

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA COTMAN

**OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE ZA VREDNOTENJE VSEBNOSTI
LIPOFILNIH VITAMINOV V PLAZEMSKIH VZORCIH Z UPORABO
TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE, SKLOPLJENE Z MASNO
SPEKTROMETRIJO**

**OPTIMIZATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF
LIPOPHILIC VITAMINS IN PLASMA SAMPLES BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem izr. prof. dr. Robertu Roškarju mag. farm za vodenje pri raziskovalnem delu, strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi mami, bratu, Danielu in prijateljem, ki so na takšen ali drugačen način vplivali na uspešen zaključek študija, saj mi vedno stojijo ob strani in verjamejo vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Ljubljana, marec 2018

Katja Cotman

Predsednik komisije: Prof. dr. dr.h.c. Stanko Srčič, mag. farm.

Član komisije: Asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	v
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1. UVOD	1
1.1 VITAMIN A	1
1.2 VITAMIN D	3
1.3 VITAMIN E	5
1.4 VITAMIN K	6
1.5 KVANTIFIKACIJA LIPOFILNIH VITAMINOV V KRVI	8
1.5.1 Priprava vzorca	10
1.5.2 Instrumentalna analiza	11
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. MATERIALI	16
3.1.1. Standardi	16
3.1.2. Reagenti in topila	16
3.1.3. Plazma	16
3.1.4. Naprave in pribor	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Razvoj in optimizacija priprave vzorca	18
3.2.1.1. Priprava raztopin	18
3.2.1.2. Vodni vzorci	20
3.2.1.3. Plazemski vzorci	21
3.2.2. Instrumentalna metoda	21
3.2.2.1. Metoda LC	22
3.2.2.2. Metoda MS/MS	22
3.2.3. Validacija	23
3.2.3.1. Priprava raztopin	23
3.2.3.2. Priprava vzorcev	28
3.2.3.3. Vrednotenje metode	28
3.2.4. Analiza realnih plazemskih vzorcev	32
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA	33
4.1.1. Vodni vzorci	33

4.1.1.1. Ekstrakcija tekoče-tekoče.....	33
4.1.1.2. Sušenje	36
4.1.1.3. Raztapljanje suhega ostanka	37
4.1.2. Plazemski vzorci	38
4.2. VALIDACIJA	39
4.2.1. Vodni vzorci	40
4.2.1.1. Kalibracijska krivulja	40
4.2.1.2. Točnost	40
4.2.1.3. Ponovljivost	41
4.2.1.4. Stabilnost.....	41
4.2.2. Plazemski vzorci	42
4.2.2.1 Selektivnost	42
4.2.2.2. Kalibracijska krivulja	43
4.2.2.3. Točnost.....	44
4.2.2.4. Ponovljivost	44
4.2.2.5. Spodnja meja določitve (LLOQ).....	45
4.2.2.6. Stabilnost.....	45
4.2.2.7. Učinkovitost metode	47
4.3. ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV	49
5. SKLEPI	51
6. LITERATURA.....	53

POVZETEK

Lipofilni vitamini sodelujejo pri številnih fizioloških funkcijah v telesu in pomanjkanje lahko vpliva na težave z vidom, skeletom, povečanim oksidativnim stresom in hemoragijo. V zadnjem času je bilo objavljenih veliko raziskav, ki pomanjkanje lipofilnih vitaminov posredno povezujejo s povečanim tveganjem za nastanek raka, sladkorne bolezni tipa II in številnih imunskih bolezni.

Namen magistrske naloge je bil razviti, optimizirati in ovrednotiti novo metodo za sočasno vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov v plazemskih vzorcih z uporabo tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo. Odločili smo se za predstavnike vitaminov, ki se najpogosteje pojavljajo v krvi in se njihovo pomanjkanje povezuje s povečanim tveganjem nastanka številnih bolezni, in sicer za vitamine A (retinol), D2, D3, E (α -tokoferol) in K1 ter metabolit 25-OH D3.

Optimizirana priprava vzorca je vključevala 100 μ L plazemskega vzorca, ki smo ga oborili z acetonitrilom in ga nato ekstrahirali z etilacetatom. Ekstrakte smo posušili do suhega in raztopili v acetonitrilu ter analite ločili s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti na reverzno-fazni C18 koloni ter jih detektirali na masnem spektrometru tipa trojni kvadrupol z uporabo elektrorazprševalne ionizacije v pozitivnem načinu. Uspeli smo potrditi točnost in ponovljivost metode za vitamin A v območju 10-5000 μ g/L, vitamin E v območju 1-12000 μ g/L, vitamine D2, D3 in K1 v območju 10-5000 μ g/L. Za metabolit 25-OH D3 pa nam v območju 2–1000 μ g/L ni uspelo potrditi točnosti. Potrdili smo tudi selektivnost metode in preverili stabilnost analitov v plazemskih vzorcih pri različnih pogojih shranjevanja. Ugotovili smo, da je vitamin K1 nestabilen v delovni raztopini v kombinaciji z ostalimi vitamini. Med validacijo metode smo zaznali težave z učinkom matrice, ki precej zmanjša odzive analitov. To je tudi razlog, da nismo uspeli doseči dovolj nizkih mej določitve, da bi lahko v realnih plazemskih vzorcih izmerili vse preiskovane vitamine. V plazemskih vzorcih smo uspeli kvantitativno ovrednotiti metabolit 25-OH D3 s koncentracijami od 6,8 μ g/L do 24,2 μ g/L, vitamin A s koncentracijami od 253 μ g/L do 310 μ g/L in vitamin E s koncentracijami od 2,2 mg/L do 3,3 mg/L. Uspeli smo razviti novo metodo za sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov, ki pa potrebuje še nekaj izboljšav, da bi bila primerna za splošno uporabo v kliničnih laboratorijih.

Ključne besede

Lipofilni vitamini, plazma, LC-MS/MS, ekstrakcija tekoče tekoče

ABSTRACT

Lipophilic vitamins are part of several physiological functions in human body. Their deficiency can cause problems with sight, bones, increased oxidative cell stress and hemorrhage. Recent studies have linked deficiency of lipophilic vitamins with increased risk of cancer, type II diabetes mellitus and a number of immune system disorders.

The purpose of this master thesis was to develop, optimize and validate a new method for determination of lipophilic vitamins in plasma samples with use of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. We chose to analyze vitamins that are most common in blood stream and that their deficiency increases risk of many diseases. We developed a method for determination of metabolite 25-OH D3, vitamins A (retinol), D2, D3, E (α -tocopherol) and K1.

Optimized sample preparation included 100 μ L of plasma that we precipitated with acetonitrile and then extracted it with ethyl acetate. Extracts were dried and then reconstituted with acetonitrile. Separation was performed on chromatographic system with reversed phase C18 column and then detected on mass spectrometer with electrospray ionization in positive mode. Accuracy and precision were validated for vitamin A in range 10-5000 μ g/L, vitamin E in range 1-12000 μ g/L, vitamins D2, D3 and K1 in range 10-5000 μ g/L. Validation of accuracy for metabolite 25-OH D3 in range 2–1000 μ g/L was not successful. Selectivity and stability of vitamins in plasma samples were also verified. We confirmed that analytical method has some problems with matrix effect, which was the reason we did not manage to reach lowest limits of qualification that would be low enough to determinate all analytes in plasma samples. In plasma samples we quantified metabolite 25-OH D3 with concentrations from 6,8 μ g/L to 24,2 μ g/L, vitamin A with concentrations from 253 μ g/L to 310 μ g/L and vitamin E with concentrations from 2,2 mg/L to 3,3 mg/L. We managed to develop new method for determination of lipophilic vitamins, that still needs some improvement before it could be used in clinical laboratories.

SEZNAM OKRAJŠAV

1,25-(OH) ₂ D3	kalcitriol
25-OH D3	kalcifediol
ACN	acetonitril
APCI	kemična ionizacija pri atmosferskem tlaku (ang. Atmospheric pressure chemical ionization)
DCM	diklorometan
DEE	dietileter
EA	etilacetat
ESI	elektrozprševalna ionizacija (ang. Electrospray ionization)
FDA	Ameriška agencija za hrano in živila (ang. Food and drug administration)
HEX	heksan
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High performance liquid chromatography)
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (ang. Liquid chromatography – mass spectrometry)
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (ang. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry)
LDL	lipoprotein z nizko gostoto (ang. Low density lipoprotein)
LLE	ekstrakcija tekoče-tekoče (ang. Liquid-liquid extraction)
LLOQ	spodnja meja določitve (ang. Lowest limit of qualification)
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MRM	multirezidualna analiza (ang. Multiple Reaction Monitoring)
PP	obarjanje proteinov (ang. Protein precipitation)
R ²	determinacijski koeficient
RSD	relativni standardni odklon
SF	stacionarna faza
SLE	podprta tekoča ekstrakcija (ang. Supported liquid extraction)
SPE	ekstrakcija trdno-tekoče (ang. Solid phase extraction)
UP	umeritvena premica
UV	ultravijoličen

VDR	vitamin D receptor
VIS	vidna svetloba
VLDL	lipoprotein z zelo nizko gostoto (ang. Very low density lipoprotein)

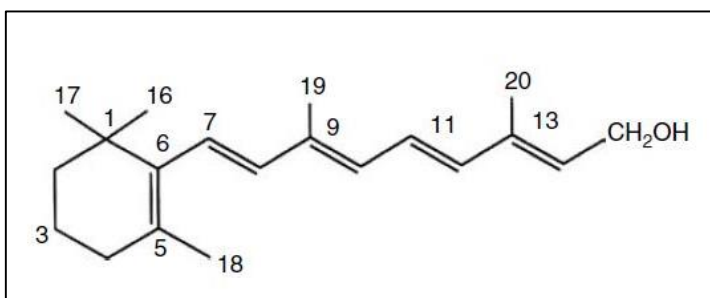
1. UVOD

Vitamini so organske molekule, ki so v majhnih količinah nujno potrebne za delovanje različnih bioloških funkcij. Telo jih ne more sintetizirati v zadostnih količinah, zato jih moramo zaužiti s hrano. Poznanih je 13 različnih vitaminov, ki jih glede na topnost v vodi razdelimo na vodotopne in lipofilne. Vodotopni vitamini so vitamin C in B-kompleks, ki ga sestavlja 8 različnih B vitaminov. Vodotopni vitamini se ne shranjujejo v telesu in se izločajo z urinom, zato jih moramo dnevno nadomeščati s hrano ali s prehranskimi dopolnili. Vodotopni vitamini se pri pripravi hrane ali ob neprimernem shranjevanju lahko uničijo. Vitamini B-kompleksa sodelujejo kot koencimi, pri pridobivanju energije iz hrane, poleg tega so potrebni za normalno delovanje vida, apetita, kože, živčnega sistema in nastanka eritrocitov. Vitamin C je antioksidant, ki ščiti celice in tkiva pred oksidativnim stresom. Sodeluje tudi pri sintezi kolagena, ki je vezivno tkivo, ki povezuje mišice, kosti in ostala tkiva med seboj (1).

Lipofilni vitamini so A, D, E in K, ki se absorbirajo v tankem črevesju, s saponifikacijo, v prisotnosti maščob. Presežek lipofilnih vitaminov se shranjuje v maščobnih tkivih in v jetrih, zato vsakodnevno uživanje teh vitaminov ni potrebno. Pomanjkanje lipofilnih vitaminov lahko vodi do različnih zdravstvenih zapletov, obenem pa lahko prekomerno uživanje prehranskih dopolnil povzroči toksičnost (2).

1.1 VITAMIN A

Termin vitamin A se uporablja za retinol (slika 1) in vse njemu podobne molekule, ki imajo enako biološko aktivnost, to so retinojska kislina, retinal in retinil palmitat (2). Vitamin A (v obliki retinilnih estrov) pridobimo z uživanjem živalske hrane, veliko ga zaužijemo z organi klavnih živali, z ribami, z maslom, s polnomastnim mlekom in z ostalimi mlečnimi izdelki. Zaužijemo ga lahko tudi z rastlinsko hrano v obliki provitamina A (karotenoidi, predvsem β -karoten) (3).



Slika 1: Struktura retinola, povzeto po (3)

Metabolizem

V črevesju se zaužiti retinilni estri hidrolizirajo v retinol in proste maščobne kisline, ki se nato absorbirajo v enterocite. Karotenoide v enterocitih 15,15-monooksidaza pretvori v retinal in nato ga retinal reduktaza pretvori v retinol. Večina retinola v enterocitih se esterificira v retinilne estre, ki se vežejo v hilomikrone in v tej obliki izločajo v limfatični sistem. 70% zaužitega vitamina A se shranjuje v jetrnih celicah v obliki retinil palmitata. V krvi se veže na retinol vezujoči protein ali pa na tiroksin vezujoči protein. V tarčnih celicah so receptorji za retinol, retinal in retinojsko kislino (2).

