu 8 byl supernatant po centrifugaci pouze přepipetován do vialky s 50 μl vody.

8. 100 μl séra + 100 μl ethanolu

Na kolonu bylo nastříkováno 20 μl vzorku.

8.9 Příprava vzorků pro kalibraci

Pro kalibraci riboflavinu a kyseliny listové bylo použito sérum získané od zdravých dárců z Krevního centra FN Ostrava. Sérum bylo před použitím ponecháno 24 hod na světle při laboratorní teplotě. Pro kalibraci vitamínu A a E byl použit vodný roztok hovězího albuminu o koncentraci 50 g/l.

Kalibrační standardy pro jednotlivé vitamíny byly připraveny následujícím postupem: do zkumavek bylo napipetováno 50 μl směsného vnitřního standardu (viz. kapitola 8.5), 50 μl α -tokoferolu- d_6 , 50 μl standardu příslušného vitamínu, 100 μl vodného roztoku hovězího albuminu nebo séra a 100 μl ethanolu. Zkumavky byly zamíchány na vortexu po dobu 1 minuty a následně centrifugovány 20 minut (4000 ot./min., +4 °C). Supernatant byl přepipetován do vialky, do které bylo napipetováno 50 μl destilované vody.

8.10 Příprava vzorků pro validaci

Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako kalibrační standardy (viz kapitola 8.9) v deseti opakováních. Pro validaci byly zvoleny standardy o výsledné koncentraci pro kyselinu listovou 10, 50 a 250 nmol/l, pro vitamín B₂ 50, 250, 1000 nmol/l, pro vitamín E 5, 25 a 100 $\mu\text{mol/l}$ a pro vitamín A 250, 1000 a 2500 nmol/l.

8.11 Příprava vzorků

Vzorky byly odebrány do zkumavek Neutral S-Monovette (Sarstedt, Německo). Alikvoty vzorků byly uloženy při teplotě -80 °C. Před analýzou byly rozmrazeny při laboratorní teplotě a chráněny před světlem uložením v neprůhledné krabici. Do zkumavky bylo napipetováno 50 μl IS (směsný IS, viz. kapitola 8.5), 50 μl α -tokoferol- d_6 , 100 μl séra a 100 μl ethanolu. Obsah zkumavek byl 1 minut promíchán na vortexu, následovala centrifugace 10 minut při 4000 ot/min, při teplotě +4 °C. Supernatant byl přepipetován do vialky, do které bylo napipetováno 50 μl destilované vody. Všechny tyto vzorky byly připravovány v dubletu.

9. Výsledky a diskuze

9.1 Podmínky chromatografické analýzy

Při vývoji chromatografických podmínek jsou důležitými optimalizačními parametry typ stacionární fáze, rozměry kolony a složení mobilní fáze. Pro testování nevhodnější úpravy vzorků pro analýzu vitamínů A, B₂, E a kyseliny listové byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 column (2.1x50 mm I.D., 1.7 μm, Waters, USA). Pro validaci a analýzu patientských vzorků byla zvolena delší kolona stejného typu (Acquity UPLC BEH C18 column, 2.1x100 mm I.D., 1.7 μm, Waters, USA), která umožňuje do budoucna metodu rozšířit i pro analýzu dalších vitamínů. Kolonu Acquity UPLC BEH C18 column (2.1x50 mm I.D., 1.7 μm) pro stanovení kyseliny listové a jejich metabolitů vybral pro lepší retenci a separaci z pěti testovaných kolon ve své práci také Wang a kol., kdy separace probíhala za použití gradientu mobilní fáze 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a v acetonitrilu s dobou analýzy 7 minut. [36]

Retenci látek ovlivňuje také teplota kolony, se zvyšující se teplotou retence látek na koloně klesá. V předložené práci probíhala separace vitamínů při teplotě +40 °C. Stejná teplota je uváděna v některých publikacích na stanovení vitamínu B₂, pěti forem vitamínu B₆, tryptofanu a jeho šesti metabolitů [59], vitamínů A, E, K₁, 25-hydroxyvitamínu D₃ a 1,25-dihydroxyvitamínu D₃ [84] a kyseliny listové, 5-methyltetrahydrofolátu, 5-formyltetrahydrofolátu, homocysteinu a S-adenosylmethioninu [36]. Jiné práce uvádí separaci vitamínu B₆, pyridoxal-5-fosfátu, pyridoxinu, pyridoxinu-5-fosfátu, pyridoxaminu, pyridoxaminu-5-fosfátu, kyseliny 4-pyridoxové, vitamínu B₂, flavinmononukleotidu a flavinadenindinukleotidu při teplotě +20 °C. [77] Separace vitamínů B₁, B₆ (pyridoxalamin, pyridoxal a pyridoxin) a B₁₂ probíhala také při teplotě +25 °C. [40] Při laboratorní teplotě je uváděna separace vitamínů rozpustných ve vodě (thiamin, pyridoxin, nikotinamid, riboflavin, kyanokobalamin) a vitamínů rozpustných v tucích (retinol palmitát, kalciferol, α-tokoferol acetát) [73], při teplotě +35 °C separace 5-methyltetrahydrolistové kyseliny [39] a při teplotě +38 °C kyseliny listové a kyseliny 5-methyltetrahydrolistové. [18]

Vzhledem k nízké stabilitě vitamínů byly vzorky pro analýzu připravovány v malých sériích po 10 vzorcích od pacientů a ihned analyzovány. Vzorky byly ponechány v autosampleru po dobu, která nepřesahovala dobu stability vzorků v autosampleru při teplotě +4 °C (viz. kapitola 2 „Stabilita vitamínů“). Z tohoto důvodu byla teplota autosampleru nastavena na +10 °C. Tutéž teplotu autosampleru použil Thibeault [85] pro

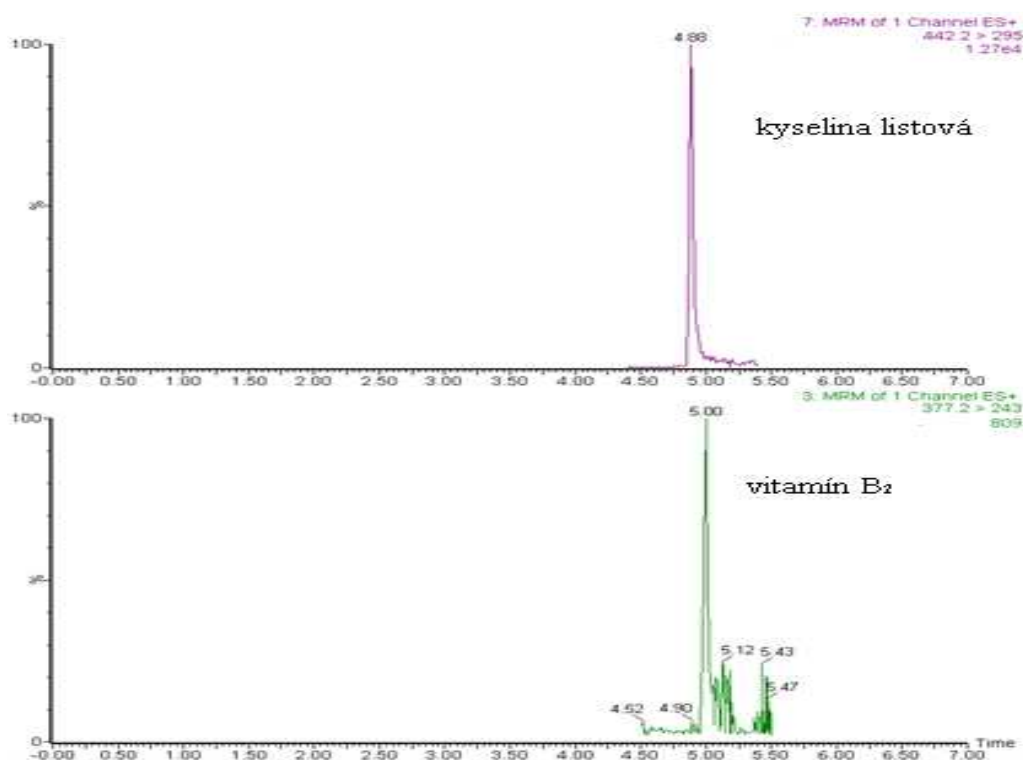
stanovení karotenoidů, retinolu a tokoferolů. Konieczna a kol. ve své práci pro stanovení vitamínů A, E, K₁, 25-hydroxyvitamínu D₃ a 1,25-hydroxyvitamínu D₃ uvádí teplotu autosapleru +8 °C. [84]

Složení mobilní fáze ovlivňuje proces ionizace a má přímý dopad na typ vzniklých iontů. Jako mobilní fáze se nejčastěji používají směsi methanol/voda, acetonitril/voda nebo methanol/acetonitril/voda s přidavkem kyseliny octové, mravenčí, heptafluoromáselné nebo kyselých pufrů, jako je mravenčan amonný nebo octan amonný (úprava pH v rozmezí 3,0-8,1). [60, 77] Velmi často se používá přidavek kyseliny mravenčí nebo octové pro zvýšení ionizace při použití ESI⁺. [87] Složení mobilní fáze a gradient eluce byly v naší práci optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejlepší separace v co možná nejkratším čase s ohledem na rozmývání píků (symetrie píků). Snahou bylo vyvinout LC-MS/MS metodu pro simultánní stanovení vybraných vitamínů a zachovat jednotný postup úpravy vzorku, složení MF a typ stacionární fáze. Pro analýzu byla použita gradientová eluce s mobilní fází A (4 mmol/l mravenčan amonný, 0,2 % kyselina mravenčí ve vodě, v/v) a mobilní fází B (4 mmol/l mravenčan amonný, 0,2 % kyselina mravenčí v methanolu, v/v). Během vývoje metody byly testovány různé gradienty eluce (Tab. IX-XII). Nejprve byla odděleně testována separace vitamínů rozpustných ve vodě (obr. č. 1) a separace vitamínů rozpustných v tucích (obr. č. 2). V tabulce IX je uveden gradient použitý pro separaci vitamínů rozpustných ve vodě, tabulka X uvádí gradient použitý pro separaci vitamínů rozpustných v tucích. Retenční čas kyseliny listové a vitamínu B₂ byl 4,89 a 5,0 min, retenční časy vitamínu A a E byly 6,32 a 9,11 min. Pro zkrácení doby analýzy byl testován gradient s větší eluční silou (Tab. XI, obr. č. 3), při kterém již probíhala simultánní separace jak vitamínů rozpustných ve vodě tak v tucích. Změnou poměru mobilních fází v průběhu chromatografické analýzy došlo ke zkrácení retenčních časů kyseliny listové ze 4,89 min na 3,0 min, vitamínu B₂ z 5,00 min na 3,3 min. a vitamínu A z 6,32 min na 5,61 min. Gradient č. 3 byl používán při testování postupů úpravy vzorků séra. Při použití tohoto gradientu docházelo k posunům retenčních časů, což bylo způsobeno složením připravených vzorků (viz příloha 1-8). K největšímu posunu retenčního času došlo u vitamínu E z 7,71 min na 11,04 min. U gradientu č. 3 došlo ke zhoršení symetrie píku vitamínu E a ke snížení odezvy vitamínu B₂. Pro zlepšení symetrie píku vitamínu E byl nutný vyšší obsah organického rozpouštědla, v tomto případě acetonitrilu. Vzhledem k rostoucím retenčním časům, špatné symetrii píku vitamínu E a nízké odezvě vitamínu B₂ byl výsledný gradient (Tab. XI, obr. č. 4) upraven jednak zvýšením průtoku mobilní fáze z 0,15 ml/min na 0,4 ml/min mezi 4-9 minutou a také

použitím 100% mobilní fáze B od 4. do 9. minuty. [16, 88] Tyto úpravy vedly k ustálení retenčního času vitamínu E. Pro nastavení počátečních podmínek gradientu dochází od 9,1 min k poklesu průtoku mobilní fáze z 0,4 ml/min na 0,15 ml/min a poměr mobilních fází se vrací k počátečnímu složení gradientů tak, aby bylo dosaženo ekvibrace kolony. Těmito úpravami bylo dosaženo vyhovující simultánní separace vitamínů A, B₂, E a kyseliny listové s přijatelnou dobou analýzy.