Fiziološka funkcija

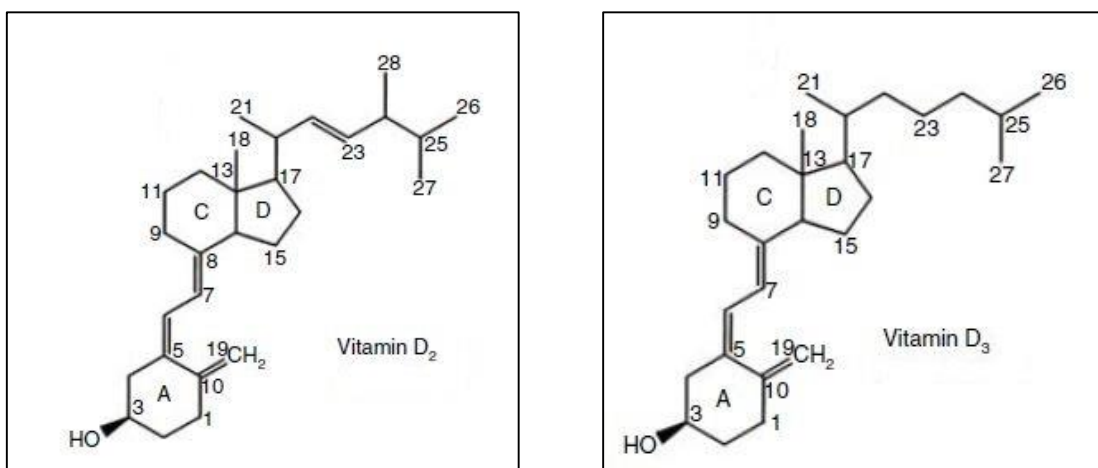
Glavna fiziološka funkcija vitamina A je povezana z vidnim ciklom. Retinol se v epitelijskih celicah očesa pretvori v 11-cis-retinol in nato oksidira do 11-cis-retinala, ki na paličicah na notranji strani očesa reagira z opsinom v rodopsin. Z izpostavitvijo svetlobnim fotonom se 11-cis-retinol izomerizira v trans-retinal, ki se nato sprošča iz kompleksa. To sproži fotokemične spremembe, ki možganom pošljejo signal, da je prišlo do vidnega dogodka (2). Vitamin A sodeluje tudi pri delovanju imunskega sistema. Pomanjkanje zmanjša zaščitno funkcijo mukoznih epitelnih celic respiratornih, urogenitalnih in gastrointestinalnih poti. Poleg tega moti razvoj nevtrofilcev, poveča sproščanje vnetnih citokinov iz makrofagov ter zmanjša število naravnih celic ubijalk (4). Sodeluje tudi pri embriogenezi, celični rasti, diferenciaciji celic in apoptozi celic (5). Vitamin A zavira rast in vpliva na apoptozo tumorskih celic, zato bi se lahko uporabljal v terapevtske namene za zdravljenje raka (6). Vitamin A ima vlogo v regulaciji metabolizma ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov, kar je posledica uravnavanja izražanja kritičnih genov v različnih metabolnih poteh (7).

Koncentracija v krvi

Kot indikator stanja vitamina A v telesu se vrednoti retinol v krvi, saj je ta homeostatsko reguliran in njegova koncentracija upade takrat, ko je v jetrni zalogi večje pomanjkanje. O pomanjkanju govorimo, ko je koncentracija retinola v serumu nižja od 200 $\mu\text{g/L}$, normalna vrednost je okoli 700 $\mu\text{g/L}$ (8). Referenčne vrednosti za odrasle osebe v slovenskih laboratorijih so od 1,05-2,8 $\mu\text{mol/L}$ (51). Pomanjkanje vitamina A je pogosto v slabše razvitih državah, pri manjših otrocih in nosečnicah, ki imajo slabo prehrano. Simptomi so nočna slepota, kseroftalmija in pogoste infekcije (3). Pretirano uživanje prehranskih dopolnil lahko povzroči toksičnost vitamina A. Znaki zastrupitve so slabost, bruhanje, glavobol, omotica in zamegljen vid (3).

1.2 VITAMIN D

Pod izraz vitamin D uvrščamo skupino sterolov, med drugimi tudi vitamin D₂ (ergokalciferol) (slika 2) in vitamin D₃ (holekalciferol) (slika 2). Vitamin D₂ v telo vnesemo z rastlinsko hrano, vitamin D₃ pa v manjši meri z uživanjem hrane živalskega izvora in v večini s sintezo iz derivata holesterola (7 – dehidroholesterol) pod vplivom ultravijolične svetlobe (295-300 nm) (2).



Slika 2: Struktura vitamina D₂ in D₃, povzeto po (3)

Metabolizem

Vitamin D₃ se v krvi veže na transportni protein transkalciferin ali na vitamin D₃ vezujoči protein, ki vitamin D₃ prenese do jeter, kjer ga citokrom P450 encimi hidroksilirajo v 25-hidroksivitamin D₃ (25-OH D₃). 25-OH D₃ je glavni metabolit vitamina D₃ v krvi in služi kot zaloga vitamina D v telesu. V ledvicah poteče metabolizem neaktivne oblike 25-OH D₃ v aktivno obliko kalcitriol (1,25-(OH)₂ D₃), ki je odgovorna za biološko aktivnost vitamina D₃ v telesu. Nastanek kalcitriola uravnava parathormon, ki ob pomanjkanju kalcija in fosforja v krvi pospeši sintezo kalcitriola. V celicah tarčnih organov se kalcitriol veže na vitamin D₃ receptor (VDR) in njegova aktivacija povzroči spremembo hitrosti transkripcije tarčnih genov, kar vpliva na biološki odziv (3). Vezava na VDR istočasno poveča sintezo encima CYP24A1, ki je odgovoren za pretvorbo kalcitriola v inaktivno obliko kalcitriolne kisline. Ta je vodotopna in se izloča skozi žolč. Metabolizem in fiziološka funkcija vitamina D₂ je podobna vitaminu D₃ (2).

Fiziološka funkcija

Glavna naloga vitamina D je uravnavanje normalnih vrednosti kalcija in fosforja v telesu ter mineralizacija kosti. Vitamin D mobilizira in sprošča kalcij in fosfor iz kosti, poveča njuno

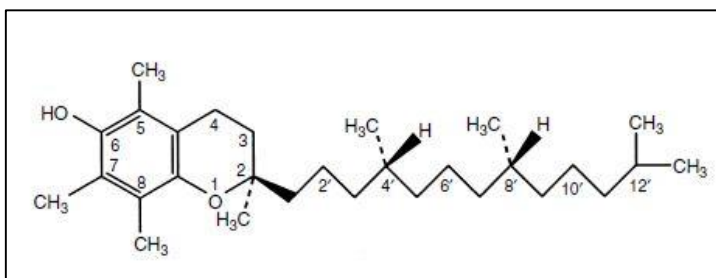
absorpcijo v črevesju in reabsorpcijo ledvicah (3). Pomanjkanje vitamina D povzroči nepravilno mineralizacijo kosti in nastanek rahitisa pri otrocih ter osteomalacije pri odraslih. Pomanjkanje vitamina D lahko prispeva k razvoju osteoporoze, ni pa glavni razlog za njen nastanek. Skupaj z bifosfonati in kalcijem se uporablja za zdravljenje osteoporoze (10). VDR receptorji se nahajajo v različnih celicah po celotnem organizmu, zato je v zadnjem času veliko raziskav usmerjenih v razlago povezav med pomanjkanjem vitamina D in patogenezo različnih ne-skeletnih bolezni. Vitamin D zavira delovanje renin-angiotenzinskega sistema, zato ugodno deluje na srčno-žilni sistem (12). Pozitiven učinek ima tudi na metabolizem ogljikovih hidratov, saj kalcitriol poveča izločanje inzulina iz pankreasa. Posledično ima pomanjkanje vitamina D vpliv na povečano tveganje za sladkorno bolezen tipa II (13). Odkrita je bila tudi povezava med vitaminom D in imunskim sistemom, saj $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ lahko zavira proliferacijo limfocitov T, poleg tega pa imajo makrofagi sposobnost sinteze $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (14). Pomanjkanje vitamina D je pogosto povezano z različnimi infekcijskimi boleznimi, na primer s tuberkulozo (15), vplivalo pa naj bi tudi na povečano tveganje za multiplo sklerozo (16) in astmo (17). Nizke vrednosti 25-OH D_3 v krvi številne študije povezujejo s povečanim tveganjem za pojav kognitivne disfunkcije, Alzheimerjeve bolezni in demence (9). VDR receptorje so našli tudi na različnih malignih celicah, zato trenutno potekajo raziskave, da bi analoge kalcitriola uporabljali za zaviranje proliferacije in diferenciacije malignih celic (14).

Koncentracija v krvi

Za merjenje vitamina D v telesu se v krvi vrednoti 25-OH D_3 , saj ni reguliran s strani hormonov in njegova koncentracija predstavlja najboljši približek zaužitega in endogenega vitamina D. Poleg tega ima krajši razpolovni čas (24 ur) kot vitamin D (2-3 tedne) in daljši kot $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (4 ure). Normalna vrednost 25-OH D_3 v krvi je nekje $65\ \mu\text{g/L}$, do pomanjkanja pride pod $10\ \mu\text{g/L}$ in toksičen je nad $100\ \mu\text{g/L}$. Koncentracija $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ v obtoku je 1000x manjša, vitamina D pa podobna 25-OH D_3 (11). Referenčne vrednosti 25-OH D_3 za odrasle osebe v slovenskih laboratorijih so od $32\text{-}165\ \text{nmol/L}$ (51). Vitamin D lahko s prekomernim uživanjem vitaminskih prehranskih dopolnil deluje toksično, kar pa z dolgotrajnim izpostavljanjem UV svetlobi ni mogoče, saj se presežek vitamina D3 pretvori v lumisterol in tachisterol. Ta proces deluje tudi v obratni smeri, ko je v telesu pomanjkanje vitamina D3 (2).

1.3 VITAMIN E

Vitamin E delimo v dve skupini; tokoferole in tokotrienole, vsak od njih ima štiri izomere (α , β , γ in δ) glede na pozicijo in število metilnih skupin na aromatskem obroču. S hrano zaužijemo največ γ -tokoferola, vendar je α -tokoferol (slika 3) najpogosteje prisoten v krvnem obtoku in obenem tudi najbolj antioksidativno učinkovit (2). Največ α -tokoferola zaužijemo z rastlinskimi olji in različnimi oreščki (3).



Slika 3: Struktura α -tokoferola, povzeto po (3)

Metabolizem

Vitamin E se absorbira v tankem črevesju, tako da se micelizira v prisotnosti maščob in žolčnih soli in nato s pasivno absorpcijo preide v enterocite. Tam se združi s hilomikroni in tako potuje po krvnem obtoku. Ko pride do tarčnega organa, ga lipoproteini lipaze hidrolizirajo in v tkivo vstopa v obliki tokoferolov ali tokotrienolov. V jetrih encimi citokroma P450 pretvorijo vitamin v bolj hidrofilne metabolite, ki se lahko izločajo iz telesa. Le α -tokoferol lahko preide nazaj v krvni obtok, s pomočjo α -tokoferol transportnega proteina (α -TTP). V krvnem obtoku se prenaša z vezavo na lipoprotein z nizko gostoto (LDL) in lipoprotein z zelo nizko gostoto (VLDL) (2).

Fiziološka funkcija

Najbolj poznan učinek vitamina E v telesu je njegova antioksidativna lastnost, ki ščiti maščobne kisline celične membrane pred radikali. Študije so pokazale, da mešanica različnih tokoferolov bolje ščiti eritrocite pred lipidno peroksidacijo, kot samo α -tokoferol. α -tokoferol predvsem preprečuje nastanek novih radikalov, medtem ko γ -tokoferol ujame in nevtralizira že obstoječe proste radikale. Oksidacija je povezana s številnimi stanji / boleznimi, kot so rak, staranje, artritis in siva mrena. Vitamin E preprečuje nastanek teh (18). Deluje preventivno pri nastanku ateroskleroze, saj hkrati zavira vnetje, ščiti lipoproteine pred oksidacijo in zavira proces strjevanja krvi, kar so glavni vzroki za nastanek ateroskleroze (19). Poleg tega γ -tokoferol pozitivno vpliva na srčno-žilni sistem, s tem da

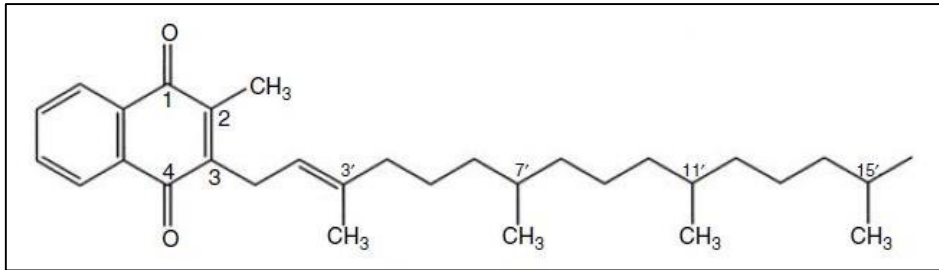
poveča sintezo dušikovega monoksida, ki je vazodilatator (20). Vitamin E deluje tudi protirakavo, saj stimulira p53, ki je tumor zavirajoči gen in zavira angiogenezo z blokado rastnega faktorja alfa 3 (21). γ -tokoferol zavira rast tumorskih celic z zmanjševanjem nastajanja ciklinov, kar ustavi celični cikel tumorskih celic in tako prepreči njihovo proliferacijo. Zavira tudi vaskularizacijo tumorjev (22). Pri Alzheimerjevi bolezni gre za propadanje nevronskih celic, kar je posledica oksidacije proteinov in peroksidacije lipidov, ki jo povzročata, s strani radikalov, oksidativni stres in vodikov peroksid. Vitamin E preprečuje nastajanje vodikovega peroksida in s tem citotoksičnost (23). Dokazano je bilo, da vitamin E stimulira odpornost telesa, poveča humoralni in celični imunski odziv in inducira fagocitozo (24).

Koncentracija v krvi

Kot indikator za dokazovanje vitamina E se uporablja α -tokoferol, katerega koncentracija se precej spreminja glede na spol, starost in količino maščob v krvi. Zato bi bilo bolje, če bi se kot označevalec uporabljalo razmerje med koncentracijo α -tokoferola in celotnim holesterolom v krvi (2). Normalna krvna koncentracija α -tokoferola je okoli 9 mg/L, za pomanjkanje pa gre, ko je koncentracija nižja od 5 mg/L (25). Referenčne vrednosti za odrasle osebe v slovenskih laboratorijih so od 12-46 μ mol/L (51). Do pomanjkanja vitamina E pride redko, le v primerih, ko gre za težave z absorpcijo maščob ali z njihovim metabolizmom, saj je vitamin E prisoten skoraj v vseh hranilih. Simptomi pomanjkanja so mišična šibkost, težave z vidom, spremembe imunskega sistema, težave s hojo, tremor in slabše ravnotežje (3).

1.4 VITAMIN K

Vitamin K je v naravi prisoten v dveh oblikah filokinon (vitamin K1) (slika 4) in različnih oblikah menakinonov (vitamin K2). Vitamin K1 je prisoten predvsem v zeleni listnati zelenjavi, menakinoni (MK-4 do MK-13), ki so v večini bakterijskega izvora, pa so prisotni v živalski hrani in fermentirani hrani. Večino menakinonov sintetizirajo bakterije v človeških prebavilih. Edino MK-4 sintetizira človeško telo samo, s pretvorbo iz filokinona (26).



Slika 4: Struktura vitamina K1, povzeto po (3)

Metabolizem

Vitamin K1 in menakinoni se absorbirajo v tankem črevesju, tako da se solubilizirajo z žolčnimi solmi, s produkti pankreatične lipaze in z ostalimi lipidi iz hranil. V enterocitih se vežejo na hilomikrone, se skupaj izločijo v limfatične kapilare in nato v krvni obtok. V tarčne celice vstopajo z endocitozo regulirano s strani lipoproteinskih receptorjev (npr. LDLR in LRP). V jetrih se vežejo na lipoprotein z zelo nizko gostoto (VLDL), ki se v krvnih kapilarah razgradi v lipoprotein z nizko gostoto (LDL) in v taki obliki lahko vstopajo v celice različnih organov, kot so možgani, kosti, srce in trebušna slinavka (27).

Fiziološka funkcija

Vitamin K deluje kot koencim karboksilazi, ki je encim potreben za sintezo proteinov, ki sodelujejo v homeostazi (protrombin (faktor II), faktorji VII, IX, X, protein C, protein S in protein Z), in proteinov v kostni presnovi (osteokalcin in matriks Gla-protein) (28). V sistematičnem pregledu Cockayne-a je bilo dokazano, da povečan vnos vitamina K1 in MK-4 izboljša kostno gostoto pri ženskah z osteoporozo. Dodajanje MK-4 prehrani je značilno zmanjšalo število zlomov kolka in vretenc (29). Vitamin K ugodno deluje tudi na preprečevanje srčno-žilnih bolezni. Matriks Gla-protein, katerega sinteza je odvisna od vitamina K, zmanjšuje kalcifikacijo žil, ki zmanjša elastičnost aort in arterij in je eden izmed dejavnikov tveganja za nastanek koronarne srčne bolezni. To je še posebno pomembno za bolnike s kronično ledvično boleznijo, saj je pri njih kalcifikacija žil še bolj pogosta (30).

Koncentracija v krvi

Normalna koncentracija vitamina K1 v plazmi je od 0,1 µg/L do 1,2 µg/L (31). V krvi je veliko manj vitamina K, kot ostalih lipofilnih vitaminov, saj se zelo hitro metabolizira in izloča iz telesa (26). Indikator, ki se uporablja za preverjanje stanja vitamina K v krvi, je protrombinski čas. Uživanje vitamina K v večji meri ne spremeni protrombinskega časa, vendar je opazna razlika, če pride do večjega pomanjkanja. Do pomanjkanja vitamina K najpogosteje pride pri novorojenčkih, zaradi slabega prehajanja skozi posteljico,

pomanjkanja bakterij v novorojenčkovih prebavilih, majhne koncentracije faktorjev strjevanja krvi in nizke koncentracije vitamina K v materinem mleku. Simptomi pomanjkanja so krvavitve in hemoragija, ki so za novorojenčka lahko usodne. Pri odraslih redko pride do pomanjkanja, ponavadi je posledica malabsorpcije maščob (3).

1.5 KVANTIFIKACIJA LIPOFILNIH VITAMINOV V KRVI

Lipofilni vitamini so potrebni za delovanje širokega spektra fizioloških funkcij. Zaradi novo odkritih povezav med pomanjkanjem lipofilnih vitaminov in večjo pojavnostjo številnih bolezni se je povečala tudi potreba po merjenju koncentracij lipofilnih vitaminov v krvi (2). Cilj novih analiznih metod je, da sočasno izmerimo čim več različnih vitaminov, saj to omogoča širši pregled nad stanjem v telesu, poleg tega pa je analiza manj invazivna za pacienta, ker je potrebnega manj biološkega materiala.

V kliničnih laboratorijih se koncentracije lipofilnih vitaminov v krvi vrednoti z uporabo tekočinske kromatografije sklopljene z UV detekcijo, z elektrokemično detekcijo ali z masnim spektrometrom (LC-MS). Uporabljajo se tudi radioimunološke metode (RIA), avtomatska kemiluminiscenca in imunološke metode (32). V starejši literaturi je navedeno, da je včasih analitika lipofilnih vitaminov temeljila predvsem na HPLC-UV/VIS, v zadnjem času pa se trend obrača bolj proti razvoju metod z uporabo LC-MS, ki omogočajo kvantifikacijo analitov v bioloških vzorcih s precej nižjimi koncentracijami. To je razvidno tudi iz preglednice I, kjer so bile spodnje meje določitve (LLOQ) za iste analite pri uporabi HPLC-UV metode tudi do desetkrat nižji, kot pri uporabi LC-MS.

Za merjenje vitamina D (25-OH D) v krvi se največ uporabljajo imunološke metode (2). Te delujejo tako, da se protitelo veže na 25-OH D ali na vitamin D vezujoči protein (VDVP) in nato 25-OH D- konjugirana molekula tekmuje z molekulami 25-OH D v serumu, Višja kot je koncentracija molekul v serumu, slabši je odziv konjugiranih molekul (34). CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) smernice zahtevajo, da je LLOQ za vse imunološke metode za merjenje 25-OH D nižji od 25 nmol/L (0,01 µg/mL) (34). Prednosti imunoloških metod v primerjavi s kromatografskimi metodami so, da so avtomatizirane, imajo boljši izkoristek, so hitrejše in enostavnejše za uporabo (2). Slabosti imunoloških metod so, da ne omogočajo kvantifikacije molekul z majhnimi molekulskimi masami, da so reagenti dragi in da so manj selektivne in občutljive kot LC-MS metode (32). Težave imunoloških metod za merjenje vitamina D v krvi so, da je analit zelo lipofilen, da je v krvi veliko vitamin D

vezujočega proteina in da je v krvi veliko metabolitov vitamina D, ki oslabijo selektivnost metode (34). V večini imunološke metode za merjenje koncentracij vitamina D ne razločijo med 25-OH D2, epi-25-OH D3 in 25-OH D3, kar pa omogočajo analize na LC-MS (33). Razvoj in validacija nove metode na LC-MS je enostavnejša kot razvoj nove imunološke metode, zato se v zadnjem času razvija predvsem veliko novih analiznih metod za sočasno merjenje lipofilnih vitaminov z uporabo LC-MS, ki se postopoma prenašajo tudi v klinične laboratorije (33). V preglednici I so predstavljene novejšje analitske metode z uporabo LC-MS za sočasno kvantifikacijo lipofilnih vitaminov v krvi.

Preglednica I: Pregled novejših metod za kvantifikacijo lipofilnih vitaminov v krvi

Članek	Priprava vzorca	Količina vzorca	Analizna metoda	Analiti	Območje (µg/L)	LLOQ (µg/L)	Koncentracija v plazmi (µg/L)
(35) (2017)	PP +LLE	400 µL, plazme	LC-MS ESI	A	57-5700	184	1174-1747
				α-tokoferol	17-43000	56	1507-3489
(36) (2017)	SLE	200 µL, plazme	LC-MS ESI	25-OH D2	20–1400	2	NP
				25-OH D3	20–1400	0,3	NP
				α-tokoferol	1600–112000	1600	NP
				α-tokotrienol	20–1400	0,2	NP
				β-tokoferol	20–1400	0,2	NP
				γ-tokoferol	20–1400	0,2	NP
				δ-tokoferol	20–1400	0,2	NP
				γ-tokotrienol	20–1400	2	NP
				δ-tokotrienol	20–1400	2	NP
				K1	2–14	0,02	NP
(37) (2016)	PP+LLE	100 µL, plazme	LC-MS ESI	25-OH D2	1,65-66	1,4	20-22,8
				Epi 25OH D3	1,6-64	1,5	16-19
				25-OH D3	1,6-80	1,4	28-40,4-
				A	29-115	29	143-146
(38) (2016)	PP+LLE	200 µL, plazme	LC-MS ESI	α-tokoferol	1700-30000	430	9000-14644
				25-OH D3	1-500	1,2	12,94-23,6
				1,25-(OH) ₂ D3	0,25-25	0,5	2,01-2,37
				A	1-3000	0,05	790-980
				α-tokoferol	1-20000	50	5990-10070
(39) (2016)	PP+LLE	50 µL seruma / plazme	LC-MS APCI	K1	1-500	0,33	0,53-0,62
				25-OH D2	10-400	20	30,3
				25-OH D3	6,8-400	13	527
				A	8,6-29000	NP	23,6
				α-tokoferol	40-43000	NP	14472
				γ-tokoferol	71-42000	NP	971
				K1	0,15-15	0,3	1,01
(40) (2016)	PP+LLE	200 µL, plazme	LC-MS APCI	25-OH D3	11-5000	11	76±13
				D3	18-10000	18	NP
				A	5-10000	5	33±3
				A-acetat	8-10000	8	< LOQ
				α-tokotrienol	376-5000	376	NP

(41) (2007)	PP+LLE	1 mL, seruma	LC-MS ESI	25-OH D2	1-500	0,4	7,5±0,3
				25-OH D3	1-500	0,6	4,5±0,4
				1,25-(OH) ₂ D3	0,5-25	0,5	NP
				D2	1-500	0,2	45,5±3,6
				D3	1-500	0,3	29,0±1,4
				A	10-2500	0,05	533±10
				α-tokoferol	200-1000	0,04	2926±150
				δ-tokoferol	5-1000	0,15	51,8±3,4
				K1	1-500	0,1	7,2±0,5
				K3	5-1000	1	NP
(42) (2004)	SPE	100 μL, seruma	HPLC- DAD	D3	0,5-25	0,17 (LOD)	0,03-0,05
				A	0,2-25	0,07 (LOD)	0,3-1,1
				α-tokoferol	0,5-25	0,17 (LOD)	2,2-6,5
				δ-tokoferol	1-25	0,33 (LOD)	1,0-1,4
				α-E-acetat	1-25	0,33 (LOD)	NP
				K1	0,1-25	0,03 (LOD)	NP
				K2	0,1-25	0,33 (LOD)	NP
K3	0,1-25	0,33 (LOD)	NP				

*PP-obarjanje proteinov, LLE-ekstrakcija tekoče-tekoče, SLE-podprta tekoča ekstrakcija, SPE-ekstrakcija trdno-tekoče, HPLC-MS-tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo, APCI- kemična ionizacija pri atmosferskem tlaku. ESI-elektrozaprševalna ionizacija, HPLC-DAD- tekočinska kromatografija z detektorjem na niz fotodiod, LLOQ-spodnja meja določitve, LOD- spodnja meja zaznavnosti, NP-ni podatka

1.5.1 Priprava vzorca

Pred analizo na LC- MS sistemu je potrebno vzorec očistiti ostalih komponent krvi (npr. lipidi, proteini, soli,...), ki lahko povzročijo zamašitev kolone ali pa lahko vplivajo na odziv analitov. Samo čist vzorec omogoča, da je analizna metoda dovolj občutljiva, točna in natančna. Pri vrednotenju lipofilnih vitaminov v plazmi so za pripravo vzorcev najpogosteje uporabljali obarjanje proteinov (PP), kateremu je sledila ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE). PP je enostavna metoda priprave vzorca, ki se pogosto uporablja pri analizah plazemskih vzorcev. PP se izvede tako, da se plazemskemu vzorcu doda organsko topilo, ki povzroči obarjanje in nato se vzorec centrifugira, da se oborjene proteine lahko loči od supernatanta. Za obarjanje proteinov so v izbrani literaturi uporabili metanol (MeOH) (35, 37, 38, 41), etanol (39, 40), izopropanol (36) in acetonitril (ACN) (42). Uporabili so od 2-4-kratno količino organskega topila, glede na volumen plazme v vzorcu. Pri nekaterih metodah so po obarjanju proteinov vzorec centrifugirali in nato ekstrahirali samo supernatant (38, 41, 42). Po obarjanju proteinov lahko v vzorcu ostanejo vodotopne komponente, ki so jih v večini metod odstranili z uporabo LLE (35, 37, 38, 39, 40, 41). LLE je enostavna, cenovno ugodna metoda, ki zaradi velike izbire ekstrakcijskih topil, omogoča veliko prilagajanja glede na preiskovane analite. Slabost LLE je, da lahko pride do nastanka emulzij med vodno in organsko fazo, analiti so lahko topni v obeh fazah in težavo pa predstavljajo tudi velike

količine vnetljivih in toksičnih odpadnih organskih topil (43). Kot ekstrakcijsko topilo so v predstavljenih metodah uporabili heksan (35, 37, 38, 40, 41), mešanico izooktana in kloroforma v razmerju 3:1 (v/v) (39) in kombinacijo izopropanola in heptana v razmerju 3:7 (v/v) (36). Izkoristki ekstrakcij se niso preveč razlikovali glede na uporabljeno ekstrakcijsko topilo, saj so bili pri vseh metodah med 85-105%. V nekaterih študijah je bilo ekstrakcijsko topilo obogateno z antioksidantom (npr. terc-butilhidroksitoluen), ki zaščiti ekstrahirane lipofilne vitamine (39, 40). Ekstrakcije so večkrat ponovili in nato združene organske faze posušili s prepihanjem dušika pri povišani temperaturi. Za raztapljanje suhega ostanka so uporabili MeOH (35, 37, 38, 39, 40, 41). Proces LLE se lahko avtomatizira z uporabo mikrotitrskih plošč in robotskih delovnih enot, kar še olajša delo in omogoča prenos v klinični laboratorij (36, 39).