Tabulka IX: Gradientová eluce č. 1 pro separaci vitamínů rozpustných ve vodě

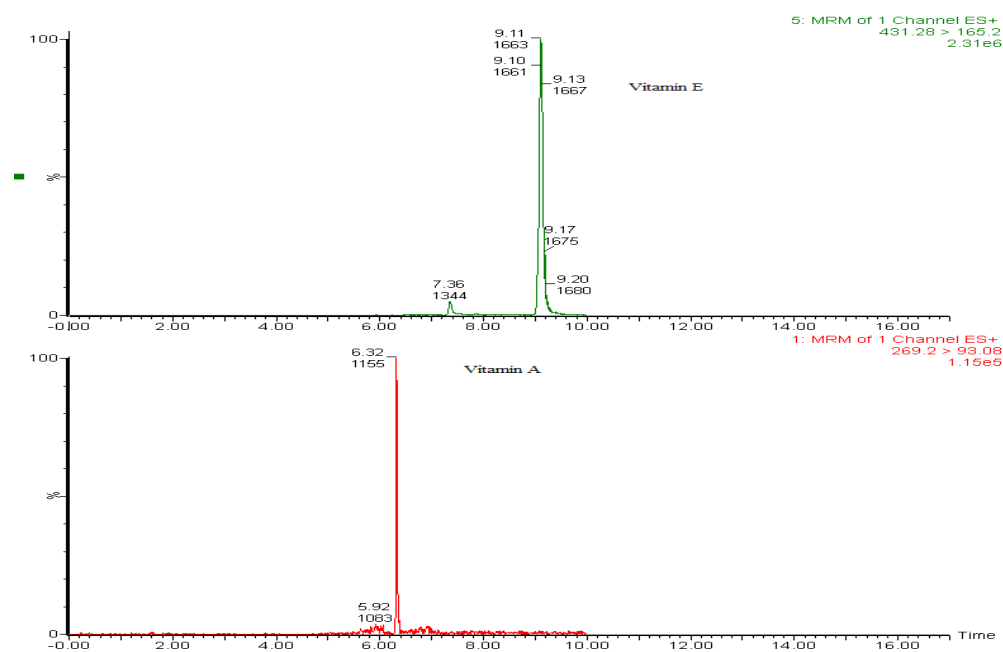
čas (min)	průtok (ml)	složení mobilní fáze (%)	
		mobilní fáze A	mobilní fáze B
0,0	0,200	50	50
1,0	0,200	50	50
2,0	0,200	40	60
2,1	0,350	0	100
4,0	0,350	0	100
4,1	0,200	50	50
6,0	0,200	50	50



Obrázek č. 1: Chromatogram kyseliny listové a vitamínu B₂ při gradientové eluci č. 1

Tabulka X: Gradientová eluce č. 2 pro separaci vitamínů rozpustných v tucích

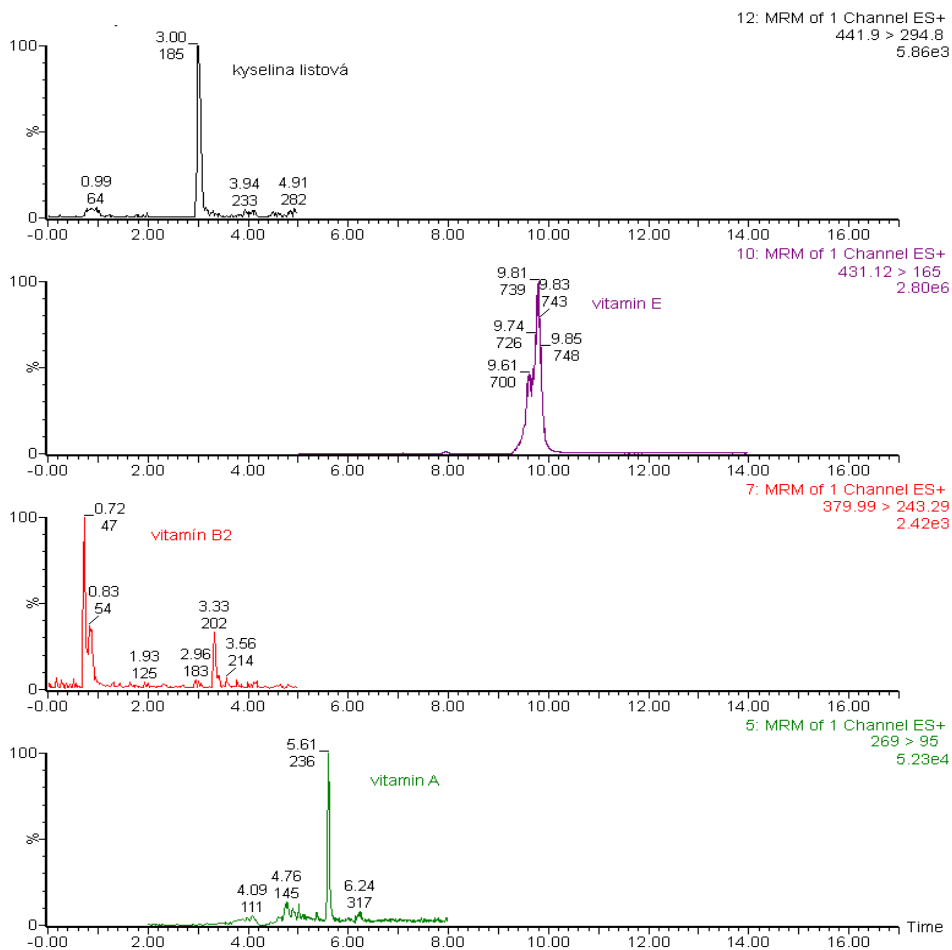
čas (min)	průtok (ml)	složení mobilní fáze (%)	
		mobilní fáze A	mobilní fáze B
0,0	0,150	95	5
1,5	0,150	95	5
1,6	0,150	40	60
4,0	0,150	0	100
4,5	0,250	0	100
5,5	0,400	0	100
6,5	0,400	0	100
6,6	0,200	95	5
7,5	0,200	95	5
9,0	0,150	95	5
11,0	0,150	95	5



Obrázek č. 2: Chromatogram vitamínu E a A při gradientové eluci č. 2

Tabulka XI: Gradientové eluce č. 3

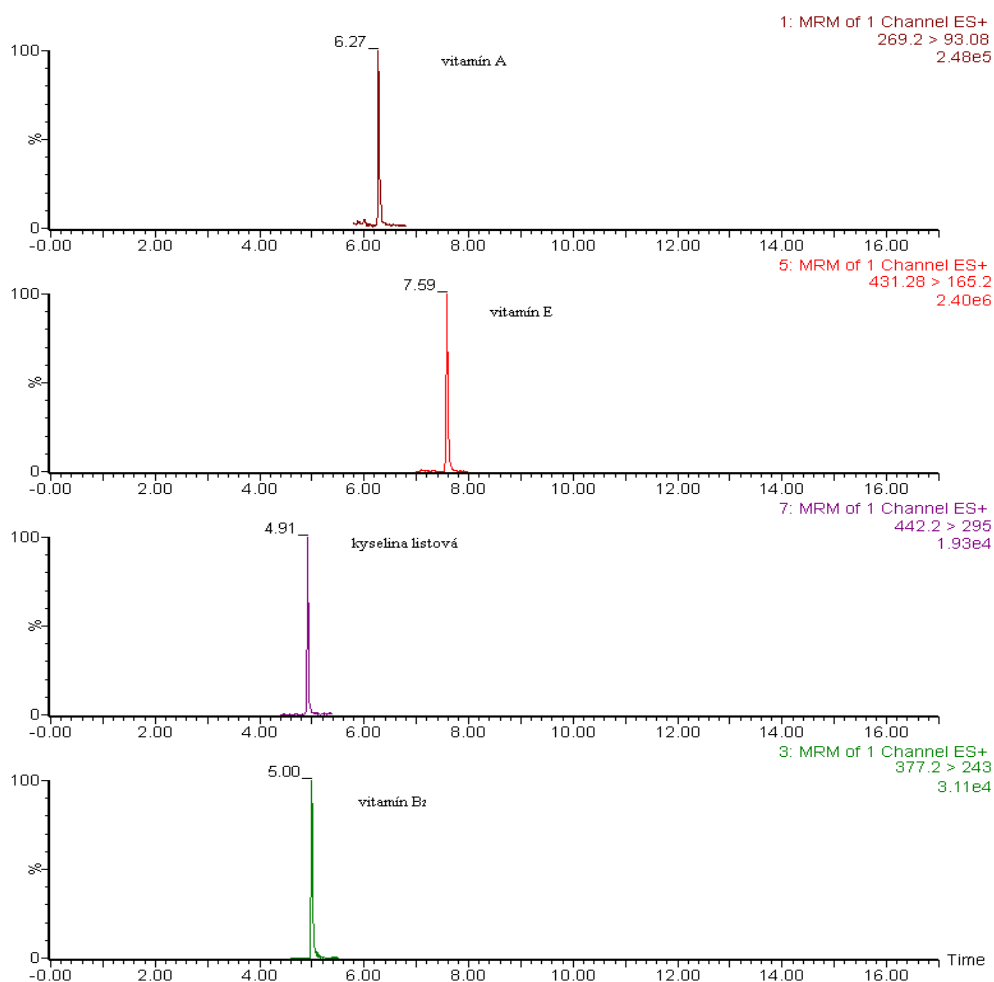
čas (min)	průtok (ml)	složení mobilní fáze (%)	
		mobilní fáze A	mobilní fáze B
0,0	0,150	95	5
1,0	0,150	95	5
1,5	0,200	60	40
2,0	0,200	60	40
3,0	0,300	20	80
4,0	0,400	0	100
4,5	0,400	0	100
12,0	0,400	0	100
13,0	0,250	50	50
14,0	0,250	95	5
18,0	0,150	95	5



Obrázek č. 3: Chromatogram stanovených vitamínů při gradientové eluci č. 3

Tabulka XII: Výsledný průběh gradientové eluce č. 4

čas (min)	průtok (ml)	složení mobilní fáze (%)	
		mobilní fáze A	mobilní fáze B
0,0	0,150	95	5
1,5	0,150	95	5
1,6	0,150	40	60
4,0	0,150	0	100
4,5	0,250	0	100
5,5	0,400	0	100
9,0	0,400	0	100
9,1	0,200	95	5
11,0	0,200	95	5
16,0	0,150	95	5
17,0	0,150	95	5



Obrázek č. 4: Chromatogram stanovených vitamínů při gradientové eluci č. 4

9.2 Podmínky hmotnostní detekce

Jako způsob ionizace byla při analýze vitamínů rozpustných v tucích použita chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI) [61, 71] a při analýze vitamínů rozpustných ve vodě byl použit elektrosprej (ESI). [36, 39, 59, 75]

V rámci našich experimentů byla pro vitamíny A a E porovnávána velikost odezvy při použití ESI⁺ a APCI⁺, přičemž větší odezva (velikost plochy píku) byla zjištěna při použití ESI⁺. Průměrná velikost plochy píku u vitamínu E byla APCI⁺ 182861 ± 3602 a ESI⁺ 1982740 ± 24660 a u vitamínu A APCI⁺ 9188 ± 286 a ESI⁺ 54190 ± 865. Z tohoto důvodu byl zvolen jako způsob ionizace ESI⁺. Parametry MS byly nejprve nastaveny pro každý analyt pomocí infúze jednotlivých standardů/vnitřních standardů s mobilní fází A:B (50:50, v/v) při průtoku 0,2 ml/min. Pro nastavení parametrů byly použity následující koncentrace standardů: riboflavin 1000 μmol/l, kyselina listová 500 nmol/l, α-tokoferol 100 μmol/l, vitamín A 2500 nmol/l, riboflavin-¹³C, ¹⁵N₂ 1000 μmol/l, vitamín A-d₅ 2500 μmol/l, vitamín E-d₆ 250 μmol/l a kyselina listová-d₄ 500 nmol/l. Cone voltage a kolizní energie byly optimalizovány pro každou látku, optimální hodnoty jsou uvedeny v tabulce XIII. Nejintenzivnější fragmenty, které byly vybrány jako kvantifikační přechody, jsou rovněž uvedeny v této tabulce. Optimální nastavení iontového zdroje bylo následující: napětí na kapiláře 2,5 kV, teplota zdroje +100 °C, desolvatační teplota +350 °C, jako kolizní plyn byl použit argon. Pro kvantifikaci byl použit MRM (multiple reaction monitoring) mód. Všechna data analýzy byla vyhodnocována pomocí programu MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA). Při uvedeném nastavení stanovované analyty poskytovaly dobře reprodukovatelný signál a ve všech případech vznikaly protonované molekuly analytů.

Tabulka XIII: Kvantifikační přechody, optimální hodnoty parametrů cone voltage a kolizní energie pro stanovované analyty

látka	prekurzorový ion	produktový ion	ConeVoltage (V)	kolizní energie (eV)
vitamín B ₂	377,2	243,0	38	22
vitamín B ₂ - ¹³ C, ¹⁵ N ₂	380,3	246,1	38	22
kyselina listová	442,2	295,0	19	17
kyselina listová-d ₄	445,2	297,9	30	17
vitamín A	269,2	93,1	30	30
vitamín A-d ₅	274,4	100,0	35	20
vitamín E	431,3	165,2	45	20
vitamín E-d ₆	437,3	170,9	40	20