Izkoristek ekstrakcije je mogoče izboljšati z uporabo podprte tekoče ekstrakcije (SLE), pri kateri se vodna faza in vodotopne komponente med ekstrakcijo vežejo na stacionarno fazo iz diatomejske zemlje, ki je vstavljena v mikrotitrsko ploščo. SLE omogoča, da istočasno analiziramo tako vodotopne kot tudi lipofilne analite (36). Pogosto uporabljen način priprave bioloških vzorcev je tudi ekstrakcija trdno-tekoče (SPE), pri kateri se analiti vežejo na trdno stacionarno fazo in jih nato z uporabo elucijskega topila speremo. Prednost SPE pred LLE je, da omogoča boljše izkoristke ekstrakcije, ni težav z nastankom emulzij, potreben je manjši volumen organskega topila, volumen vzorca je manjši in metodo je lažje avtomatizirati. Slabost SPE pa je, da lahko pride do zamašitve kolone zaradi velike viskoznosti ali do obarjanja vzorca (43). V primerjavi med SPE in LLE za pripravo vzorcev lipofilnih vitaminov v krvi pred analizo z LC-MS, se je kot bolj učinkovita izkazala trikratna LLE s heksanom (41).

1.5.2 Instrumentalna analiza

V zadnjem času je metoda tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo (LC-MS) postala najboljša izbira za vrednotenje analitov v bioloških vzorcih, saj omogoča fizično ločbo analitov s tekočinsko kromatografijo (LC) in specifičnost in občutljivost detekcije z masno spektrometrijo (MS) (44).

Pri LC gre za porazdeljevanje vzorca med trdno stacionarno fazo (SF) in tekočo mobilno fazo (MF). Najpogosteje uporabljana LC tehnika je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Poznamo adsorpcijsko, porazdelitveno, izključitveno in ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Porazdelitvena kromatografija se deli na normalno-fazno in

reverzno-fazno kromatografijo. Večinoma se v sistemu LC-MS uporablja reverzno-fazna kromatografija, kjer je MF bolj polarna od SF. Stacionarna faza je sestavljena iz poroznih ali neporoznih silikatnih delcev na katere so vezane verige ogljikovodikov (C4, C5, C8, C18). Reverzno-fazna kromatografija se uporablja predvsem za ločevanje nepolarnih analitov, saj le ti s SF vzpostavijo hidrofobne interakcije, nato pa jih s SF odstranimo s postopnim zmanjševanjem polarnosti MF. MF je ponavadi sestavljena iz vode in organskega modifikatorja (npr. MeOH ali ACN), dodani pa so ji še drugi anorganski dodatki, ki morajo biti za uporabo v sistemu LC-MS hlapni, sicer lahko pride do kontaminacije MS ali do supresije ionizacije. Najpogosteje se uporabljajo mravljinčna ali očetna kislina (0,1% ali manj) ter amonijev acetat/format (2-10 mM), ki pripomorejo k boljši ionizaciji in posledično povečanemu odzivu masnega spektrometra (43).

V predstavljenih analitskih metodah so za vrednotenje lipofilnih vitaminov v krvi uporabljali reverzno-fazno kromatografijo s C18 kolonami (36, 37, 38, 39, 41). Kolone so izpirali gradientno s pomočjo binarne črpalke, ki glede na program, tekom analize meša MF iz dveh različnih rezervoarjev. Pri analizi metodi Khaskari et. al. so kot MF A uporabili mešanico ACN in vode v razmerju 9:1 (v/v), kot MF B pa 100% MeOH. Obe MF sta vsebovali 5 mM amonijev format, ki izboljša ionizacijo lipofilnih vitaminov, saj le ti v svoji strukturi ne vsebujejo funkcionalnih skupin, ki bi omogočale enostavno protonizacijo ali deprotonizacijo molekule. Gradientno izpiranje so začeli s 100% MF A, ki so jo po 6 minutah zmanjšali na 0% (6). Tudi v ostalih metodah so uporabljali podobno sestavo MF.

Masna spektrometrija deluje na principu ionizacije analitov in jih nato loči glede na hitrost potovanja v električnem ali magnetnem polju zaradi različnega razmerja med njihovo maso in nabojem (m/z). Naloga ionizacijskega izvira je, da upari organsko topilo vzorca po izločitvi iz LC ter da upari in ionizira preiskovane analite. Ionizacijske tehnike se delijo na tiste, ki delujejo pri atmosferskem tlaku (API) in tiste, ki delujejo v vakumu (kemična ionizacija (CI), ionizacija z elektroni (EI), bombardiranje s hitrimi atomi (FAB), ionizacija z desorpcijo ionov iz trdnega matriksa z laserjem (MALDI)). Med API ionizacijske tehnike uvrščamo elektrorazprševalno ionizacijo (ESI), kemično ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI) in fotoionizacijo pri atmosferskem tlaku (APPI). API ionizacijske tehnike povzročajo minimalno fragmentacijo ionov, med tem ko ostale tehnike, ki za ionizacijo porabijo več energije, generirajo znaten razpad osnovnega iona.

ESI je najpogosteje uporabljena ionizacijska tehnika za vrednotenje analitov v bioloških vzorcih, saj je najmanj invazivna in jo lahko uporabljamo tudi za kvantitativno vrednotenje

termo labilnih molekul (43). Deluje tako, da v ionskem izvoru MF z raztopljenimi analiti prehaja v nabito električno polje in tako nastajajo nabite kapljice. Kapljice nato potujejo skozi sušilni plin, ki počasi izpareva topilo in s tem se povečuje gostota naboja v kapljici in ko so odbojne sile v kapljici večje od privlačnih sil, pride do eksplozije kapljic, ki povzročijo prehod ioniziranih molekul v plinasto fazo, ki nato prehajajo v MS (14). Ločimo pozitivni (ESI+) in negativni (ESI-) način ionizacije, glede na naboj, ki ga ima ionizirana molekula, to pa je odvisno od njenih funkcionalnih skupin (45). Slabost ESI je, da lahko pride do supresije ionizacije, zaradi vsebnosti visokih koncentracij pufrov, soli ali drugih endogenih komponent matrice (43). Najpogosteje so v predstavljenih analiznih metodah za lipofilne vitamine so uporabljali ESI+ način ionizacije (35, 36, 37, 38, 41).

Druga uporabljena ionizacijska tehnika za vrednotenje lipofilnih vitaminov v krvi je APCI (39, 40). APCI je primeren predvsem za manj polarne analite, pri katerih dobimo z uporabo ESI šibko ionizacijo. Pri APCI MF z analiti prehaja v segreti ionski izvor (450-550°C), ki povzroči takojšno uparevanje topila in analitov. Ionizacija poteka, ko so molekule v plinastem stanju in se naboj prenese z »corona needle« na molekule topila, ki nato ionizirajo še molekule analita. APCI tehnika je manj občutljiva za supresijo ionov in omogoča detekcijo drugačnega spektra analitov kot ESI (predvsem nizko molekularne spojine), ni pa primerna za analizo termolabilnih analitov ter je v splošnem manj učinkovita kot ESI (43). Ioni nato potujejo v masni analizator, ki jih loči glede na razmerje med maso in nabojem (m/z). Poznamo več različnih masnih analizatorjev, kot so enojni (Q) in trojni (QQQ) kvadrupolni analizator, analizator z ionsko pastjo (IT), analizator časa preleta (TOF) in analizator s Fourierjevo transformacijo (FT-ICR).

Tandemski masni spektrometer (MS/MS) je sklopitev dveh masnih analizatorjev v enem instrumentu (43). Najpogosteje se uporablja QQQ analizator, ki omogoča zelo občutljivo kvantitativno analizo že poznanih analitov. QQQ je sestavljen iz treh kvadrupolov (masnih filtrov), ki prepušča le ione z določenim razmerjem m/z (slika 5). V prvem kvadrupolu analizator filtrira izbrane starševske ione, v drugem kvadrupolu (kolizijski celici) se ti po trku s kolizijskim plinom fragmentirajo v hčerinske ione, ki se nato v tretjem kvadrupolu ponovno ločijo glede na njihovo m/z razmerje, preden pridejo na masni detektor, kjer jih ta detektira (43).



Slika 5: Shematski prikaz QQQ analizatorja, povzeto po (32)

QQQ analizator omogoča različne načine detekcije. Ione lahko merimo v širokem spektralnem območju (»scan« način) ali pa lahko spremljamo samo en izbrani starševski ion in njegove hčerinske ione, takrat govorimo o SRM prehodih (ang. *Selected reaction monitoring*). Kadar opazujemo več SRM prehodov hkrati, govorimo o MRM prehodih (ang. *Multiple reaction monitoring*) (32). V vseh predstavljenih analiznih metodah (preglednica I), kjer so uporabljali LC-MS/MS, so izbrali MRM način detekcije.

2. NAMEN DELA

V zadnjih letih je bilo dokazanih veliko novih povezav med lipofilnimi vitamini in fiziološkimi funkcijami človeškega telesa. Ugotovljeno je bilo, da je pomanjkanje lipofilnih vitaminov posredno povezano s povečanimi možnostmi za razvoj raka, sladkorne bolezni tipa II, številnih imunskih, skeletnih in krvno-žilnih bolezni. Nova odkritja pomenijo, da obstajajo vse večje potrebe po vrednotenju vsebnosti lipofilnih vitaminov v krvi. Poznanih je že nekaj analiznih metod, ki pa ne omogočajo kvantitativnega vrednotenja vseh lipofilnih vitaminov sočasno. Namen našega dela je razviti analizno metodo, ki bo čim bolj enostavna, hitra, učinkovita in bo omogočala sočasno vrednotenje vsebnosti vitaminov A, E, K1, D2, D3 in metabolita vitamina D3 (25-OH D3) v čim manjšem volumnu biološkega vzorca. Izbrali bomo predstavnike vitaminov, ki se najpogosteje pojavljajo v krvnem obtoku.

Razvili in optimizirali bomo pripravo vzorca z obarjanjem proteinov skupaj z ekstrakcijo tekoče-tekoče in nadaljevali s sušenjem pod tokom dušika in z raztapljanjem suhega ostanka. Izbrali bomo najbolj učinkovito deproteinizacijsko topilo, ekstrakcijsko topilo, najboljši način ekstrakcije, sušenja in raztapljanja ekstrahiranega vzorca. Razvoj bomo začeli na obogatenih vodnih vzorcih in nato optimizirano metodo prenesli na plazemske vzorce. Pripravljene vzorce bomo analizirali s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Izbrali bomo najbolj primerno mobilno fazo in kromatografske pogoje ter poiskali optimalne MRM prehode.

Po optimizaciji postopka priprave vzorca bomo metodo ustrezno ovrednotili po smernicah FDA za vrednotenje analiz metod za biološke vzorce. Vrednotili bomo selektivnost, kalibracijske krivulje analitov, točnost, ponovljivost, spodnjo mejo določitve, stabilnost in učinkovitost metode. Dodatno bomo po priporočilih Matuszewskega določili še učinkovitost ekstrakcije in učinek matrice. V zaključku bomo analizno metodo preizkusili na realnih plazemskih vzorcih z namenom kvantitativno ovrednotiti prisotne izbrane vitamine.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Standardi

- Retinol (vitamin A), $C_{20}H_{30}O$; čistost $\geq 97,5\%$ (HPLC); Sigma – Aldrich, Nemčija
- Ergokalciferol (vitamin D2), $C_{28}H_{44}O$; čistost $\geq 98,0\%$ (HPLC); Sigma – Aldrich, Nemčija
- Holekalciferol (vitamin D3) $C_{27}H_{44}O$; čistost $\geq 98,0\%$ (HPLC); Sigma – Aldrich, Nemčija
- (\pm)- α -tokoferol (vitamin E) $C_{29}H_{50}O_2$; Ph. Eur, Fluka analytical, Sigma – Aldrich, Nemčija
- Kalcifediol (25OH D3) $C_{27}H_{44}O_2$; čistost $\geq 99,0\%$ (HPLC); Sigma – Aldrich, Nemčija
- Vitamin K1 ($C_{31}H_{46}O_2$); čistost $\geq 99,0\%$ (HPLC); Sigma – Aldrich, Nemčija

3.1.2. Reagenti in topila

- Destilirana voda, Fakulteta za farmacijo
- Ultračista voda – Mili-Q voda, Fakulteta za farmacijo
- Etilacetat (EA) $CH_3COOC_2H_5$ – Reag. Ph. Eur; Panreac, Španija
- Aceton C_3H_6O za HPLC; čistost $\geq 99,0\%$; Sigma – Aldrich, Nemčija
- Heksan $CH_3(CH_2)_4CH_3$ za HPLC; čistost $\geq 95,0\%$; Sigma – Aldrich, Nemčija
- Dietileter (DEE) $(CH_3CH_2)_2O$; Emsure[®] ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.; Merck KGaA, Nemčija
- Diklorometan (DCM) CH_2Cl_2 ; Emsure[®] ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.; Merck KGaA, Nemčija
- Acetonitril (ACN) CH_3CN ; za HPLC; čistost $\geq 99,9\%$; ChromasolV[®]; Sigma-Aldrich, Nemčija
- Metanol (MeOH) CH_3OH ; za HPLC; čistost $\geq 99,9\%$; ChromasolV[®]; Sigma-Aldrich, Nemčija
- Metanol (MeOH) CH_3OH ; za LC – MS; čistost $\geq 99,9\%$; ChromasolV[®]; Sigma-Aldrich, Nemčija
- Mravljinčna kislina $HCOOH$ 98-100%; Suprapur[®]; Merck KGaA, Nemčija
- Stisnjen dušik N_2 ; Messer, Ruše, Slovenija

3.1.3. Plazma

Plazmo smo dobili iz Zavoda za transfuzijsko medicino (Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana) in jo shranjevali v zamrzovalniku pri $-20^\circ C$. Plazmo smo pred uporabo odmrznili

na sobni temperaturi in jo premešali na Vibromix mešalniku. Uporabili smo več različnih plazem, tako za razvoj in optimizacijo metode, za validacijo in za preverjanje metode na realnih plazemskih vzorcih.