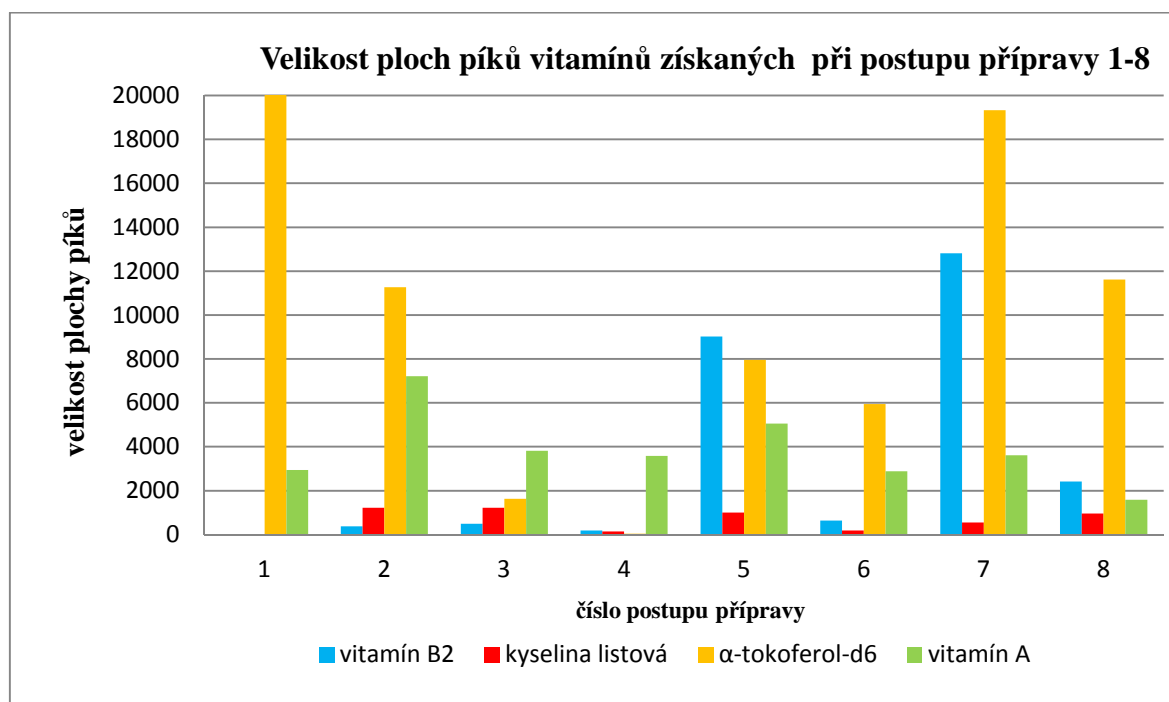
9.3 Příprava vzorků

Postup úpravy vzorků v rutinní klinické laboratoři by měl být zvolen s ohledem na časovou náročnost a dostatečnou výtěžnost. Cílem bylo získat postup přípravy, který bude možné použít současně pro vitamín A, B₂, E a kyselinu listovou, a to za použití co možná nejmenšího objemu vzorku vzhledem k tomu, že v případě biologického materiálu bývá jeho množství omezené. V publikovaných pracích bylo pro přípravu vzorků použito 60 µl plazmy s objemem nástřiku 50 µl [77], 200 µl séra s objemem nástřiku 10 µl [84] a 25 µl [19] a 500 µl plazmy/séra s objemem nástřiku 8 µl. [39]

V předložené práci bylo testováno několik úprav vzorku (viz kapitola 8.8). Nejjednodušší úpravou vzorku je obecně precipitace proteinů, proto byla testována precipitace proteinů za použití methanolu, ethanolu, acetonitrilu a jejich směsí. Dále byly testovány postupy zahrnující precipitaci proteinů s následnou extrakcí do nepolárního rozpouštědla (hexan, dichlormethan, chloroform, toluen). Postupy přípravy byly testovány pro koncentrace: vitamín B₂ 0,25 µmol/l, kyselina listová 0,25 µmol/l, vitamín E 25 µmol/l a vitamín A 2,5 µmol/l, všechny vzorky byly připraveny v tripletu. Hlavními kritérii pro hodnocení úpravy vzorku byla velikost plochy píků a jejich symetrie při chromatografické separaci. Výběr nejvhodnější úpravy vzorku vycházel z porovnání výsledků získaných různými postupy, které jsou podrobně popsány v kapitole 8.8 „Příprava vzorků“. Graf č. 1 znázorňuje průměrné plochy píků jednotlivých vitamínů získaných při jednotlivých postupech. U postupu č. 1 chybí pík kyseliny listové a vitamínu B₂, možným důvodem je

zde zadržení vitamínů v precipitátu. U postupů č. 2-4 byla patrná nízká odezva vitamínu B₂ a horší symetrie píků u postupu č. 2 a 3. Dobrá symetrie píků byla získána postupy č. 5-8. U kyseliny listové bylo dosaženo dobré odezvy postupem č. 2, 3, 5 a 8. U postupů č. 2 a 3 se projevilo štěpení píků. U vitamínu A a E by bylo možné použít pro přípravu vzorků všech postupů kromě postupu č. 4, kde se nepodařilo vyextrahovat vitamín E do hexanu, přestože se v literatuře často pro přípravu vitamínů rozpustných v tucích extrakce do hexanu používá. [85] Dobrý výsledek byl získán při extrakci do dichlormethanu (postup č. 5) a chloroformu (postup č. 7). Extrakce vitamínů do dichlormethanu a chloroformu byla v porovnání s extrakcí do hexanu a toluenu účinnější. Nicméně pro přípravu vzorku byl zvolen snadnější a rychlejší postup č. 8, spočívající v precipitaci proteinů pouze ze 100 μl séra pomocí 100 μl ethanolu. Výsledkem byla dostatečná plocha i dobrá symetrie píků. Tabulka XIV uvádí zkrácený postup přípravy, poznámku k příslušnému chromatogramu a číslo přílohy chromatogramu.

Graf č. 1: Velikost ploch píků vitamínů získaných při jednotlivých postupech



Tabulka XIV: Výsledky testovaných postupů přípravy vzorku

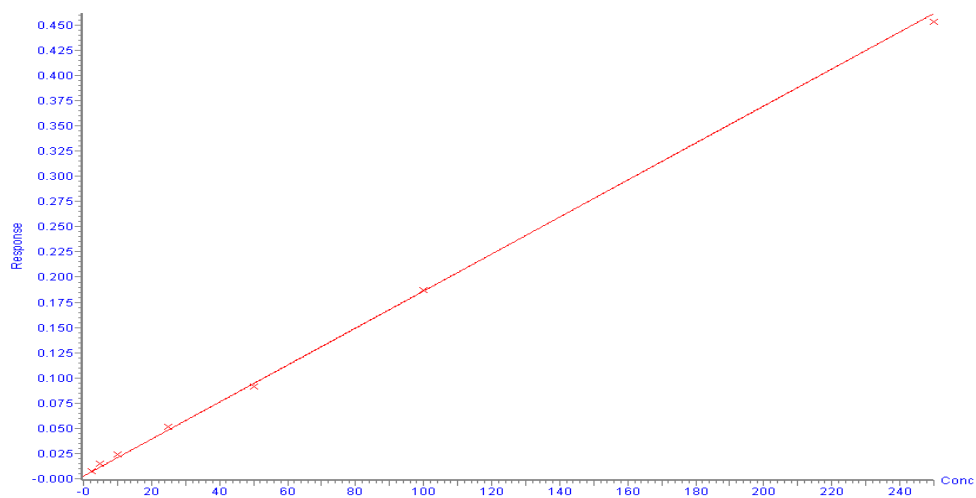
číslo	postup přípravy	plochy píku vitamínů				poznámka	č. přílohy
		vit. B ₂	FA	vit. E	vit. A		
1.	200 μl séra + 400 μl methanolu	-	-	102360	2947	chybí pík FA a vit. B ₂	1
2.	200 μl séra + 400 μl ethanolu + 50 μl vody	372	1216	11273	7213	dvojitý pík FA a vit. B ₂	2
3.	200 μl séra + 400 μl ethanol:methanol (4:1, v/v) + 100 μl mobilní fáze	492	1225	1631	3815	špatná symetrie píku FA a vit. B ₂	3
4.	200 μl séra + 400 μl ethanolu + 500 μl hexanu	181	146	38	3577	nízká odezva	4
5.	200 μl séra + 400 μl ethanolu + 500 μl dichlormethanu	9026	999	7961	5062	horší symetrie píku FA	5
6.	200 μl séra + 400 μl ethanolu + 500 μl toluenu	635	184	5939	2887	nízká odezva FA a vit. B ₂	6
7.	200 μl séra + 400 μl ethanolu + 500 μl chloroformu	12859	550	19468	3616		7
8.	100 μl séra + 100 μl ethanolu	2424	955	116120	1593		8

FA...kyselina listová

9.4 Validace metody

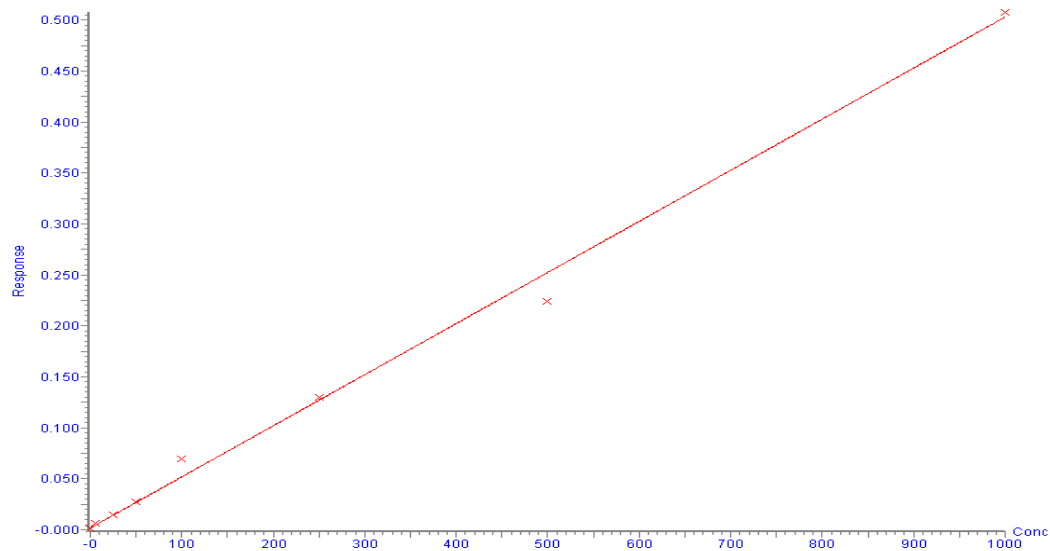
Koncentrační rozsah každé kalibrační křivky byl zvolen s ohledem na referenční rozmezí jednotlivých vitamínů (viz. Tab. II, kapitola 2.3 „Referenční rozmezí vitamínů“). Kalibrační křivka udává závislost poměru plochy píku standardů k ploše píku vnitřního standardu podle stoupající koncentrace jednotlivých vitamínů. Pro kyselinu listovou byla zvolena kalibrace v rozmezí 2,5-250 nmol/l (obr. č. 5), pro vitamín B₂ v rozmezí 5-1000 nmol/l (obr. č. 6), pro vitamín A v rozmezí 25-2500 nmol/l (obr. č. 7) a pro vitamín E v rozmezí 0,5-100 μmol/l (obr. č. 8). Lineární závislost kalibračních křivek byla statisticky ověřena. Korelační koeficient kalibrační křivky pro vitamín B₂ byl 0,993, pro kyselinu listovou 0,998, pro vitamín A a E 0,998.

Compound name: kyselina listová
Correlation coefficient: $r = 0.997774$, $r^2 = 0.995553$
Calibration curve: $0.00183579 * x + 0.00257863$
Response type: Internal Std (Ref 20), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



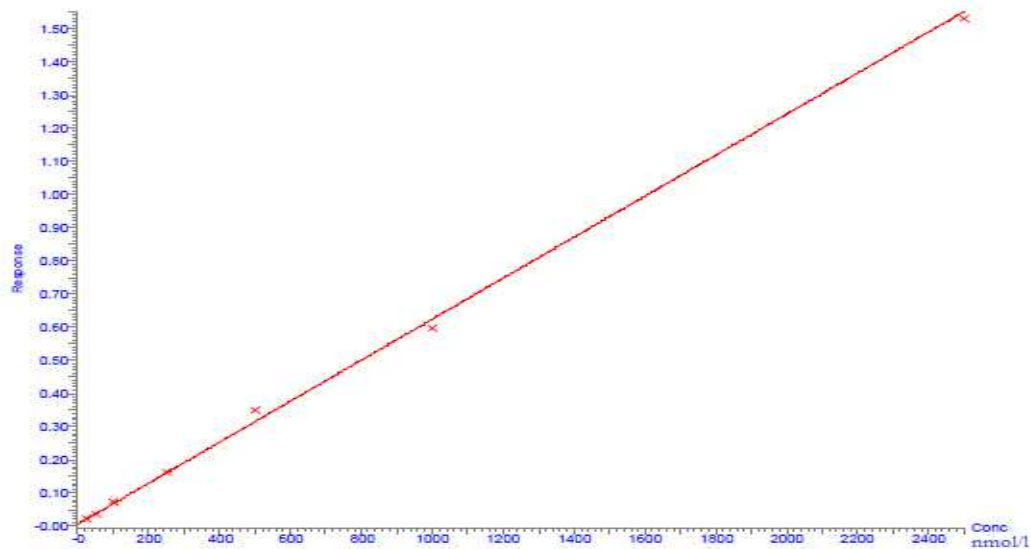
Obrázek č. 5: Kalibrační křivka kyseliny listové

Compound name: vitamín B2
Correlation coefficient: $r = 0.993344$, $r^2 = 0.986732$
Calibration curve: $0.000501351 * x + 0.00176382$
Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



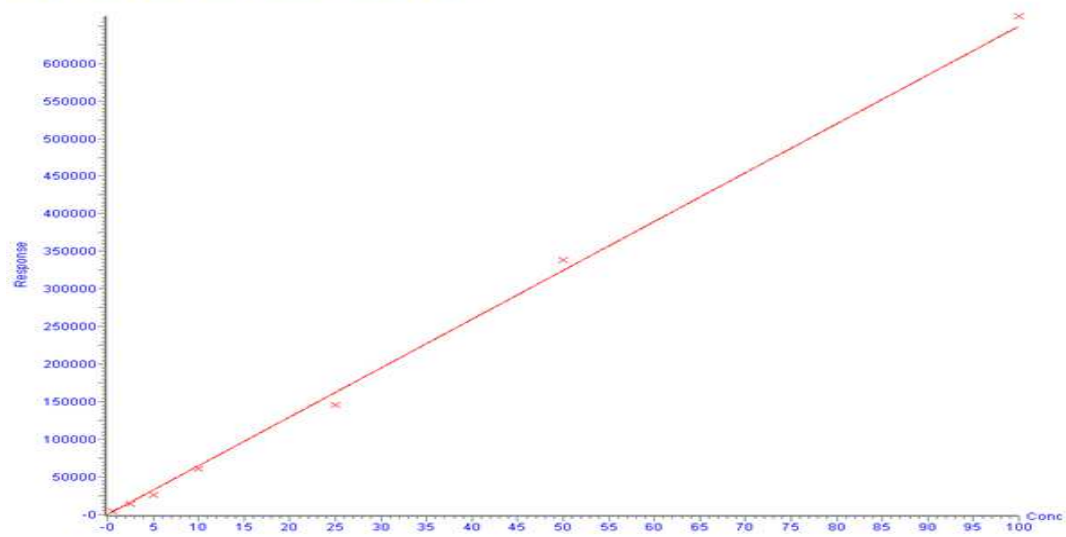
Obrázek č. 6: Kalibrační křivka vitamínu B₂