Uporabljene plazme:

Plazma 1: odvzem: 06.05.2014 (št. 2294203)

Plazma 2: odvzem: 07.01.2014 (št. 2237102)

Plazma 3: odvzem: 17.09.2013 (št. 2148860)

Plazma 4: odvzem: 25.04.2014 (št. 2164559)

Plazma 5: odvzem: 24.4.2014 (št. 2205271)

Plazma 6: odvzem: 19.09.2013 (št. 2164544)

3.1.4. Naprave in pribor

- Zamrzovalnik -20 °C; Gorenje, Slovenija
- Zamrzovalnik – 80 °C; Sanyo Electronic Biomedical; Japonska
- Hladilnik 2-8 °C; LTH, Slovenija
- Tehtnica AG 245; Mettler Toledo, Švica
- Aparat Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, ZDA),
- steklovina (merilne bučke, merilni valji, čaše, čolnički za tehtanje, viala z inserti in z zamaški)
- ostali pribor: spatule, parafilm, nastavki za pipete
- Avtomatske pipete: 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL; Eppendorf Research, Nemčija
- Mikrocentrifugirke: 1,5 mL in 2 mL ISO LAB, Laborgeräte GmbH, Nemčija
- Mešalnik Vibromix 10; Tehtnica, Slovenija
- Ultrazvočna kadička Sonis 4; Iskra, Slovenija
- Centrifuga Eppendorf 5415[®]; Eppendorf, Nemčija
- TurboVap[®] LV; Caliper, ZDA
- **Analitski sistem LC-MS/MS:**
- Agilent 1290 Infinity UHPLC; Agilent Technologies, ZDA; vsebuje: razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor DAD
- Agilent 6460 MSD Triple Quadropole LC-MS; Agilent Technologies, ZDA; z Jetstream[®] ESI ionskim izvorom

- Kolona: Kinetex C18 50×2,1 mm; 2,6 μm s predkolono C18 4×2 mm (Phenomenex, ZDA),

- Programska oprema: MassHunter Workstation software

3.2. METODE

3.2.1. Razvoj in optimizacija priprave vzorca

3.2.1.1. Priprava raztopin

Raztopine standardov vitaminov A, D2, D3, E in K1

Raztopine standardov s koncentracijo približno 200 mg/L smo pripravili tako, da smo na tehtnici natehtali približno 2 mg kupljenega standarda, ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in ga raztopili z ACN. Standarde smo ovili s parafilmom in jih shranjevali v hladilniku pri 5 °C. V preglednici II so podane mase natehtanih standardov in njihove koncentracije.

Preglednica II: Natehte in koncentracije raztopin standardov vitaminov.

Standard	Masa (mg)	Koncentracija (mg/L)
Vitamin A	2,03	203
Vitamin D2	2,03	203
Vitamin D3	2,11	211
Vitamin E	2,02	202
Vitamin K1	1,99	199

Raztopina standarda metabolita 25-OH D3

Kupili smo 1 mg metabolita 25-OH D3, ki smo ga raztopili v 1 mL MeOH in pripravili osnovno raztopino standarda s koncentracijo 1000 mg/L, ki smo jo shranjevali v zamrzovalniku pri – 20 °C.

Iz osnovne raztopine standarda metabolita 25-OH D3 s koncentracijo 1000 mg/L smo pripravili standard s koncentracijo 2 mg/L, ki smo ga uporabljali pri pripravi *delovnega standarda*. Standard smo pripravili tako, da smo 20 μL osnovnega standarda dodali v 10 mL bučko in razredčili z ACN. Bučko smo ovili s parafilmom in jo do uporabe shranjevali v hladilniku pri 5 °C.

Delovni standard za optimizacijo priprave vodnih vzorcev

Iz standardov metabolita 25-OH D3, vitaminov A, D2, D3, E in K1 smo pripravili delovni standard za obogatitve vodnih vzorcev. Koncentracije analitov v delovnem standardu smo prilagodili, tako da so imeli vsi analiti podobne odzive. V preglednici III so predstavljeni

volumni osnovnih standardov, ki smo jih dodali v 10 mL bučko in dopolnili z ACN ter njihove koncentracije v delovnem standardu za vodne vzorce.

Preglednica III: Koncentracije vitaminov v delovnem standardu za obogatenje vodnih vzorcev in v vodnih vzorcih.

Osnovni standard	Volumen (μL)	Koncentracija v delovnem standardu ($\mu\text{g/L}$)	Koncentracija v vodnem vzorcu ($\mu\text{g/L}$)
25-OH D3 2 mg/L	2500	500	100
Vitamin A 200 mg/L	50	1000	200
Vitamin D2 200 mg/L	50	1000	200
Vitamin D3 200 mg/L	25	500	100
Vitamin E 200 mg/L	25	500	100
Vitamin K1 200 mg/L	50	1000	200

Obogateni vodni vzorci (OVVr)

V 2 mL mikrocentrifugirke smo prenesli 200 μL destilirane vode, dodali 50 μL delovnega standarda in premešali na Vibromix mešalniku. Koncentracije posameznih vitaminov so prikazane v preglednici III. Kasneje smo količine vode in delovnega standarda zmanjšali za polovico, vendar so koncentracije ostale enake.

Delovni standard za optimizacijo priprave plazemskih vzorcev

V delovni standard za optimizacijo priprave plazemskih vzorcev smo dodali osnovne standarde metabolita 25-OH D3, vitaminov D2, D3 in K1. Vitaminov A in E nismo dodajali, saj se analita že v plazmi nahajata v zadostnih količinah, da jih lahko zaznamo z LC-MS/MS. Koncentracije analitov smo prilagodili, glede na rezultate optimizacije vodnih vzorcev. V preglednici IV so predstavljeni volumni osnovnih standardov, ki smo jih dodali v 10 mL bučko in dopolnili z ACN ter njihove koncentracije v delovnem standardu za plazemske vzorce.

Preglednica IV: Koncentracije vitaminov v delovnem standardu za obogatenje plazemskih vzorcev in v plazemskih vzorcih.

Osnovni standard	Volumen (μL)	Koncentracija v delovnem standardu ($\mu\text{g/L}$)	Koncentracija v plazemskem vzorcu ($\mu\text{g/L}$)
25-OH D3 2 mg/L	1250	250	50
Vitamin D2 200 mg/L	50	1000	200
Vitamin D3 200 mg/L	25	500	100
Vitamin K1 200 mg/L	50	1000	200

Obogateni plazemski vzorci (OPVr)

V 2 mL mikrocentrifugirke smo prenesli 100 μ L plazme št. 5 ali 6 (3.1.3. Plazma), dodali 25 μ L delovnega standarda in premešali na Vibromix mešalniku. Koncentracije posameznih vitaminov so prikazane v preglednici IV.

Standard za vrednotenje priprave vzorca

Vsak dan smo iz delovnega standarda, ki smo ga uporabljali v tistem dnevu, pripravili standard za vrednotenje uspešnosti priprave vzorca. V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 100 μ L delovnega standarda, mu dodali 900 μ L ACN in premešali na Vibromix mešalniku. Tako smo pripravili standard pri katerem so bile koncentracije 10-krat nižje, kot pri delovnem standardu, saj je tudi pri pripravi vzorca končni vzorec 10-krat redčen.

3.2.1.2. Vodni vzorci

Razvoj in optimizacijo priprave vzorca smo začeli na obogatenih vodnih vzorcih (OVVr). Pri razvoju postopka smo izhajali iz metode, ki so jo uporabili Konieczna et al. (38). Metodo smo želeli optimizirati, da bi bila čim bolj učinkovita, točna in ponovljiva. Pripravo vzorca smo začeli z ekstrakcijo tekoče-tekoče in sicer, tako da smo v 2 mL mikrocentrifugirki vodnemu vzorcu (3.2.1.1. Obogateni vodni vzorci (OVVr)) dodali ekstrakcijsko topilo, vzorec mešali na Vibromix mešalniku, ga dali na ultrazvočno kadičko (UZ) za 10 minut in ga nato 10 min centrifugirali pri 10000 obratih pri 25 °C. Potem smo v novo 2 mL mikrocentrifugirko prenesli 80 % organske faze, jo posušili pri povišani temperaturi s prepihanjem dušika in jo raztopili v organskem topilu. Pri optimizaciji priprave vodnih vzorcev smo pri vsakem poskusu spreminjali enega izmed parametrov, ki so predstavljeni v preglednici V.

Preglednica V: Vrednotenje parametrov pri optimizaciji priprave vodnih vzorcev.

Korak	Parameter	
Ekstrakcija tekoče tekoče	Ekstrakcijsko topilo	EA, Heksan, Aceton, DEE, DCM in kombinacije
	Razmerje plazma : topilo	1:1,5; 1:2,5; 1:3,5; 1:5; 1:6; 1:7
	Količina plazme (μ L)	200, 150, 100
	Čas mešanja (min)	1, 5
	Uporaba UZ kadičke	DA / NE
	Večkratna ekstrakcija	Enkratna, dvakratna, trikratna
Sušenje	Temperatura (°C)	35, 40, 45, 50
Raztapljanje suhega ostanka	Topilo	ACN, MeOH in kombinacije
	Količina topila (μ L)	200, 150, 100
	Čas mešanja (s)	30, 60, 90

3.2.1.3. Plazemski vzorci

Po optimizaciji parametrov na vodnih vzorcih smo izboljššan postopek prenesli na plazemske vzorce, na katerih smo naredili še nekaj preizkusov, da bi čim bolj izboljšali postopek priprave vzorca. Obogatenim plazemskim vzorcem (3.2.1.1. *Obogateni plazemski vzorci (OVPr)*) smo najprej dodali 275 μ L deproteinizacijskega topila, ki obori plazemske proteine. Preverjali smo ali je uporaba deproteinizacijskega topila smiselna in katero topilo (MeOH ali ACN) je bolj učinkovito. Poleg tega smo ugotavljali ali je po obarjanju sploh potrebno izvesti LLE. Zanimalo nas je tudi, ali se učinkovitost metode izboljša, če pred ekstrakcijo oborjene proteine odstranimo s pomočjo centrifuge, in ekstrahiramo samo supernatant. Da bi izboljšali učinkovitost metode, smo poizkusili zamenjati vrstni red dodajanja standarda, ACN in EA. Preverili smo, če se rezultat kaj izboljša, če po deproteinizaciji vzorec pustimo 1 uro na sobni temperaturi / 1 uro v hladilniku / čez noč v hladilniku in ga šele nato ekstrahiramo. V literaturi je bilo omenjeno, da lahko dodatek NaOH izboljša ekstrakcijo analitov v organsko fazo, zato smo po dodatku ACN v OPVr v vzorec dodali še 10 μ L 1M NaOH in nato nadaljevali po običajnem postopku. V preglednici VI so prikazani različni postopki, ki smo jih preizkusili, z namenom izboljšave učinkovitosti metode.

Preglednica VI: Različni postopki za optimizacijo priprave plazemskih vzorcev.

Postopek	1. postopek	2. postopek	3. postopek	4. postopek	5. postopek	6. postopek	7. postopek
Vrstni red dodajanja topil	1. plazma 2. standard 3. ACN 4. EA	1. plazma 2. ACN 3. standard 4. EA	1. plazma 2. EA 3. standard 4. ACN	1. plazma 2. standard 3. ACN 4. EA	1. plazma 2. standard 3. ACN 4. EA	1. plazma 2. standard 3. ACN 4. EA	1. plazma 2. standard 3. ACN 4. EA
1h na sobni T	NE	NE	NE	DA	NE	NE	NE
1h v hladilniku	NE	NE	NE	NE	DA	NE	NE
Čez noč v hladilniku	NE	NE	NE	NE	NE	DA	NE
Dodatek NaOH	NE	NE	NE	NE	NE	NE	DA

Končni, optimiziran postopek za pripravo plazemskih vzorcev je opisan v poglavju 3.2.3.2. *Priprava vzorcev.*

3.2.2. Instrumentalna metoda

Pri optimizaciji in razvoju priprave vzorca in tudi kasneje pri validaciji metode smo uporabili instrumentalno metodo tekočinske kromatografije ultra visoke zmogljivosti sklopljeno z tandemskim masnim spektrometrom s trojnim kvadrupolom.

3.2.2.1. Metoda LC

Za kromatografsko ločbo smo uporabili kromatograf Agilent 1290 Infinity UHPLC z reverzno-fazno kolono Kinetex C18 50 × 2,1 mm; 2,6 µm. V analiznih metodah, ki so zbrane v preglednici I, so najpogosteje uporabljali kolono C18, zato smo se tudi mi odločili za takšen tip reverzno-fazne kolone. V preglednici VII so podani pogoji kromatografske ločbe, ki smo jo uporabili pri analizi metode.

Preglednica VII: Pogoji kromatografske ločbe.

Parameter	Nastavitve
Volumen injiciranja	2,0 µL
Mobilna faza A	0,05% mravljinčna kislina v MilliQ vodi
Mobilna faza B	100% MeOH
Pretok mobilne faze	0,50 mL/min
Temperatura kolone	50,0 °C

Mobilna faza je bila sestavljena iz dveh komponent, katerih delež črpalka, glede na nastavitve, med analizo avtomatsko spreminja. MF A sestavlja 0,05% mravljinčna kislina, ki olajša ionizacijo analitov. MF B pa je MeOH, ki je organski modifikator, ki povečuje nepolarnost MF in s tem prispeva k sproščanju nepolarnih vitaminov s stacionarne faze. Pri analizi smo uporabili metodo gradientnega izpiranja kolone, pri kateri imamo v različnih časovnih točah, različno sestavo mobilne faze. Gradientno izpiranje je prikazano v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Sestava mobilne faze tekom analize.

Časovni interval (min)	Delež mobilne faze A (%)	Delež mobilne faze B (%)
0	15,0	85,0
1,0	5,0	95,0
4,1	5,0	95,0
4,2	15,0	85,0
4,8	15,0	85,0

Retencijski čas metabolita 25-OH D3 je 0,76 min, vitamina A 0,84 min, vitamina D2 1,59 min, vitamina D3 1,61 min, vitamina E 1,89 min in vitamina K1 2,63 min.

3.2.2.2. Metoda MS/MS

Pri analizi smo uporabljali masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim analizatorjem. Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici IX.

Preglednica IX: Nastavitve masnega analizatorja.

Parameter	Nastavitve
Vir ionizacije	Pozitivna ionizacija (ESI+)
Sušilni plin	275 °C, 10 L/min
Jetstream plin	320 °C, 11 L/min
Nebulizacijski plin	30 psi
Napetost na šobi	1000 V
Napetost na kapilari	4000 V

Z injiciranjem raztopin standardov vitaminov smo določili njihove optimalne MRM prehode. Pri vsakem analitu smo izbrali dva prehoda, prvi je služil za kvantitativno vrednotenje, drugi pa za kvalitativno, ker smo z razmerjem med njima potrdili identifikacijo analitov. Izbrani MRM prehodi za analite so podani v preglednici X.

Preglednica X: Izbrani MRM prehodi za analite.

MRM prehodi	
25-OH D3	<u>401,3→365,4</u> ; Frag (V): 62; CE (V):1 401,3→383,3; Frag (V): 62; CE (V):1
Vitamin A	<u>269,2→93,1</u> ; Frag (V): 82; CE (V):15 269,2→81,1; Frag (V): 82; CE (V):15
Vitamin D2	<u>397,4→69,1</u> ; Frag (V): 82; CE (V):22 397,4→271,2; Frag (V): 82; CE (V):5
Vitamin D3	<u>385,4→259,4</u> ; Frag (V): 92; CE (V):5 385,4→105,2; Frag (V): 92; CE (V):60
Vitamin E	<u>431,4→137,1</u> ; Frag (V): 108; CE (V):45 431,4→165,1; Frag (V): 108; CE (V):17
Vitamin K1	<u>451,4→187,1</u> ; Frag (V): 78; CE (V):21 451,4→57,2; Frag (V): 78; CE (V):37

Podčrtani MRM prehodi so za kvantitativno vrednotenje; Fragmentor (Frag), kolizijska energija (CE)

3.2.3. Validacija

3.2.3.1. Priprava raztopin

Raztopine standardov vitaminov A, D2, D3, E in K1 za validacijo

Raztopine standardov vitaminov A, D2, E in K1 s koncentracijo približno 100 mg/L smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici natehtali približno 1 mg kupljenega standarda, ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in bučko dopolnili z ACN. Standard vitamina D3 smo pripravili s koncentracijo 200 mg/L, zato da smo lahko kasneje pripravili mešanice standardov z dovolj visoko koncentracijo. Standarde smo ovili s parafilmom in jih skozi celoten postopek validacije shranjevali v hladilniku pri 8 °C. V preglednici XI so podane mase natehtanih standardov in njihove koncentracije.

Preglednica XI: Natehte in koncentracije raztopin standardov vitaminov za validacijo.

Standard	Masa (mg)	Koncentracija (mg/L)
Vitamin A	1,02	102
Vitamin D2	1,19	119
Vitamin D3	2,07	207
Vitamin E	1,05	105
Vitamin K1	1,08	108

Delovne raztopine za umeritveno premico vodnih vzorcev (UPv)

Delovne raztopine smo pripravili iz raztopin standardov vitaminov A, D2, D3, E in K1 za validacijo in pa iz raztopine standarda metabolita 25-OH D3 s koncentracijo 1000 mg/L (3.2.1.1. Raztopina standarda metabolita 25-OH D3). Najprej smo pripravili standard z najvišjo koncentracijo. V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 250 µL raztopine standarda vitamina D3 s koncentracijo 200 mg/L, 500 µL raztopine standarda vitamina D2 s koncentracijo 100 mg/L, 500 µL raztopine standarda vitamina K1 s koncentracijo 100 mg/L, 500 µL raztopine standarda vitamina A s koncentracijo 100 mg/L, 50 µL raztopine standarda vitamina E s koncentracijo 100 mg/L, 10 µL raztopine standarda metabolita 25-OH D3 s koncentracijo 1000 mg/L in 190 µL ACN. Ta standard smo nato v 2 mL mikrocentrifugirki redčili z ACN v ustreznem razmerju, da smo dobili naslednji standard z nižjo koncentracijo. Podrobnejši postopek priprave delovnih raztopin in njihovih koncentracij je predstavljen v preglednici XII.

Preglednica XII: Postopek priprave in koncentracije vitaminov v delovnih raztopinah za umeritveno premico vodnih vzorcev.

Delovni standard	Vitamin A, D2, D3, K1 (µg/L)	Vitamin E (µg/L)	25-OH D3 (µg/L)	Postopek priprave
UPv1	25000	2500	5000	/
UPv2	12500	1250	2500	500 µL UPv1 + 500 µL ACN
UPv3	5000	500	1000	400 µL UPv2 + 600 µL ACN
UPv4	2500	250	500	500 µL UPv3 + 500 µL ACN
UPv5	1250	125	250	500 µL UPv4 + 500 µL ACN
UPv6	500	50	100	400 µL UPv5 + 600 µL ACN
UPv7	250	25	50	500 µL UPv6 + 500 µL ACN
UPv8	125	12,5	25	500 µL UPv7 + 500 µL ACN
UPv9	50	5	10	400 µL UPv8 + 600 µL ACN

Za pripravo umeritvene premice smo vsak standard 10-krat redčili, saj tudi s postopkom priprave vzorca, vzorec 10-krat redčimo. To smo naredili tako, da smo v 2 mL mikrocentrifugirko dodali 100 µL UPv standarda in mu dodali 900 µL ACN.

Delovne raztopine za pripravo vodnih kontrolnih vzorcev (QCv)

Delovne raztopine za pripravo vodnih kontrolnih vzorcev (QCv) smo pripravili v treh različnih koncentracijah; visoki (QCvh), srednji (QCvm) in nizki (QCvl). Iz raztopin standardov vitaminov A, D2, D3, E in K1 za validacijo in iz raztopine standarda metabolita 25-OH D3 (3.2.1.1. *Raztopina standarda metabolita 25-OH D3*) smo najprej pripravili QCvh. V 5 mL bučko smo dodali 1000 µL raztopine standarda vitamina A, 1000 µL raztopine standarda vitamina D2, 1000 µL raztopine standarda vitamina K1, 500 µL raztopine standarda vitamina D3, 100 µL raztopine standarda vitamina E, 20 µL raztopine standarda metabolita 25-OH D3 in 1380 µL ACN. Iz QCvh smo nato z redčenjem pripravili še delovni raztopini z nižjimi koncentracijami, kar je prikazano v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Postopek priprave in koncentracije vitaminov v delovnih raztopinah za pripravo vodnih kontrolnih vzorcev.

Delovni standard	Vitamin A, D2, D3, K1 (µg/L)	Vitamin E (µg/L)	25-OH D3 (µg/L)	Postopek priprave
QCvh	20000	2000	4000	/
QCvm	2000	200	400	500 µL QCvh + 4500 µL ACN
QCvl	200	20	40	500 µL QCvm + 4500 µL ACN

Obogateni vodni vzorci za validacijo (OVVv)

V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 100 µL destilirane vode, nato dodali 25 µL ene izmed delovnih raztopin UPv ali QCv in nato premešali na Vibromix mešalniku. V preglednici XIV so prikazane koncentracije analitov v vodnih vzorcih za validacijo.

Preglednica XIV: Koncentracije vitaminov v obogatenih vodnih vzorcih za validacijo.

Obogateni vodni vzorec	Vitamin A, D2, D3, K1 (µg/L)	Vitamin E (µg/L)	25-OH D3 (µg/L)
V-UPv1	5000	500	1000
V-UPv2	2500	250	500
V-UPv3	1000	100	200
V-UPv4	500	50	100
V-UPv5	250	25	50
V-UPv6	100	10	20
V-UPv7	50	5	10
V-UPv8	25	2,5	5
V-UPv9	10	1	2
V-QCvh	4000	400	800
V-QCvm	400	40	80
V-QCvl	40	4	8

Delovne raztopine za umeritveno premico plazemskih vzorcev (UPp)

Delovne raztopine smo pripravili iz raztopin standardov vitaminov D2, D3, in K1 za validacijo in pa iz raztopine standarda metabolita 25-OH D3 s koncentracijo 1000 mg/L (3.2.1.1. *Raztopina standarda metabolita 25-OH D3*). Najprej smo pripravili standard z najvišjo koncentracijo. V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 250 µL raztopine standarda vitamina D3 s koncentracijo 200 mg/L, 500 µL raztopine standarda vitamina D2 s koncentracijo 100 mg/L, 500 µL raztopine standarda vitamina K1 s koncentracijo 100 mg/L, 10 µL raztopine standarda metabolita 25-OH D3 s koncentracijo 1000 mg/L in 240 µL ACN. Ta standard smo nato v 2 mL mikrocentrifugirki redčili z ACN v primernem razmerju, da smo dobili naslednji standard z nižjo koncentracijo. Podrobnejši postopek priprave delovnih raztopin in njihovih koncentracij je predstavljen v preglednici XV.

Preglednica XV: Postopek priprave in koncentracije vitaminov v delovnih raztopinah za umeritveno premico plazemskih vzorcev.

Delovni standard	Vitamin D2, D3, K1 (µg/L)	25-OH D3 (µg/L)	Postopek priprave
UPp1	25000	5000	/
UPp2	12500	2500	500 µL UPp1 + 500 µL ACN
UPp3	5000	1000	400 µL UPp2 + 600 µL ACN
UPp4	2500	500	500 µL UPp3 + 500 µL ACN
UPp5	1250	250	500 µL UPp4 + 500 µL ACN
UPp6	500	100	400 µL UPp5 + 600 µL ACN
UPp7	250	50	500 µL UPp6 + 500 µL ACN
UPp8	125	25	500 µL UPp7 + 500 µL ACN
UPp9	50	10	400 µL UPp8 + 600 µL ACN

Delovne raztopine za pripravo plazemskih kontrolnih vzorcev (QCv)

Delovne raztopine za pripravo plazemskih kontrolnih vzorcev (QCp) smo, enako kot pri QCv, pripravili v treh koncentracijah. Vsak dan validacije smo iz raztopin standardov vitaminov D2, D3, in K1 in iz raztopine standarda metabolita 25-OH D3 (3.2.1.1. *Raztopina standarda metabolita 25-OH D3*) smo najprej pripravili QCph. V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 400 µL raztopine standarda vitamina D2, 400 µL raztopine standarda vitamina K1, 200 µL raztopine standarda vitamina D3, 8 µL raztopine standarda metabolita 25-OH D3 in 992 µL ACN. Iz QCph smo nato z redčenjem pripravili še delovni raztopini z nižjimi koncentracijami, kar je prikazano v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Postopek priprave in koncentracije vitaminov v delovnih raztopinah za pripravo plazemskih kontrolnih vzorcev.

Delovni standard	Vitamin, D2, D3, K1 (µg/L)	25-OH D3 (µg/L)	Postopek priprave
QCph	20000	4000	/
QCpm	2000	400	100 µL QCph + 900 µL ACN
QCpl	400	80	200 µL QCpm + 800 µL ACN
DR-LLOQ	200	40	500 µL QCpl + 500 µL ACN

Pripravili smo tudi delovno raztopino za vrednotenje spodnje meje določitve (DR-LLOQ), ki smo jo pripravili z redčenjem QCpl. Postopek je predstavljen v preglednici XVI.

Obogateni plazemski vzorci za validacijo (OPVv)

V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 100 µL plazme št. 4 (3.1.3. Plazma), nato dodali 25 µL ene izmed delovnih raztopin UPP, QCp ali DR-LLOQ in nato premešali na Vibromix mešalniku. V preglednici XVII so prikazane koncentracije analitov v plazemskih vzorcih.

Preglednica XVII: Koncentracije vitaminov v obogatenih plazemskih vzorcih za validacijo.

Obogateni plazemski vzorec	Vitamin D2, D3, K1 (µg/L)	25-OH D3 (µg/L)
V-UPp1	5000	1000
V-UPp2	2500	500
V-UPp3	1000	200
V-UPp4	500	100
V-UPp5	250	50
V-UPp6	100	20
V-UPp7	50	10
V-UPp8	25	5
V-UPp9	10	2
V-QCph	4000	800
V-QCpm	400	80
V-QCpl	80	16
V-LLOQ	40	8

Prazne plazemske vzorce (P-B1, P-B2, P-B3) smo pripravili na enak način, le da smo namesto standarda k 100 µL plazme dodali 25 µL ACN. Uporabili smo plazemske vzorce št. 4, 5 in 6 (3.1.3. Plazma).

Standardi za vrednotenje učinkovitosti metode

Iz delovnih raztopin za pripravo plazemskih kontrolnih vzorcev (QCp) smo pripravili standarde za vrednotenje učinkovitosti metode. V 2 mL mikrocentrifugirko smo dodali 100 µL delovne raztopine, mu dodali 900 µL ACN in premešali na Vibromix mešalniku. Tako

smo pripravili standarde, pri katerih so bile koncentracije 10-krat nižje, kot pri delovnih raztopinah, saj ima tudi pri pripravi vzorca končni vzorec 10-krat nižjo koncentracijo.