Compound name: vitamin A
Correlation coefficient: $r = 0.998133$, $r^2 = 0.996269$
Calibration curve: $0.000618241 \cdot x + 0.00587855$
Response type: Internal Std (Ref21), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 7: Kalibrační křivka vitamínu A

Compound name: vitamin E
Correlation coefficient: $r = 0.998003$, $r^2 = 0.996010$
Calibration curve: $6495.97 \cdot x - 35.044$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 8: Kalibrační křivka vitamínu E

9.5 Limit kvantifikace

Dle pravidel FDA pro validaci bioanalytických metod lze za dolní limit kvantifikace (LLOQ) považovat první bod kalibrační křivky (za předpokladu, že odezva analytu LLOQ je nejméně 5krát vyšší než odezva ve vzorku bez analytu, preciznost do 20 % a přesnost v rozmezí 80-120%). Tento postup byl zvolen i v této studii, nicméně v publikacích je uváděna hodnota limitu kvantifikace. Pro kyselinu listovou byla publikována hodnota LOQ 0,2 ng/ml (odpovídá 0,45 nmol/l) [36] a 0,4 nmol/l [17], pro vitamín A 1,0 ng/ml (odpovídá 3 nmol/l) [14] a 0,176 µg/ml (odpovídá 614 nmol/l) [61], pro vitamín E 0,05 ng/ml (odpovídá 0,12 nmol/l) [14] a 0,210 ng/ml (odpovídá 4,88 nmol/l) [61] a pro vitamín B₂ 1 nmol/l [19]. Autory publikované LLQ jsou nižší než LLLQ, které byly validovány v této práci. Hodnoty dosažené v této studii jsou však vzhledem k dolním hodnotám referenčních rozmezí jednotlivých vitamínů plně dostačující pro analýzu vitamínů v patientských vzorcích séra. První kalibrační standard každého vitamínu byl připraven v deseti opakováních a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient a recovery (Tab. XV). Hodnoty variačních koeficientů splňují podmínky pravidel FDA.

Tabulka XV: Dolní limit kvantifikace pro vitamín A, B₂, E a kyselinu listovou

	Koncentrace standardů			
	vitamín B ₂ (nmol/l)	kyselina listová (nmol/l)	vitamín E (µmol/l)	vitamín A (nmol/l)
testovaná koncentrace	5,0	2,5	0,5	25
průměr	5,2	2,6	0,4	24,1
SD	0,3	0,3	0,1	3,0
CV (%)	6,2	11,8	13,9	12,6
Recovery (%)	103,6	104,4	83,3	96,3

9.6 Opakovatelnost a mezilehlá preciznost

Opakovatelnost a mezilehlá preciznost měření byly zjištěny pomocí měření vzorků na třech koncentračních hladinách jednotlivých vitamínů v deseti opakováních. Z výsledných měření byl statisticky vyhodnocen průměr (x), směrodatná odchylka (SD), variační koeficient (CV) a výtěžnost (recovery). Výsledky opakovatelnosti měření jsou uvedeny v tabulce XVI a výsledky mezilehlé preciznosti měření v tabulce XVII. Hodnoty recovery u všech vitamínů se pohybovaly v rozmezí 95,1-107,5 % pro opakovatelnost a 94,4-107,4 % pro mezilehlou preciznost. Hodnoty variačních koeficientů byly v rozmezí 3,1-11,7 % pro opakovatelnost a 4,0-9,3 % pro mezilehlou preciznost. Výsledky tedy vyhovovaly podmínkám pro validaci metody dle FDA pravidel. Obdobné výsledky recovery pro kyselinu listovou 100,3; 103,8 a 105% pro koncentrace 20; 40 a 160 ng/ml (odpovídá 46,5; 93 a 370 nmol/l) publikoval Wang a kol. [36] Pro retinol a α -tokoferol byl publikován CV 8,1 % a 9,1 % pro opakovatelnost a 5,4 % a 2,0 % pro mezilehlou preciznost. [76] Pro vitamín B₂ pro koncentrace 8,3, 10 a 30 nmol/l byl publikován CV 6,2 %, 6,0 % a 5,5 % pro opakovatelnost a 13,2 %, 12,6 % a 11,3 % pro mezilehlou preciznost. [59] Tyto hodnoty CV pro opakovatelnost jsou nižší než CV získané při validaci v této rigorózní práci. Naopak u mezilehlé preciznosti Midttun a kol. publikovali vyšší hodnoty CV. [59]

Tabulka XVI: Výsledky opakovatelnosti měření pro vitamín A, B₂, E a kyselinu listovou

	koncentrace standardů (nmol/l)	průměr	SD	CV (%)	recovery (%)
vitamín B ₂	50	51,3	24	4,7	102,7
	250	251,5	12,8	5,1	100,6
	1000	1074,8	61,1	5,7	107,5
kyselina listová	10	10,1	1,2	11,7	100,7
	50	51,8	4,6	8,9	103,6
	250	237,8	24,1	10,1	95,1
vitamín A	250	228,6	26,3	11,5	91,5
	1000	967,4	103,0	10,6	96,7
	2500	2484,7	73,9	3,0	99,4
	koncentrace standardů (μmol/l)	průměr	SD	CV (%)	recovery (%)
vitamín E	5	5,1	0,2	3,1	101,3
	25	24,5	1,4	5,7	98,1
	100	96,4	3,1	3,3	96,4

Tabulka XVII: Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro vitamín A, B₂, E a kyselinu listovou

	koncentrace standardů (nmol/l)	průměr	SD	CV (%)	recovery (%)
vitamín B ₂	50	53,7	4,7	8,7	107,4
	250	241,9	10,9	4,5	96,7
	1000	1045,9	56,3	5,4	104,6
kyselina listová	10	10,6	0,98	9,2	105,8
	50	51,2	4,2	8,1	102,4
	250	242,0	9,6	4,0	96,8
vitamín A	250	236	22	9,3	94,4
	1000	968	82,3	8,5	96,8
	2500	2557,6	130,2	5,1	102,3
	koncentrace standardů (μmol/l)	průměr	SD	CV (%)	recovery (%)
vitamín E	5	5,3	0,3	5,1	105,6
	25	23,8	1,5	6,2	95,4
	100	99,7	5,8	5,8	99,7

9.7 Pravdivost

Pravdivost metody byla ověřena analýzou kontrolních vzorků. Z měřených koncentrací byl statisticky vyhodnocen průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (SD), variační koeficient (CV) a bias. Výsledky jsou uvedeny v tabulce IXX a XX. Naměřené hladiny kontrolních vzorků se nacházely v požadovaném rozmezí. Žádná hodnota nepřesáhla uvedenou hranici. Hodnoty variačních koeficientů a biasů se pohybují v rozmezí 7,0-13,87 % a -11,35-8,9 %.

Tabulka XVIII: Výsledky pravdivosti měření pro vitamín B₂ a kyselinu listovou

	střední hodnota koncentra (nmol/l)			
	vitamín B₂		kyselina listová	
	100	500	20	200
x	114.4	564.7	20.3	197.3
SD	8.2	66.6	2.4	23.1
CV (%)	7.1	11.8	11.8	11.7
Bias (%)	-4.7	-5.9	1.6	-1.4

Tabulka IXX: Výsledky pravdivosti měření pro vitamín E a A

	střední hodnota koncentra (μmol/l)					
	vitamín E			vitamín A		
	24,8	36,2	51,5	1,85	3,56	5,20
x	26.7	38.0	56.1	1.64	3.51	4.85
SD	1.9	2.7	3.4	0.23	0.30	0.41
CV (%)	7.0	7.2	6.0	13.87	8.66	8.39
Bias (%)	7.5	4.9	8.9	-11.35	-1.32	-6.69

9.8 Koncentrace vitamínů zjištěné analýzou patientských vzorků

Celkem bylo analyzováno 87 patientských vzorků (41 mužů a 46 žen). Výsledky naměřené u patientských vzorků jsou uvedeny v tabulce XX a XXI, kde jsou pacienti rozděleni podle pohlaví. Příklad chromatogramu vzorku pacienta je uveden v příloze č. 9. Vitamíny mají pro lidský organizmus nezastupitelný význam. Vyvážená a pestrá strava je pro zdraví jedince velmi důležitá, proto stanovení vitamínů v séru je jednou z podstatných součástí posouzení nutričního stavu organismu a při zhodnocení léčby různých onemocnění. [1, 36]

Chang a kol. publikovali studii, v níž porovnávali koncentraci kyseliny listové v séru a koncentraci vitamínu B₁₂, homocysteinu, železa, hemoglobinu a střední objem erytrocytů v krvi u pacientů s onemocněním sliznic v důsledku deficitu kyseliny listové se skupinou zdravých jedinců. Průměrná koncentrace kyseliny listové byla u pacientů 10,7 nmol/l, zatímco u skupiny zdravých osob 30,36 nmol/l. Nízké hladiny kyseliny listové a vitamínu B₁₂ zde korelovaly s nižšími koncentracemi hemoglobinu a železa a vyšší koncentrací homocysteinu. [8]

V séru osob hodnocených v předložené práci byla průměrná koncentrace kyseliny listové 294,1 nmol/l s rozmezím 4,1 až 2058,0 nmol/l, což je velký rozptyl naměřených koncentrací. Pouze u dvou pacientů se koncentrace nacházely pod dolní hranicí referenčního rozmezí, což může být v důsledku špatné životosprávy, malabsorpce nebo hepatobiliárních onemocnění. Neléčená hypovitaminóza může vést až k megaloblastické anémii. Zbývající naměřené koncentrace kyseliny listové byly větší než 0,0135 μmol/l.

Pouze u tří vzorků se koncentrace vitamínu B₂ nacházely v referenčním rozmezí, 97 % koncentrací bylo pod dolní hranicí referenčního rozmezí. Vysoké procento výsledků pod dolní hranicí poukazuje na nedostatečný příjem vitamínu této skupiny. U vitamínu A jsou referenční meze rozdílné v závislosti na pohlaví. Pro muže je referenční rozmezí uváděno 1,05-2,27 μmol/l, pro ženy 0,83-1,75 μmol/l. V našem souboru se u mužů koncentrace vitamínu A u pěti vzorků nacházely nad horní hranicí a pouze u tří vzorků pod dolní hranicí referenčního rozmezí. U žen se všechny výsledky nacházely v referenčním rozmezím, pouze jeden výsledku byl nad horní hranicí referenčního rozmezí. Největší počet koncentrací nad horní hranicí referenčního rozmezí se vyskytl u vitamínu E a to u 29 vzorků (14/15, muži/ženy), pouze 3 byly pod dolní hranicí (2/1, muži/ženy). Talwar a kol. stanovovali koncentrace vitamínu A a E u 66 žen a 45 mužů ve věku 19-62 let. Průměrná koncentrace vitamínu A byla u mužů 2,2 μmol/l a u žen 1,9 μmol/l. Průměrná koncentrace

vitamínu E byla u mužů 30,0 $\mu\text{mol/l}$ a u žen 30,4 $\mu\text{mol/l}$. [76] Obdobné výsledky publikoval také Quesada a kol. [14]. Podobné koncentrace vitamínu E byly naměřeny i v předložené práci, a to u mužů 32,8 $\mu\text{mol/l}$ a u žen 32,7 $\mu\text{mol/l}$ (viz. Tab. XX a XXI). Znalost koncentrací vitamínů v organismu může být vhodným vodítkem k odhalení příčin některých onemocnění a k úpravě složení stravy bohaté na vitamíny. Přesto z naměřených výsledků nelze hodnotit zdravotní stav pacienta, ten musí být hodnocen i s ohledem na další výsledky a celkový klinický obraz.