3.2.3.2. Priprava vzorcev

Sam postopek priprave vodnih in plazemskih vzorcev je bil pri validaciji enak, razlika je le v pripravi obogatenih vzorcev, kot opisano v predhodnem poglavju. V 2 mL mikrocentrifugirki smo obogatenim vodnim vzorcem (3.2.3.1. *Obogateni vodni vzorci za validacijo (OVVv)*) ali obogatenim plazemskim vzorcem (3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo (OPVv)*) najprej dodali 275 μ L ACN, ki obori plazemske proteine in vzorec premešali na Vibromix mešalniku. Nato smo vzorec ekstrahirali tako, da smo dodali 700 μ L EA, ga mešali 1 minuto na Vibromix mešalniku, ga dali za 10 minut na ultrazvočno kadičko in ga centrifugirali 10 minut pri hitrosti 10000g pri 25 °C. Potem smo v novo 2 mL mikrocentrifugirko prenesli 800 μ L zgornje, organske faze, jo posušili pri 35 °C, z uporabo TurboVap® LV sistema in jo nato raztopili v 200 μ L ACN z mešanjem na Vibromix mešalniku 30 sekund.

3.2.3.3. Vrednotenje metode

Vrednotenje metode smo izvedli po smernicah Ameriške agencije za hrano in živila (FDA) za validacijo bioanaliznih metod (47). Vrednotenje metode smo začeli na vodnih vzorcih, kjer smo ovrednotili kalibracijsko krivuljo, točnost, ponovljivost in stabilnost. Pri plazemskih vzorcih pa smo ovrednotili selektivnost, kalibracijsko krivuljo, točnost, ponovljivost, spodnjo mejo določitve in stabilnost metode. Dodatno smo po navodilih Matuszewskega ovrednotili še učinkovitost metode, učinkovitost ekstrakcije in učinek matrice (49). Vrednotenje metode pri vodnih in plazemskih vzorcih smo izvedli na enak način, z enako pripravo vzorca in instrumentalno metodo. Validacijo smo izvajali tri dni in vse vzorce injicirali dvakrat. Pri vrednotenju smo upoštevali povprečno vrednost obeh injiciranj.

Selektivnost

Selektivnost smo pokazali z injiciranjem treh različni praznih plazemskih vzorcev (P-B1, P-B2, P-B3) in obogatenega plazemskega vzorca (V-QCph). Preverili smo, ali se pri P-B ob retencijskih časih naših analitov pojavijo kromatografski vrhovi in če pride do interference z endogenimi substancami. S V-QCph smo preverili kakšna je selektivnost med analiti.

Kalibracijska krivulja

Pri kalibracijski krivulji gre za korelacijo med odzivom in koncentracijo analita, ki je lahko linearna ali pa gre za kakšno drugo razmerje. Za preverjanje korelacije vodnih vzorcev smo uporabili 9 obogatenih vodnih vzorcev z naraščajočimi koncentracijami (V-UPv1 – V-UPv9 3.2.3.1. *Obogateni vodni vzorci za validacijo*). Korelacijo plazemskih vzorcev smo testirali na 9 obogatenih plazemskih vzorcih (V-UPv1 – V-UPv9 3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo*). Vzorce vseh koncentracij smo pripravili v dveh paralelkah. Iz dobljenih odzivov pri določenih koncentracijah analitov smo v programu Excel izrisali kalibracijske krivulje, ki so se najbolj prilagajale korelaciji naših analitov. Za vrednotenje kalibracijskih krivulj smo uporabili determinacijski koeficient (R^2) in za mejo postavili vrednost $R^2 \geq 0,99$.

Točnost

Točnost vodnih vzorcev smo vrednotili pri treh naraščajočih koncentracijah obogatenih vodnih vzorcev (V-QCv 3.2.3.1. *Obogateni vodni vzorci za validacijo*), točnost plazemskih vzorcev pa pri treh koncentracijah obogatenih plazemskih vzorcev (V-QCp 3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo*). V prvih dveh dneh smo točnost ugotavljali v petih paralelkah, tretji dan pa v treh. Točnost smo izračunali tako, da smo preračunali odziv v koncentracijo, z uporabo kalibracijske krivulje (C_i). Nato pa to vrednost delili z dejansko koncentracijo v vzorcu (C_d). V nadaljevanju je prikazana enačba za izračun točnosti.

$$\text{Točnost (\%)} = \left(\frac{C_i}{C_d} \right) * 100$$

(Enačba 1)

Kriterij za točnost vzorcev, glede na smernice FDA, je $100 \pm 15\%$. Za dnevno točnost smo izbrali povprečje vseh rezultatov enega dneva, za med dnevno točnost pa povprečje vseh treh dni.

Ponovljivost

Za vrednotenje ponovljivosti smo uporabili iste vzorce kot pri vrednotenju točnosti. Prva dva dni smo ponovljivost izvedli v petih paralelkah, tretji dan pa v treh. Vse vzorce smo injicirali dvakrat in nato za dnevno ponovljivost povprečili rezultate tistega dne, za med dnevno pa smo vzeli povprečje treh dni. Rezultat ponovljivosti smo podali kot relativni standardni odklon (RSD) in kot kriterij postavili $RSD < 15\%$, glede na priporočila smernic.

Spodnja meja določitve (LLOQ)

Spodnja meja določitve je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko še kvantitativno izmerimo. Za vrednotenje LLOQ smo pripravili 5 paralelk obogatene plazemskega vzorca (V-LLOQ 3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo*) in točnost ter ponovljivost vrednotili na enak način, kot je opisan zgoraj. Za LLOQ FDA smernice predpisujejo točnost $100\pm 20\%$ in ponovljivost RSD $< 20\%$.

Stabilnost delovne raztopine

Za vrednotenje stabilnosti delovne raztopine smo vzeli delovno raztopino za obogatitve vodnih vzorcev (QCvm 3.2.3.1. *Delovne raztopine za pripravo vodnih kontrolnih vzorcev*) in jo razdelili v dve viali. Prvo vialo smo 24 ur pustili na sobni temperaturi, drugo pa smo za 24 ur postavili v hladilnik s temperaturo $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Oba vzorca smo nato analizirali in primerjali, če je pri katerem izmed analitov prišlo do spremembe. Največje dovoljeno odstopanje po smernicah FDA je $\pm 15\%$.

Enako smo ponovili tudi z delovno raztopino za obogatitve plazemskih vzorcev (QCpm 3.2.3.1. *Delovne raztopine za pripravo plazemskih kontrolnih vzorcev*).

Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev

V procesu validacije smo vrednotili stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev (V-QCp 3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo*) pri vseh treh koncentracijah. Vzorce smo izpostavili različnim pogojem shranjevanja in nato njihov odziv primerjali z V-QCp-ji z enako koncentracijo, ki so bili analizirani tistega dne. Odstopanje med vzorci je izraženo v odstotkih in največje dovoljeno odstopanje je $\pm 15\%$.

a) Postoperativna stabilnost (AST)

Ekstrahirane vzorce smo po analizi pustili v avtomatskem vzorčevalniku LC-MS pri 10°C in jih po 24 urah še enkrat pomerili. Primerjali smo rezultate vzorcev, ki smo jih pomerili ob času 0 s tistimi, ki smo jih analizirali po 24 urah v vzorčevalniku.

b) Stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem (FT)

Obogatene plazemske vzorce smo dali v zamrzovalnik s temperaturo $- 80^{\circ}\text{C}$. Po 12 urah smo vzorce vzeli iz hladilnika, jih odtalili na sobni temperaturi in jih nato spet zamrznili pri $- 80^{\circ}\text{C}$. Cikel smo ponovili še dvakrat in nato odtaljene vzorce ekstrahirali in analizirali.

c) Stabilnost pri sobni temperaturi (BT)

Obogatene plazemske vzorce smo 24 ur pustili na sobni temperaturi in jih šele nato ekstrahirali in analizirali.

Učinkovitost metode

Učinkovitost metode smo preverili tako, da smo odziv obogatenega plazemskega vzorca pri treh koncentracijah (V-QCp 3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo*) primerjali z odzivom standarda z enako koncentracijo (3.2.3.1. *Standard za vrednotenje učinkovitosti metode*). Enačba 2 prikazuje način izračuna učinkovitosti metode, kot jo predpisuje Matuszewski (49) in ki smo jo podali v %. Smernice ne zahtevajo 100% učinkovitosti metode, vendar naj bi bili rezultati ponovljivi in točni.

$$\text{Učinkovitost metode (\%)} = \frac{\text{Odziv obogatenega plazemskega vzorca (C)}}{\text{Odziv standarda (A)}} * 100$$

(Enačba 2)

a) Učinkovitost ekstrakcije

Učinkovitost ekstrakcije smo vrednotili tako, da smo odzive ekstrahiranih obogatenih plazemskih vzorcev (V-QCp 3.2.3.1. *Obogateni plazemski vzorci za validacijo*) primerjali z odzivi ekstrahiranih vzorcev prazne plazme (P-B1), ki smo jih posušili in raztopili v standardu za vrednotenje učinkovitosti metode (3.2.3.1. *Standardi za vrednotenje učinkovitosti metode*). Vzorce smo pripravili za vse tri koncentracije standarda v dveh paralelkah. Enačba 3 prikazuje način izračuna učinkovitosti ekstrakcije, kot jo predpisuje Matuszewski (49) in ki smo jo podali v %.

$$\text{Učinek ekstrakcije (\%)} = \frac{\text{Odziv pred ekstrakcijo obogatenega plazemskega vzorca (C)}}{\text{Odziv plazemskega vzorca obogatenega po ekstrakciji (B)}} * 100$$

(Enačba 3)

b) Učinek matrice

Učinek matrice smo vrednotili tako, da smo odziv prazne plazme, ki smo jo po ekstrakciji posušili in ji dodali standard za vrednotenje učinkovitosti metode (3.2.3.1. *Standardi za vrednotenje učinkovitosti metode*), primerjali z odzivom istega standarda. Vzorce smo pripravili za vse tri koncentracije standarda v dveh paralelkah. Enačba 4 prikazuje način izračuna učinka matrice, kot ga predpisuje Matuszewski (49) in ki smo ga podali v %.

$$\text{Učinek matrice (\%)} = \frac{\text{Odziv plazemskega vzorca obogatenega po ekstrakciji (B)}}{\text{Odziv standarda (A)}} * 100 \text{ (Enačba 4)}$$

3.2.4. Analiza realnih plazemskih vzorcev

Po razvoju, optimizaciji in validaciji analizne metode smo preveriti ali je metoda uporabna pri analizi realnih vzorcev. Analizirali smo tri različne plazemske vzorce in vsako plazmo pripravili v dveh paralelkah. Vzeli smo 100 μL plazme in ji dodali 25 μL ACN, nato pa vzorce pripravili po metodi opisani v poglavju 3.2.3.2. in jih analizirali z instrumentalno metodo, ki je predstavljena v poglavju 3.2.2. Pri izračunu koncentracij iz dobljenih odzivov, smo upoštevali učinkovitost metode pri posameznem analitu. Koncentracijo 25 OH D3 smo izračunali, glede na umeritveno premico obogatenih plazemskih vzorcev pri validaciji. Koncentraciji vitamina A in E pa glede na umeritveni premici obogatenih vodnih vzorcev, saj zaradi visokih plazemskih koncentracij obogatenje plazme ni smiselno. Pri validaciji metode nismo dosegli dovolj visokih koncentracij, da bi umeritvena premica vitamina E pokrila tudi koncentracije v realnih plazemskih vzorcih, zato smo morali pripraviti dodatno umeritveno premico za vitamin E, ki je obsegala koncentracije od 100 $\mu\text{g/L}$ do 12000 $\mu\text{g/L}$.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA

Namen optimizacije postopka je bil, da s spreminjanjem posameznih parametrov, poskušamo najti postopek, ki bo čim hitrejši, čim bolj učinkovit in čim bolj enostaven za sočasno ekstrakcijo različnih vitaminov. Vrednotili smo metabolit 25-OH D3 ter vitamine A, D2, D3, E in K1. Kot vitamin A smo vrednotili retinol in kot vitamin E α -tokoferol, saj sta to predstavnika vitaminov, ki ju je v krvi največ (2, 8). V magistrski nalogi smo za te dve spojini uporabljali izraza vitamin A in E.

Postopek optimizacije smo začeli na vodnih vzorcih, saj imata plazma in voda primerljive porazdelitvene lastnosti. Poleg tega pri vodnih vzorcih ni učinka matrice, ki bi lahko motil optimizacijo, zaradi lažno višjih ali nižjih odzivov na LC-MS/MS. Optimiziran postopek priprave vodnih vzorcev smo nato prenesli na plazemske vzorce, kjer smo naredili še nekaj izboljšav. Za boljši pregled smo pri vrednotenju vsakega parametra rezultate podali relativno glede na najboljši izkoristek ekstrakcije.

4.1.1. Vodni vzorci

Optimizacijo priprave vzorca smo začeli na obogatenih vodnih vzorcih (3.2.1.1. *Obogateni vodni vzorci (OVVr)*) po metodi opisani v 3.2.1.2. *Vodni vzorci*. Za vsak parameter, ki smo ga spreminjali, smo pripravili tri obogatene vzorce, katerih odzive smo nato povprečili. Povprečne rezultate smo primerjali z odzivom standarda (3.2.1.1 *Standard za vrednotenje priprave vzorca*), ki je imel enako koncentracijo vitaminov, kot je bila v končnem ekstrahiranem vodnem vzorcu.