Tabulka XX: Koncentrace vitamínů naměřené u pacientů (muži)

	pohlaví	vitamín B ₂ (nmol/l)	kyselina listová (nmol/l)	vitamín A (μmol/l)	vitamín E (μmol/l)
1.	M	13,4	442	1,91	30,2
2.	M	3,3	405	1,87	24,8
3.	M	24,3	403	2,02	25,2
4.	M	26,3	138	2,04	26,5
5.	M	14,1	208	1,98	20,8
6.	M	27,9	286	1,5	21,3
7.	M	8,7	193	1,69	24,4
8.	M	17,4	376	1,28	26,9
9.	M	6,6	277,3	1,55	22,3
10.	M	11,1	406	1,40	21,4
11.	M	3,6	543	1,45	21,1
12.	M	15,3	536,9	2,25	23,8
13.	M	11,8	617,8	1,60	25,9
14.	M	12,8	548,1	2,35	22,8
15.	M	9,2	885,8	1,95	18,1
16.	M	7,5	598,7	1,75	21,2
17.	M	5,5	633,5	1,10	34,8
18.	M	16	4,1	2,30	26,3
19.	M	18	29,5	1,53	27,1
20.	M	18,1	15,2	1,32	23,0
21.	M	16,8	12,2	1,22	16,9
22.	M	36,1	29,2	1,38	46,4
23.	M	41,8	33,7	1,40	48,8
24.	M	73,4	27,8	1,38	41,9
25.	M	15,4	29,3	0,89	41,8
26.	M	6,9	34,2	0,96	32,4
27.	M	7,7	32,2	0,85	31,1
28.	M	17,8	37,4	2,28	73,8
29.	M	15,0	31,8	1,65	36,8
30.	M	16,3	34,7	1,55	39,9
31.	M	5,7	32,5	1,13	27,2
32.	M	11,5	40,5	1,82	43,8
33.	M	25,2	26,9	1,37	47,5
34.	M	32,2	23,7	2,21	40,2
35.	M	23,9	28,9	1,82	33,7

Tabulka XX: Koncentrace vitamínů naměřené u pacientů (muži)

	pohlaví	vitamín B ₂ (nmol/l)	kyselina listová (nmol/l)	vitamín A (μmol/l)	vitamín E (μmol/l)
36.	M	14,6	35,1	2,07	39,7
37.	M	16,8	29,7	2,80	35,5
38.	M	34,2	53,0	2,16	47,5
39.	M	28,2	43,5	2,54	35,0
40.	M	62,1	36,2	1,72	41,1
41.	M	45,9	43,8	2,15	54,4
průměr		19,96	201,05	1,71	32,8
SD		14,99	237,91	0,46	11,8
minimální hodnota		3,3	4,1	0,85	16,9
maximální hodnota		73,4	885,8	2,80	73,8
medián		16	40,5	1,69	30,2

Tabulka XXI: Koncentrace vitamínů naměřené u pacientů (ženy)

	pohlaví	vitamín B ₂ (nmol/l)	kyselina listová (nmol/l)	vitamín A (μmol/l)	vitamín E (μmol/l)
1.	Ž	10,9	258	1,69	26,8
2.	Ž	11,9	261	1,50	27,4
3.	Ž	12,5	295	1,56	24,4
4.	Ž	12,1	290	1,76	32,8
5.	Ž	68,5	175	1,62	26,2
6.	Ž	57,4	295	1,46	29,1
7.	Ž	51,3	160	1,26	20,5
8.	Ž	86,9	200	1,49	33,9
9.	Ž	4,1	293	2,19	40,2
10.	Ž	27,2	331	1,46	26,8
11.	Ž	21,3	328	1,67	26,8
12.	Ž	9,3	518	1,68	29,4
13.	Ž	207,6	2058	1,11	23,9
14.	Ž	106,1	1817	1,25	18,9
15.	Ž	160,3	1695	1,15	23,8
16.	Ž	159,9	1465	1,27	21,4
17.	Ž	3,5	1932	1,32	23,9
18.	Ž	14,1	347	1,71	27,5
19.	Ž	6,6	343	1,89	27,2
20.	Ž	14,2	398	1,85	27,3
21.	Ž	8,0	459	1,35	31,9

Tabulka XXI: Koncentrace vitamínů naměřené u pacientů (ženy)

	pohlaví	vitamín B₂ (nmol/l)	kyselina listová (nmol/l)	vitamín A (μmol/l)	vitamín E (μmol/l)
22.	Ž	24,7	325	1,75	29,8
23.	Ž	61,4	229,2	2,45	24,6
24.	Ž	12,3	402,8	1,10	25,3
25.	Ž	21,9	561,5	1,10	37,7
26.	Ž	53,4	525,7	1,90	32,8
27.	Ž	3,45	578	1,70	26,5
28.	Ž	18,4	8,8	1,30	35,9
29.	Ž	24,8	118,6	1,50	24,4
30.	Ž	47,2	19,1	1,08	41,0
31.	Ž	22,8	25,2	0,89	30,9
32.	Ž	28,2	20,8	0,95	44,3
33.	Ž	6,8	42,8	1,14	63,3
34.	Ž	13,6	50,8	1,50	42,8
35.	Ž	4,6	37	1,21	39,1
36.	Ž	8,2	55,4	1,11	39,0
37.	Ž	11,3	39,5	1,48	52,9
38.	Ž	5,6	40,3	1,07	42,2
39.	Ž	6,4	43,4	1,01	38,8
40.	Ž	5,3	37,5	0,89	45,8
41.	Ž	10,6	41,1	0,84	37,3
42.	Ž	31,7	30,2	1,29	44,1
43.	Ž	24,4	51,8	1,0	34,5
44.	Ž	11,2	49,6	0,87	34,3
45.	Ž	21,8	41,3	0,85	31,8
46.	Ž	16,6	49,1	1,25	35,0
průměr		33,7	377,0	1,38	32,7
SD		44,6	531,4	0,36	8,9
minimální hodnota		3,5	8,8	0,84	18,9
maximální hodnota		207,6	2058	2,45	63,3
medián		15,4	243,6	1,31	31,35

Závěr

Rigorózní práce popisuje vývoj a validaci metody kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí pro simultánní stanovení čtyř vitamínů (vitamín B₂, kyselina listová, vitamín A a vitamín E). Nastavením hmotnostního detektoru bylo dosaženo nejlepší odezvy jednotlivých vitamínů (použitý iontový zdroj – elektrosprej, pozitivní mód, napětí na kapiláře 2,5 kV, teplota zdroje +100 °C, desolvatační teplota +350 °C). Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm I.D., 1.7 μm, Waters, USA), při teplotě kolony +40 °C, teplotě autosampleru +10 °C a při gradientové eluci mobilní fáze A (4 mmol/l mravenčan amonný, 0,2 % kyselina mravenčí ve vodě, v/v) a mobilní fáze B (4 mmol/l mravenčan amonný, 0,2 % kyselina mravenčí v methanolu, v/v). Optimální profil gradientu byl následující: 0-1,5 min 95:5, A:B, v/v; 1,6-4,0 min 40:60, A:B, v/v; 4,0-9,0 min 100% B, v/v; 9,1-17,0 min 95:5, A:B, v/v. Na počátku gradientu byl průtok 0,15 ml/min, následně docházelo k jeho navýšení na 0,25 ml/min od 4,5 min, od 5,5 min se zvýšil na 0,4 ml/min, od 9,1 min došlo k poklesu průtoku a návratu na počáteční průtok 0,15 ml/min. Vitamíny jsou stanovovány ze séra, proto bylo nutné otestovat různé postupy přípravy vzorků. Pro přípravu vzorků byl vybrán postup spočívající v precipitaci proteinů pomocí ethanolu. Pro zvýšení spolehlivosti metody byly použity izotopově značené vnitřní standardy (riboflavin-¹³C, ¹⁵N₂, kyselina listová-d₄, vitamín A-d₅, α-tokoferol-d₆).

Při validaci byla testována linearita, opakovatelnost, mezilehlá přesnost a pravdivost. Hodnoty variačních koeficientů pro opakovatelnost se nacházely v rozmezí 90,6-107,5 %, pro mezilehlou přesnost v rozmezí 94,4-107,4 %. Hodnoty recovery pro opakovatelnost se nacházely v rozmezí 3,1-11,7 % a pro mezilehlou přesnost v rozmezí 4,5-9,3 %. Pravdivost byla otestována analýzou kontrolních vzorků. Hodnoty variačních koeficientů a biasů se pohybovaly v rozmezí 6,0-13,87 % a -11,35-8,9 %. Všechny parametry splňovaly podmínky pro validaci metody.

Celkem bylo změřeno 87 patientských vzorků. Pod dolní hranicí referenčního rozmezí se nacházelo v případě vitamínu B₂ 97 % pacientů, naproti tomu u kyseliny listové bylo 97 % výsledků vyšších než mezní hodnota 0,0135 μmol/l. U vitamínu E bylo 26 % výsledků nad horní hranicí a pouze 3 % pod dolní hranicí referenčního rozmezí. Pouze jeden výsledek vitamínu A u žen se nacházel mimo referenční rozmezí a to nad horní hranicí. U mužů byla koncentrace u pěti vzorků nad horní hranicí a u tří vzorků pod dolní hranicí referenčního rozmezí. Vzhledem k nezastupitelné roli vitamínů v lidském

organismu má jejich stanovení velký význam, jelikož znalost jejich koncentrací v séru může být vhodným vodítkem k úpravě životosprávy nebo k odhalení příčin některých onemocnění. Přesto však nelze z naměřených výsledků hodnotit zdravotní stav pacienta, ten musí být hodnocen i s ohledem na výsledky dalších vyšetření a pacientův klinický obraz.

Seznam literatury

- [1] F. Bolzetta, N. Veronese, M. De Rui, L. Berton, E.D. Toffanello, S. Carraro, F. Miotto, E.M. Inelmen, L.M. Donini, E. Manzato, A. Coin, E. Perissinotto, G. Sergi, Are the Recommended Dietary Allowances for Vitamins Appropriate for Elderly People?, *J Acad Nutr Diet*, 115 (2015) 1789-1797.
- [2] J. Vávrová, *Vitamíny a stopové prvky, ČSKB ČLS JEP a SEEK, Pardubice 2007.*
- [3] R.K. Murray, *Harperova biochemie, Nakladatelství a vydavatelství H H 2003.*
- [4] X. Wang, K. Li, L. Yao, C. Wang, A. Van Schepdael, Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis, *J Pharm Biomed Anal*, 147 (2018) 278-287.
- [5] [<http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>, staženo 15.8.2018.
- [6] S. Hustad, P.M. Ueland, J. Schneede, Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection, *Clinical Chemistry*, 45 (1999) 862-868.
- [7] S.M. Mandal, M. Mandal, A.K. Ghosh, S. Dey, Rapid determination of vitamin B2 and B12 in human urine by isocratic liquid chromatography, *Anal Chim Acta*, 640 (2009) 110-113.
- [8] J.Y. Chang, Y.P. Wang, Y.C. Wu, S.J. Cheng, H.M. Chen, A. Sun, Hematinic deficiencies and anemia statuses in oral mucosal disease patients with folic acid deficiency, *J Formos Med Assoc*, 114 (2015) 806-812.
- [9] J. Racek, *Klinická biochemie, Grada, Praha 2006.*
- [10] T. Zima, *Laboratorní diagnostika, druhé ed., Galén a Karolinum, Praha 2007.*
- [11] A.M. Gori, F. Sofi, A.M. Corsi, A. Gazzini, I. Sestini, F. Lauretani, S. Bandinelli, G.F. Gensini, L. Ferrucci, R. Abbate, Predictors of vitamin B6 and folate concentrations in older persons: the InCHIANTI study, *Clinical Chemistry*, 52 (2006) 1318-1324.
- [12] A. Jabor, M. Zámečník, *Prenalytická fáze, ČSKB ČLS JEP a SEKK, Praha 2005.*
- [13] J. Karppi, T. Nurmi, B. Olmedilla-Alonso, F. Granada-Lorencio, K. Nyssönen, Simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method, *Journal of Chromatography B*, 867 (2008) 226-232.
- [14] J.M. Quesada, J.M. Mata-Granados, M.D. Luque De Castro, Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 89-90 (2004) 473-477.
- [15] A. Khan, M.I. Khan, Z. Iqbal, Y. Shah, L. Ahmad, D.G. Watson, An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-Retinol (Vitamin A) and α -Tocopherol (Vitamin E) in human serum: Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 2339-2347.

- [16] V. De Brouwer, G.F. Zhang, S. Storozhenko, D.V. Straeten, W.E. Lambert, pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates, *Phytochem Anal*, 18 (2007) 496-508.
- [17] S.H. Kirsch, J.-P. Knapp, W. Herrmann, R. Obeid, Quantification of key folate forms in serum using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 68-75.
- [18] X.-H. Zheng, L.-Y. Jiang, L.-T. Zhao, Q.-Y. Zhang, L. Ding, Simultaneous quantitation of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in human plasma by HPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5 (2015) 269-275.
- [19] B.J. Petteys, E.L. Frank, Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC, *Clinica Chimica Acta*, 412 (2011) 38-43.
- [20] D. Hampel, S. Shahab-Ferdows, J.M. Domek, T. Siddiqua, R. Raqib, L.H. Allen, Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B12 analysis in human milk, *Food Chemistry*, 153 (2014) 60-65.
- [21] G. Ravi, Y.P. Venkatesh, Immunoassays for riboflavin and flavin mononucleotide using antibodies specific to d-ribitol and d-ribitol-5-phosphate, *Journal of Immunological Methods*, 445 (2017) 59-66.
- [22] L.S. Selva Kumar, M.S. Thakur, Competitive immunoassay for analysis of vitamin B12, *Analytical Biochemistry*, 418 (2011) 238-246.
- [23] J. Mazina, J. Gorbatoeva, Sample preparation for CE-DAD analysis of the water soluble vitamins in food products, *Procedia Chemistry*, 2 (2010) 46-53.
- [24] S. Dziomba, P. Kowalski, T. Bączek, Field-amplified sample stacking–sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1267 (2012) 224-230.
- [25] A. Jastrzębska, S. Kowalska, E. Szłyk, New procedure for column-switching isotachophoretic determination of vitamins B1 and B6 in beer samples, *Journal of Food Composition and Analysis*, 57 (2017) 80-86.
- [26] L. Fotsing, M. Fillet, I. Bechet, P. Hubert, J. Crommen, Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15 (1997) 1113-1123.
- [27] H. Shi, Y. Ma, J.H. Humphrey, N.E. Craft, Determination of vitamin A in dried human blood spots by high-performance capillary electrophoresis with laser-excited fluorescence detection, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 665 (1995) 89-96.
- [28] J. Schiewe, Y. Mrestani, R. Neubert, Application and optimization of capillary zone electrophoresis in vitamin analysis, *Journal of Chromatography A*, 717 (1995) 255-259.
- [29] S. Boonkerd, M.R. Detaevernier, Y. Michotte, Use of capillary electrophoresis for the determination of vitamins of the B group in pharmaceutical preparations, *Journal of Chromatography A*, 670 (1994) 209-214.
- [30] L. Hu, X. Yang, C. Wang, H. Yuan, D. Xiao, Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 856 (2007) 245-251.

- [31] D. Zhao, M. Lu, Z. Cai, Separation and determination of B vitamins and essential amino acids in health drinks by CE-LIF with simultaneous derivatization, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2424-2432.
- [32] M. Navarro-Pascual-Ahuir, M.J. Lerma-García, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Food Control*, 63 (2016) 110-116.
- [33] Q. Liu, L. Jia, C. Hu, *On-Line Concentration Methods for Analysis of Fat-Soluble Vitamins by MEKC*, 2010.
- [34] K. Maráková, Pie, J. anský, E. Havránek, Miku, P., Simultaneous analysis of vitamins B in pharmaceuticals and dietary supplements by capillary electrophoresis hyphenated with triple quadrupole mass spectrometry, *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 (2014) 663-668.
- [35] H.M. Pinheiro-Sant'Ana, M. Guinazi, D.d.S. Oliveira, C.M. Della Lucia, B.d.L. Reis, S.C.C. Brandão, Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 8496-8502.
- [36] X.W. Wang, T. Zhang, X. Zhao, Z. Guan, Z. Wang, Z.Q. Zhu, Q. Xie, J.H. Wang, B. Niu, Quantification of folate metabolites in serum using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B*, 962 (2014) 9-13.
- [37] R. San José Rodriguez, V. Fernández-Ruiz, M. Cámara, M.C. Sánchez-Mata, Simultaneous determination of vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV, *Journal of Cereal Science*, 55 (2012) 293-299.
- [38] S. AlbalaHurtado, M.T. VecianaNogues, M. IzquierdoPulido, A. MarineFont, Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 778 (1997) 247-253.
- [39] B.C. Nelson, C.M. Pfeiffer, S.A. Margolis, C.P. Nelson, Solid-phase extraction-electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum, *Anal Biochem*, 325 (2004) 41-51.
- [40] A. Lebidzińska, M.L. Marszałł, J. Kuta, P. Szefer, Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B1 (thiamine), B6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B12 in animal and plant foods, *Journal of Chromatography A*, 1173 (2007) 71-80.
- [41] K. Taguchi, E. Fukusaki, T. Bamba, Simultaneous analysis for water- and fat-soluble vitamins by a novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1362 (2014) 270-277.
- [42] V. Pacáková, K. Štuhlík, *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1986.
- [43] K. Štuhlík, *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.
- [44] M.C. McMaster, *LC/MS A Pactical User's Guide*, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.
- [45] F. Opekar, I. Jelínek, P. Rychlovský, Z. Plzál, *Základní analytická chemie*, Praha 2002.

- [46] L. Nováková, P. M. Douša, 2013., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha 2013.
- [47] Švec, *Monolitické stacionární fáze pro HPLC*, *Chemické listy*, 98 (2004) 232-238.
- [48] L. Nováková, H. Vlčková, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*, *Analytica Chimica Acta*, 656 (2009) 8-35.
- [49] A. Karlsen, R. Blomhoff, T.E. Gundersen, *High-throughput analysis of Vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection*, *Journal of Chromatography B*, 824 (2005) 132-138.
- [50] L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, I. Svobodová, P. Solich, *Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection*, *Analytica Chimica Acta*, 573-574 (2006) 267-272.
- [51] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects*, *J Chromatogr B*, 877 (2009) 2198-2207.
- [52] D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská, M. Zvolánková, *Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC*, *Chemické listy*, 101 (2007) 190-199.
- [53] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*, *Applied Spectroscopy Reviews*, 44 (2009) 210-230.
- [54] C.S. Ho, C.W. Lam, M.H. Chan, R.C. Cheung, L.K. Law, L.C. Lit, K.F. Ng, M.W. Suen, H.L. Tai, *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications*, *Clin Biochem Rev*, 24 (2003) 3-12.
- [55] P. Donato, F. Cacciola, P.Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello, *Mass spectrometry detection in comprehensive liquid chromatography: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends*, *Mass Spectrom Rev*, 31 (2012) 523-559.
- [56] J.K. Prasain, *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, in: J.K. Prasain (Ed.) *Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples*, InTech, 2012.
- [57] C. Fanali, G. D'Orazio, S. Fanali, A. Gentili, *Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 87 (2017) 82-97.
- [58] J. Santos, J.A. Mendiola, M.B.P.P. Oliveira, E. Ibanez, M. Herrero, *Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage*, *Journal of Chromatography A*, 1261 (2012) 179-188.
- [59] O. Midttun, S. Hustad, P.M. Ueland, *Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23 (2009) 1371-1379.
- [60] N. Zand, B.Z. Chowdhry, F.S. Pullen, M.J. Snowden, J. Tetteh, *Simultaneous determination of riboflavin and pyridoxine by UHPLC/LC-MS in UK commercial infant meal food products*, *Food Chem*, 135 (2012) 2743-2749.
- [61] C. Nimalaratne, C. Sun, J. Wu, J.M. Curtis, A. Schieber, *Quantification of selected fat soluble vitamins and carotenoids in infant formula and dietary supplements using fast*

liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Food Research International*, 66 (2014) 69-77.

[62] H.H. Maurer, Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 1315-1325.

[63] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 852 (2007) 22-34.

[64] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta*, 115 (2013) 104-122.

[65] C.R. Mallet, Z. Lu, J.R. Mazzeo, A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (2004) 49-58.

[66] N. Liu, C. Yang, Z.J. Zhang, Y. Tian, F.G. Xu, Y. Chen, Simultaneous quantification of sodium ferulate, salicylic acid, cinnarizine and vitamin B1 in human plasma by LC tandem MS detection, *Chromatographia*, 67 (2008) 583-590.

[67] C.M. Tallaksen, T. Bohmer, H. Bell, J. Karlsten, Concomitant determination of thiamin and its phosphate esters in human blood and serum by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr*, 564 (1991) 127-136.

[68] E.A. Lesnik, G.B. Fogel, D. Weekes, T.J. Henderson, H.B. Levene, R. Sampath, D.J. Ecker, Identification of conserved regulatory RNA structures in prokaryotic metabolic pathway genes, *Biosystems*, 80 (2005) 145-154.

[69] R. Losa, M.I. Sierra, A. Fernández, D. Blanco, J.M. Buesa, Determination of thiamine and its phosphorylated forms in human plasma, erythrocytes and urine by HPLC and fluorescence detection: a preliminary study on cancer patients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (2005) 1025-1029.

[70] M.A. Rodríguez-Delgado, J.F. Díaz-Flores Estévez, F. Díaz-Flores Estévez, C. Hernández Calzadilla, C. Díaz Romero, Fast determination of retinol and α -tocopherol in plasma by LC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 991-997.

[71] R.B. van Breemen, D. Nikolic, X. Xu, Y. Xiong, M. van Lieshout, C.E. West, A.B. Schilling, Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 794 (1998) 245-251.

[72] J. Karpińska, B. Mikołuc, R. Motkowski, J. Piotrowska-Jastrzębska, HPLC method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42 (2006) 232-236.

[73] P. Moreno, V. Salvado, Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 870 (2000) 207-215.

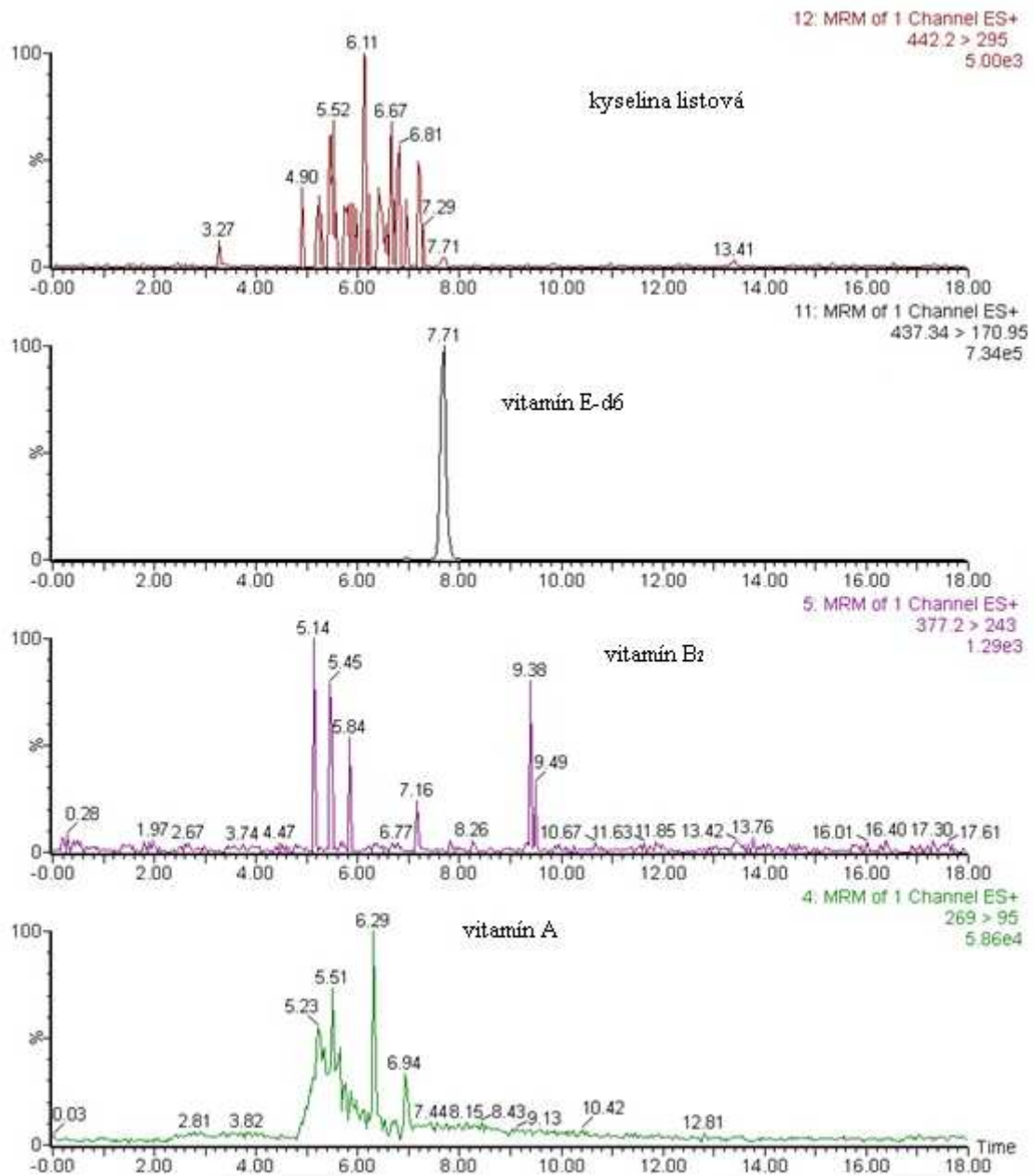
[74] B. Álvarez-Sánchez, F. Priego-Capote, J.M. Mata-Granados, M.D. Luque de Castro, Automated determination of folate catabolites in human biofluids (urine, breast milk and serum) by on-line SPE-HILIC-MS/MS, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4688-4695.

- [75] Z. Chen, B. Chen, S. Yao, High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets, *Analytica Chimica Acta*, 569 (2006) 169-175.
- [76] D. Talwar, T.K.K. Ha, J. Cooney, C. Brownlee, D. St Jo'Reilly, A routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC, *Clinica Chimica Acta*, 270 (1998) 85-100.
- [77] O. Midttun, S. Hustad, E. Solheim, J. Schneede, P.M. Ueland, Multianalyte quantification of vitamin B6 and B2 species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clinical Chemistry*, 51 (2005) 1206-1216.
- [78] P. Vinas, M. Bravo-Bravo, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, An evaluation of cis- and trans-retinol contents in juices using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorimetric detection, *Talanta*, 103 (2013) 166-171.
- [79]
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, staženo 9.3.2017.
- [80]
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>, staženo 27.3.2017.
- [81] O. Gonzalez, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolome, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J Chromatogr A*, 1 (2014) 10-27.
- [82] A. Bozovic, V. Kulasingam, Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: from small molecules to proteins, *Clin Biochem*, 46 (2013) 444-455.
- [83] Z. Fazili, R.D. Whitehead, Jr., N. Paladugula, C.M. Pfeiffer, A high-throughput LC-MS/MS method suitable for population biomonitoring measures five serum folate vitamins and one oxidation product, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 4549-4560.
- [84] L. Konieczna, K. Kazmierska, A. Roszkowska, A. Szlagatys-Sidorkiewicz, T. Baczek, The LC-MS method for the simultaneous analysis of selected fat-soluble vitamins and their metabolites in serum samples obtained from pediatric patients with cystic fibrosis, *J Pharm Biomed Anal*, 124 (2016) 374-381.
- [85] D. Thibeault, H. Su, E. MacNamara, H.M. Schipper, Isocratic rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of carotenoids, retinol, and tocopherols in human serum, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 1077-1083.
- [86] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.-L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, *Analytica Chimica Acta*, 870 (2015) 29-44.
- [87] P.D. Rainville, N.W. Smith, D. Cowan, R.S. Plumb, Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in positive ESI mode LC/MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59 (2012) 138-150.

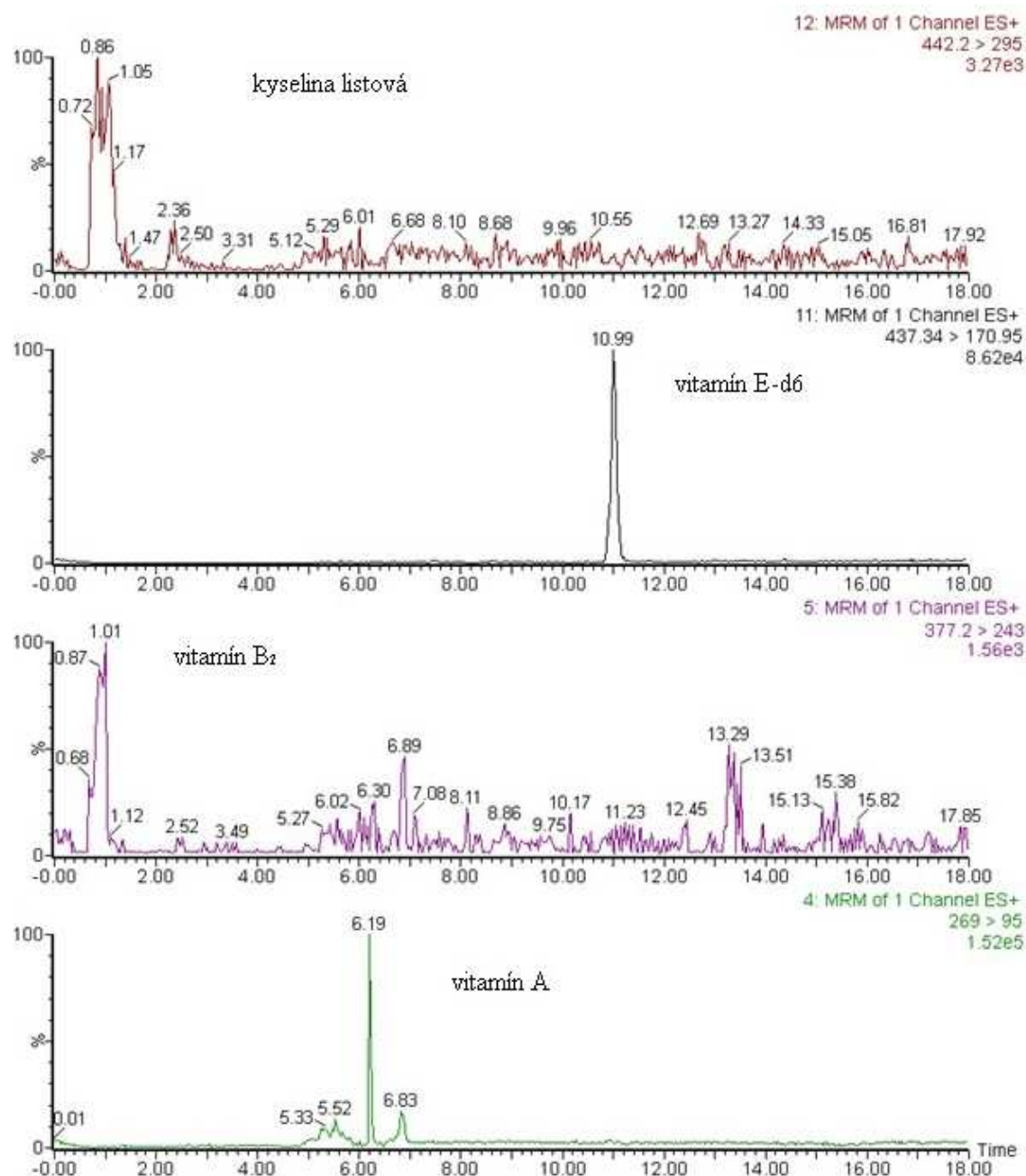
[88] I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich, Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 675-681.

Přílohy

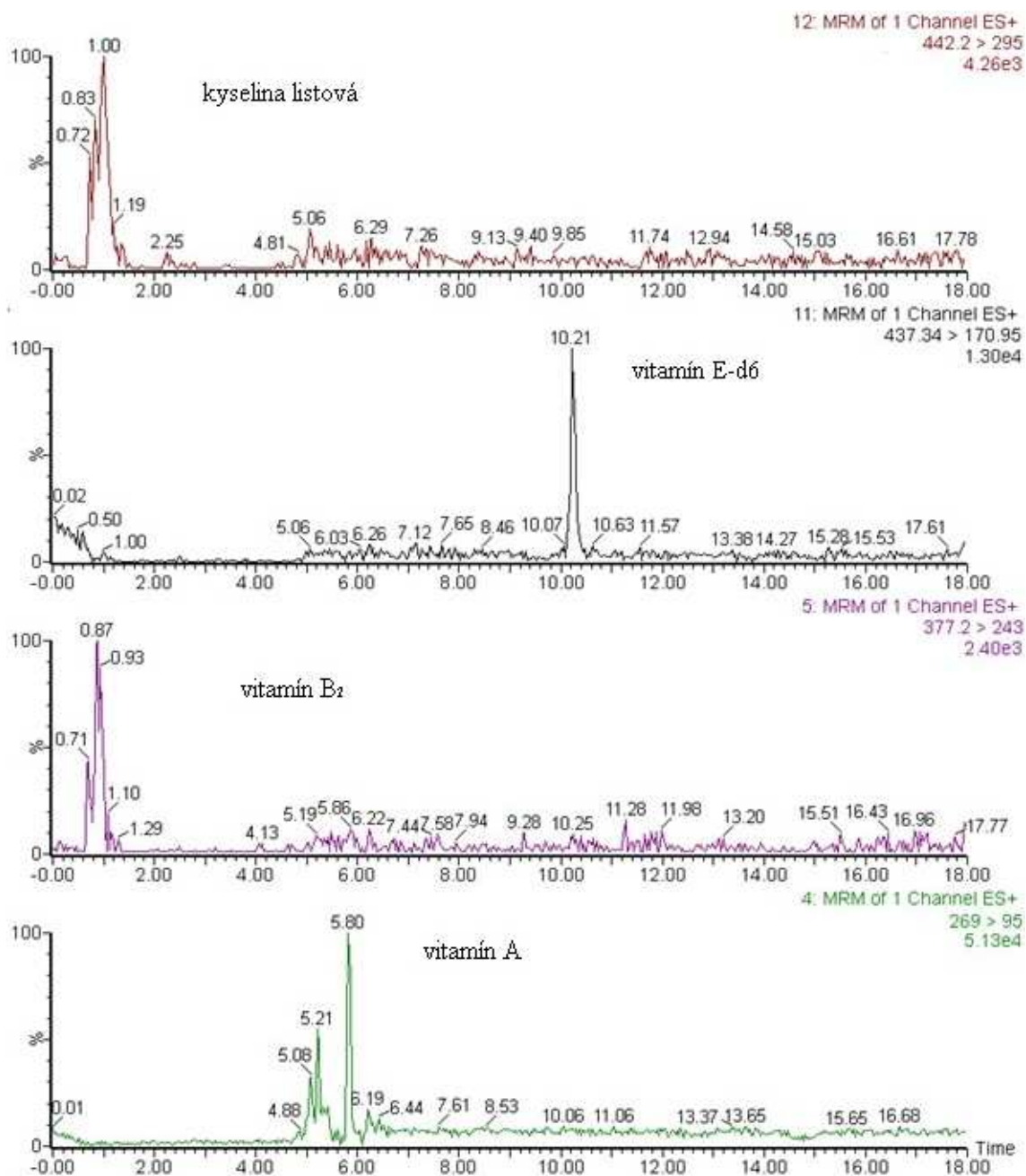
Příloha č. 1: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 1



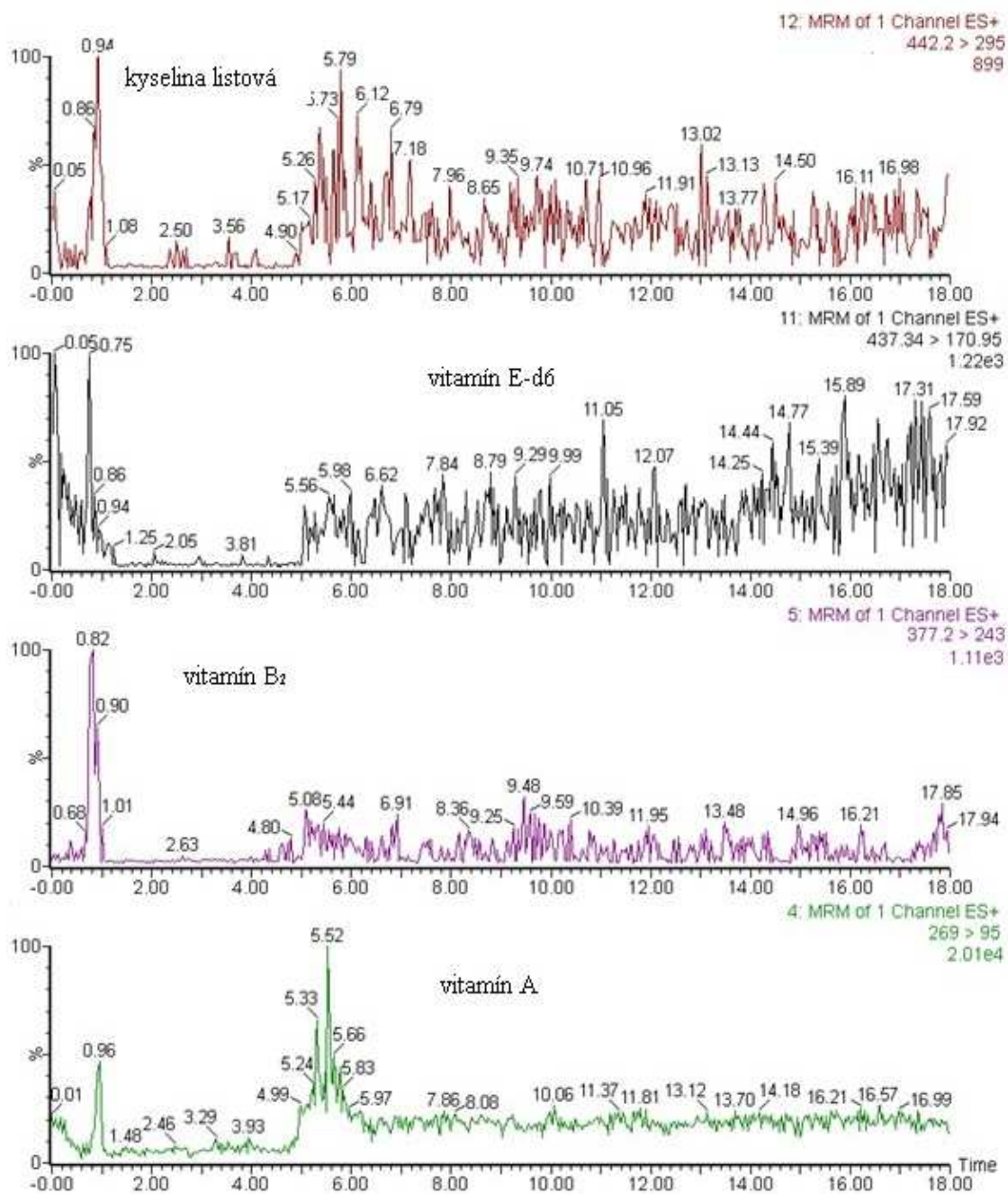
Příloha č. 2: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 2



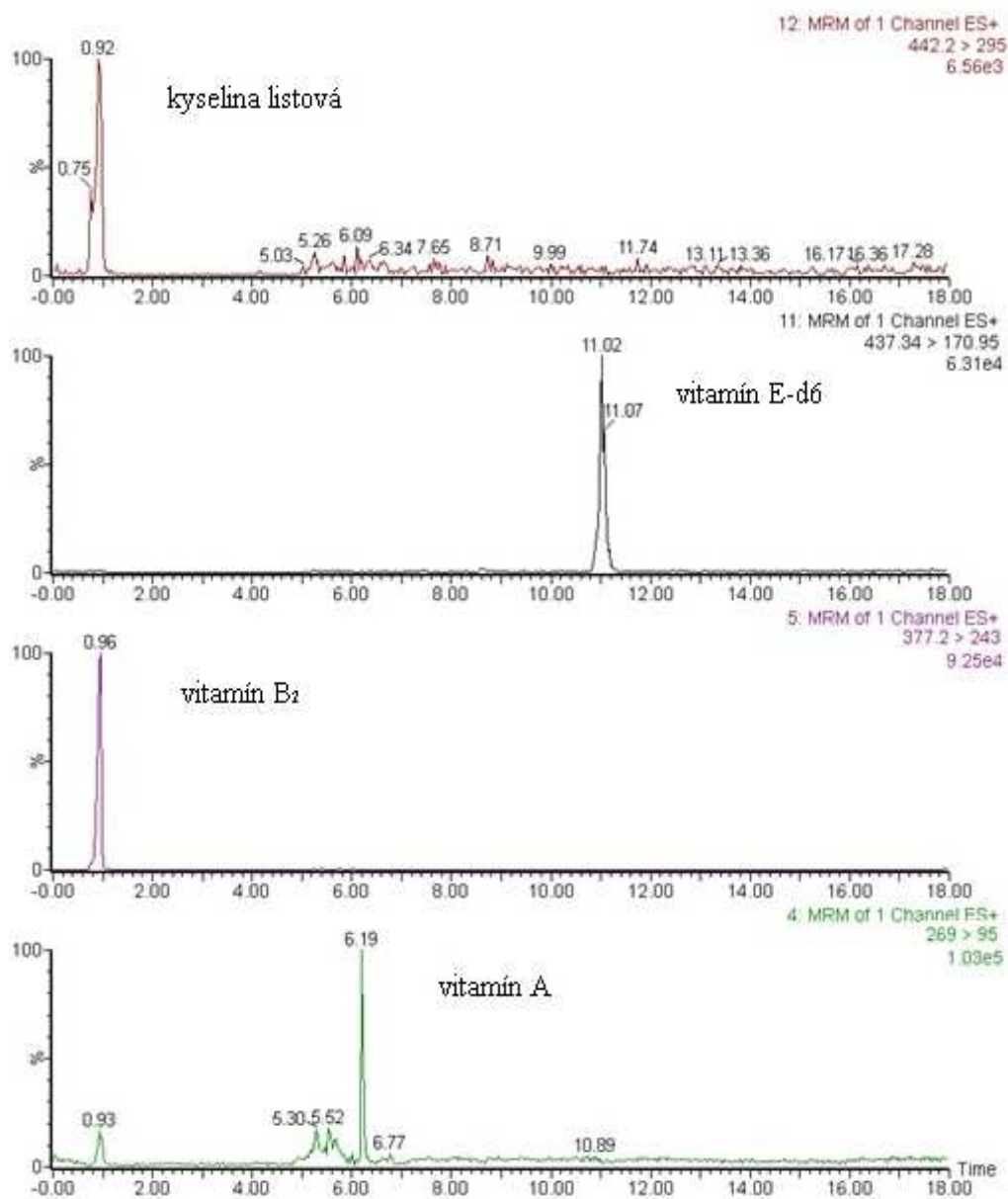
Příloha č. 3: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 3



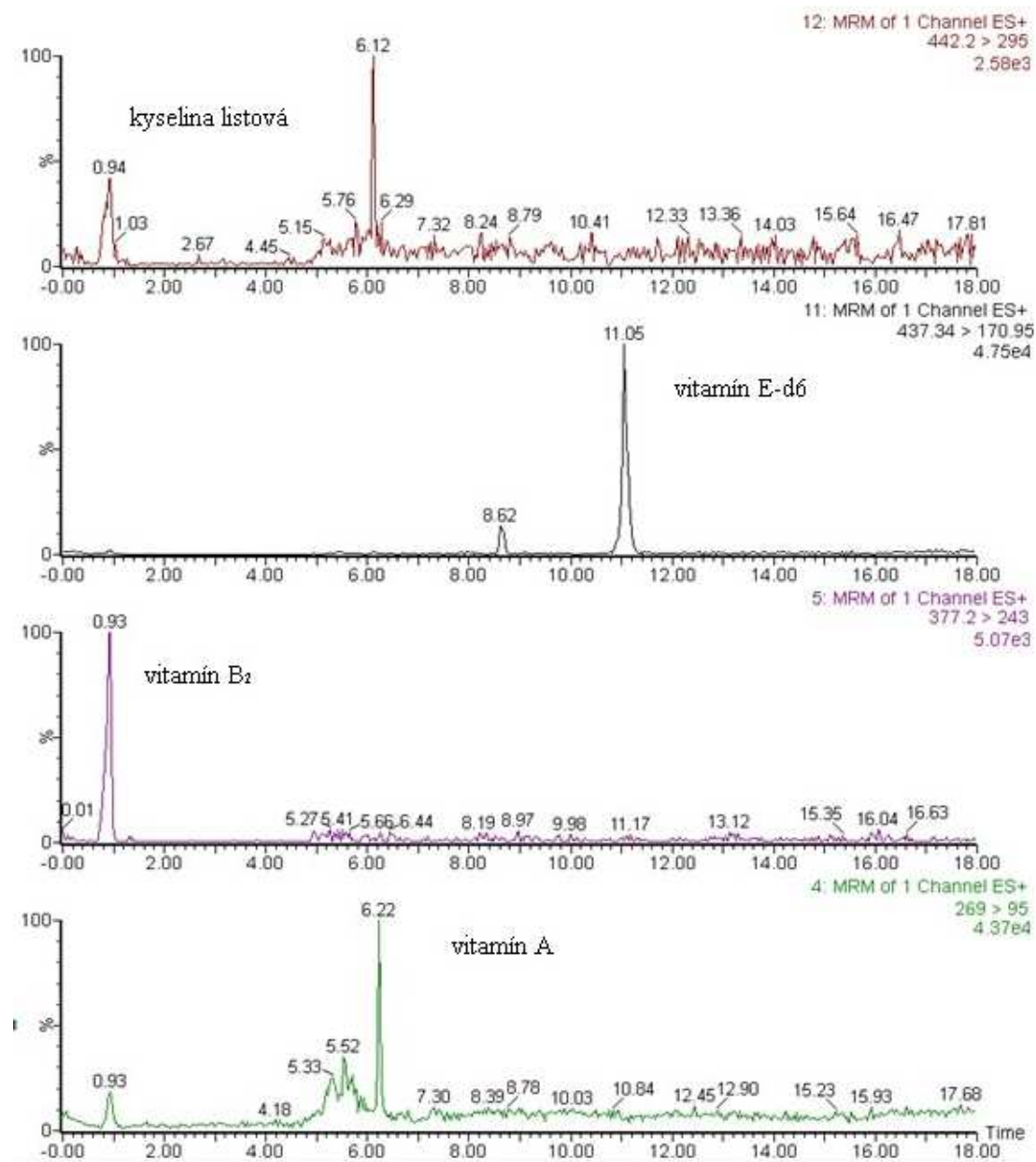
Příloha č. 4: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 4



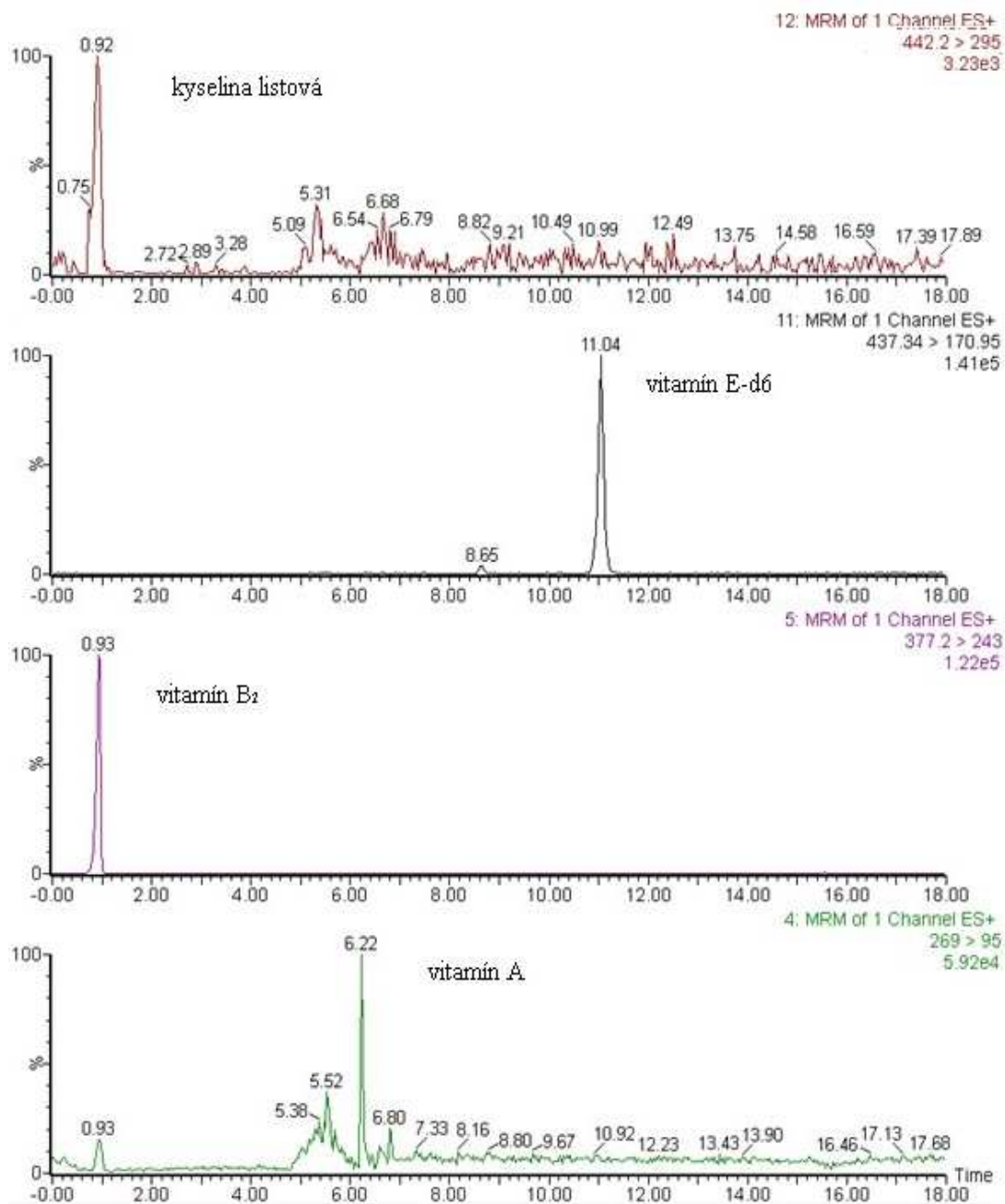
Příloha č. 5: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 5



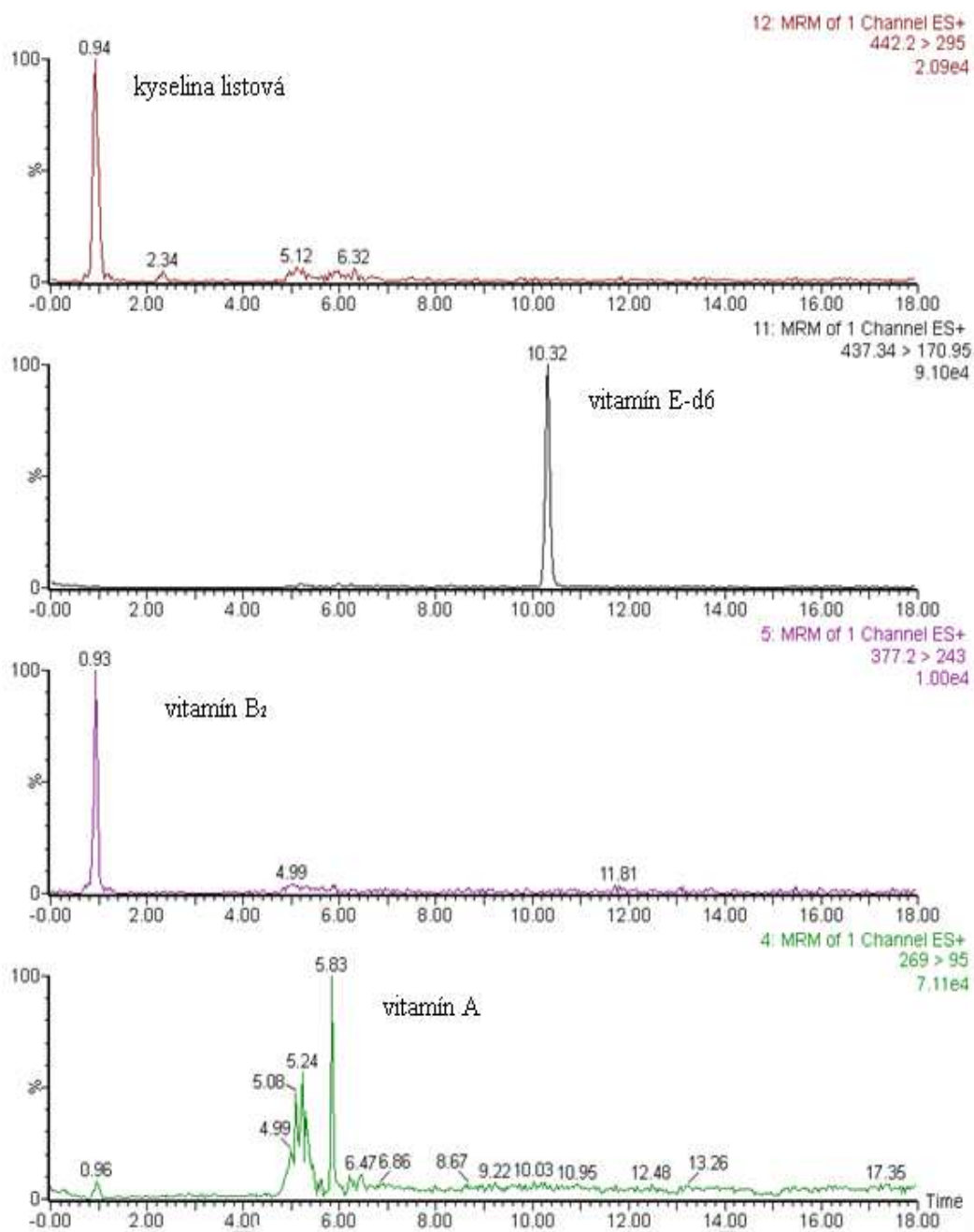
Příloha č. 6: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 6



Příloha č. 7: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 7



Příloha č. 8: Chromatogram vitamínů získaný při použití postupu přípravy č. 8



Příloha č. 9: Chromatogram patientského séra