4.1.1.1. Ekstrakcija tekoče-tekoče

Za LLE smo se odločili, saj je bila ta metoda, v kombinaciji z obarjanjem proteinov najbolj pogosto uporabljena v literaturi predstavljeni v preglednici I. Gre za precej enostaven postopek, ki omogoča veliko prilagajanja analitom z uporabo različnih topil. Pri razvoju postopka smo izhajali iz metode, ki so jo uporabili Konieczna et al. (38). Optimizacijo smo začeli z izboljšavo LLE. Najprej smo preizkusili, kako različna ekstrakcijska topila vplivajo na uspešnost ekstrakcije. Organsko topilo, izbrano za LLE, mora biti slabo topno v vodi, mora biti selektivno za snovi, ki jih ekstrahiramo, mora imeti ustrezen porazdelitveni koeficient za izbrane analite in mora imeti čim nižje vrelišče, da ga s sušenjem čim lažje odstranimo. Glede na izbrane analite, smo se odločili za poskus ekstrakcije s topili etilacetat,

acetona, heksana, dietileter in diklorometan. V prvem poskusu smo uporabili čista topila in najboljše izkoristke ekstrakcije dobili z uporabo EA. V drugem preizkusu smo preverili učinkovitost mešanic EA z ostalimi topili v razmerju 1:1. Iz preglednice XVIII je razvidno, da so bili izkoristki ekstrakcije z uporabo mešanic DCM, DEE in HEX z EA primerljivi, vendar še vedno nižji kot pri čistem EA. Z uporabo acetona smo dobili slabše rezultate, poleg tega pa se aceton meša z vodo, kar oteži njegovo uporabo. V že poznanih metodah za vrednotenje lipofilnih vitaminov so najpogosteje, kot ekstrakcijsko topilo, uporabljali 100% heksan (35, 37, 38, 40, 41), ki pa v našem poskusu ni dal najboljših rezultatov.

Preglednica XVIII: Relativni izkoristki (%) analitov pri uporabi različnih ekstrakcijskih topil.

Topilo	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
100% EA	100	100	99	100	97
100% Aceton	83	97	88	25	90
100% HEX	82	14	86	18	7
100% DEE	76	61	60	57	41
100% DCM	50	34	36	25	20
DCM:EA (50:50)	78	95	87	73	100
DEE:EA (50:50)	78	91	82	32	75
HEX:EA (50:50)	70	24	100	20	32
ACN:EA (50:50)	46	82	73	31	87

Posledično smo se odločili, da poskusimo še z manjšimi deleži DCM, DEE in HEX v EA. Iz preglednice XIX je razvidno, da najboljše izkoristke dobimo z uporabo 20% DEE v EA. Želeli smo še preveriti kako bodo različna razmerja DEE in EA vplivala na ekstrakcijo, zato smo pripravili ekstrakcijska topila z 5, 10, 20 in 40 % DEE v EA in jih primerjali s 100% EA.

Preglednica XIX: Relativni izkoristki (%) analitov pri uporabi različnih kombinacij ekstrakcijskih topil.

Topilo	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
HEX:EA (10:90)	97	90	70	77	80	72
HEX:EA (20:80)	88	100	39	54	59	59
DEE:EA (10:90)	84	80	50	53	48	58
DEE:EA (20:80)	100	82	100	100	100	100
DCM:EA (10:90)	100	79	49	51	55	63
DCM:EA (20:80)	97	77	42	53	55	56
100% EA	100	100	100	99	100	100
DEE:EA (5:95)	76	89	60	100	75	71
DEE:EA (10:90)	75	87	58	90	64	60
DEE:EA (20:80)	83	85	68	89	77	71
DEE:EA (40:60)	77	88	63	93	62	69

Ugotovili smo, da je še vedno najbolj optimalna uporaba čistega EA, zato smo v nadaljevanju kot ekstrakcijsko topilo uporabljali 100% EA. V naslednjem koraku smo na vodnih vzorcih ugotavljali, kako razmerje med plazmo in topilom vpliva na ekstrakcijo.

Preglednica XX: Relativni izkoristki (%) analitov ob uporabi različnih razmerij med plazmo in topilom.

Razmerje: plazma: topilo	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
1:1,5	64	53	69	53	52	59
1:2,5	89	79	100	73	73	81
1:3,5	82	74	85	69	77	73
1:5	84	84	92	82	89	74
1:6	91	98	85	88	100	85
1:7	100	100	88	100	99	100

Iz preglednice XX je razvidno, da najboljše izkoristke dobimo, ko uporabimo čim večjo količino ekstrakcijskega topila, kar je pričakovano, saj to pomeni, da analit tekom ekstrakcije lažje prehaja v raztopino s čim nižjo koncentracijo. Dodatno smo preverili ali je količina plazme in topila mogoče zmanjšati, kar zmanjša stroške metode, poleg tega pa je manj invazivna za pacienta, kar je še posebej pomembno pri otrocih. Razmerje med obogatenim vodnim vzorcem in topilom je ostalo enako, le da smo ekstrakcijo namesto na 200 μ L vode izvajali na 150 ali 100 μ L vode.

Preglednica XXI: Relativni izkoristki (%) analitov pri zmanjšanih količinah plazme in topila.

Količina plazme	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
200 μ L	85	100	79	91	72	72
150 μ L	82	85	83	89	83	82
100 μ L	100	100	100	100	100	100

Iz preglednice XXI je razvidno, da so izkoristki ob uporabi 100 μ L vzorca najboljši, zato smo v nadaljevanju priprave vzorca uporabljali te volumen vode oziroma plazme. Vzorce smo ekstrahirali z mešanjem na Vibromix mešalniku in nato še z uporabo UZ kadičke, ki še dodatno premeša vzorec. Zanimalo nas je, kako dolgo je potrebno mešati vzorec na Vibromix mešalniku, da vitamini preidejo iz vodne v organsko fazo in ali je uporaba UZ potrebna.

Preglednica XXII: Relativni izkoristki (%) analitov pri različnih časih ekstrahiranja.

	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
5 min Vibromix mešalnik z UZ	98	100	100	100	100
1 min Vibromix mešalnik z UZ	100	97	91	99	75
5 min Vibromix mešalnik brez UZ	73	91	86	58	91

Iz preglednice XXII je razvidno, da čas mešanja bistveno ne spremeni učinkovitosti ekstrakcije, a krajši čas ekstrahiranja močno skrajša čas priprave vzorca in olajša pripravo vzorca, še posebej kadar imamo veliko število vzorcev. Po drugi strani pa je uporaba UZ potrebna, saj je izkoristek ekstrakcije ob uporabi UZ precej višji. Zato smo v nadaljevanju vzorec na Vibromix mešalniku mešali 1 minuto in ga nato dali še na UZ kadičko za 10 minut

V literaturi (preglednica I) je bilo pogosto opisano, da so ekstrakcijo večkrat ponovili, zato smo se odločili za primerjavo enkratne, dvakratne in trikratne ekstrakcije. Večkratno ekstrakcijo smo izvedli tako, da smo po ekstrakciji odvzeli organsko fazo, vodni fazi dodali enako količino ekstrakcijskega topila, ponovili ekstrakcijo in nato spet odvzeli organsko fazo. Na koncu smo organske faze združili, jih posušili in raztopili po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.2 *Priprava vzorcev*.

Preglednica XXIII: Relativni izkoristki (%) analitov pri uporabi večkratne ekstrakcije.

	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
Enkratna ekstrakcija	100	89	100	92	73	96
Dvakratna ekstrakcija	98	100	82	100	100	100
Trikratna ekstrakcija	84	86	84	97	100	88

Iz rezultatov (preglednica XXIII) je opazno, da večkratna ekstrakcija nima velikega vpliva na izkoristek, saj so rezultati primerljivi. Poleg tega pa večkratna ekstrakcija manj ponovljiva in močno podaljša ter oteži ekstrakcijski postopek, zato smo se odločili za enkratno ekstrakcijo.

4.1.1.2. Sušenje

Po ekstrakciji smo vzorec posušili, da smo odstranili organsko topilo, ki je moteče za LC-MS. Vzorec smo sušili s prepihanjem N₂ pri povišani temperaturi. Pri tem poskusu smo vzorce sušili pri temperaturah 35, 40, 45 in 50 °C in jih nato raztopili v ACN.

Preglednica XXIV: Relativni rezultati (%) analitov pri različnih temperaturah sušenja.

Temperatura	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
35°C	100	100	100	100	100	100
40°C	97	94	91	92	78	84
45°C	93	86	87	90	80	77
50°C	95	85	83	88	75	78

Iz rezultatov (preglednica XXIV) je razvidno, da je najbolj optimalna temperatura za sušenje vitaminov 35°C, vendar so razlike izkoristkov pri višjih temperaturah majhne, torej lahko sklepamo, da so vitamini tudi pri teh temperaturah primerljivo stabilni in gre le za razlike zaradi eksperimentalne napake. V nadaljevanju smo vzorce vseeno sušili pri 35°C.

4.1.1.3. Raztapljanje suhega ostanka

Pomemben parameter priprave vzorca je tudi topilo, ki ga uporabimo za raztapljanje suhega ostanka po sušenju. Preverjali smo topili ACN in MeOH in mešanice teh dveh topil v različnih razmerjih. Iz preglednice XXV je razvidno, da je najprimernejše topilo za raztapljanje ACN. Preizkusili smo tudi čas mešanja na Vibromix mešalu pri raztapljanju in ugotovili, da le ta nima bistvenega vpliva na rezultat, je pa časovno bolj učinkovito, še posebej pri večji količini vzorcev, da je ta čas čim krajši. Odločili smo se za 30 s mešanja vzorca s topilom ACN. Pomemben parameter je tudi količina topila za raztapljanje, saj je od tega odvisna končna koncentracija vzorca, ki ga injiciramo v LC-MS/MS. Ugotovili smo, da se pri manjši količini topila suh ostanek ne raztopi povsem, zato je potrebno uporabiti 200 µL ACN.

Preglednica XXV: Relativni rezultati (%) analitov pri različnih načinih raztapljanja suhega ostanka.

Topilo	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
100% ACN	100	100	100	100	100	100
100% MeOH	85	91	88	78	84	88
ACN:MeOH (50:50)	94	92	86	71	85	85
ACN: MeOH (25:75)	91	95	90	72	81	79
ACN:MeOH (75:25)	92	89	86	74	80	82
Čas mešanja						
30 s	99	100	96	100	98	86
60 s	100	100	100	99	100	84
90 s	100	100	94	98	99	100
Količina topila						
200 µL	100	100	100	100	100	100
150 µL	91	93	79	82	87	87
100 µL	82	88	67	71	76	83

4.1.2. Plazemski vzorci

Po optimizaciji parametrov na vodnih vzorcih smo postopek prenesli na plazemske vzorce, na katerih smo naredili še nekaj preizkusov, da bi čim bolj izboljšali postopek priprave vzorca. Odločili smo se, da bomo pred LLE izvedli še obarjanje proteinov, ki se je pogosto uporablja tudi v literaturi. V plazmo je potrebno dodati deproteinizacijsko topilo, ki povzroči obarjanje proteinov v plazmi in omogoči ekstrakcijo vitaminov iz plazme. Naredili smo primerjavo izkoristkov ekstrakcij pri uporabi deproteinizacijskih topil ACN ali MeOH in brez predhodnega obarjanja proteinov.

Preglednica XXVI: Relativni izkoristki (%) analitov pri uporabi različnih deproteinizacijskih topil.

Topilo	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
ACN	100	100	100	100	92	42
MeOH	95	94	88	74	100	100
Brez PP	34	41	24	48	25	20

Iz rezultatov (preglednica XXVI) je razvidno, da so bili izkoristki, ko obarjanja proteinov nismo izvedli, precej slabši, saj je mogoče da so nekateri analiti ostali vezani na transportne proteine v plazmi. Kot boljše deproteinizacijsko topilo se je izkazal ACN, ki je imel pri večini analitov boljše izkoristke ekstrakcije kot MeOH.

Želeli smo tudi preveriti ali je sploh potrebno, da izvedemo ekstrakcijo z EA ali je dovolj, če plazemski vzorec samo oborimo in nato supernatant posušimo, raztopimo in na koncu injiciramo v LC-MS/MS. Iz poskusa je razvidno, da so bili rezultati precej boljši ob izvedbi ekstrakcije. Zanimalo nas je ali se bo rezultat kaj izboljšal, če pred ekstrakcijo vzorec centrifugiramo in nato ekstrahiramo samo supernatant. Iz preglednice XXVII je razvidno, da so odzivi celo nekoliko višji, ko oborine ne odstranimo, saj verjetno zaradi prenosa pride do izgub.

Preglednica XXVII: Relativni izkoristki (%) analitov pri različnih načinih obarjanja proteinov.

Postopek po obarjanju	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
Brez LLE	76	56	86	82	80	72
LLE z oborino	100	86	100	100	100	89
LLE brez oborine	92	100	59	69	90	100

Absolutni ekstrakcijski izkoristki so bili kljub optimizacijam še vedno nizki, zato smo preizkusili še nekaj načinov ekstrakcije, ki bi lahko izboljšali učinkovitost metode (preglednica XXVIII). Postopki so podrobneje opisani v poglavju 3.2.1.3. *Plazemski vzorci*.

Preglednica XXVIII: Relativni izkoristki (%) vitaminov pri uporabi prilagojenih priprav vzorca.

Postopek	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
1. postopek	93	90	100	100	88	100
2. postopek	26	72	33	38	100	24
3. postopek	57	79	50	76	89	35
4. postopek	100	100	82	76	29	64
5. postopek	59	75	70	96	41	84
6. postopek	77	100	42	49	20	20
7. postopek	54	71	54	84	8	11

Pri postopkih, kjer smo plazmi pred dodatkom standarda najprej dodali deproteinizacijsko (2. postopek) ali ekstrakcijsko topilo (3. postopek), smo dobili slabše rezultate, kot po našem običajnem vrstnem redu (1. postopek). Preizkusili smo tudi, ali se bo učinkovitost metode izboljšala, če po dodatku ACN vzorec nekaj časa pustimo, da se proteini oborijo in ga šele nato ekstrahiramo. Pri 4. postopku smo ga eno uro pustili na sobni temperaturi, pri 5. eno uro v hladilniku in pri 6. pa čez noč v hladilniku. Pri nekaterih vitaminih so rezultati boljši, vendar so razlike majhne, poleg tega pa nam to dodatno podaljša pripravo vzorca, zato dodatek tega koraka ni smiseln. V 7. postopku smo v vzorec dodali še NaOH, ki ne izboljša ekstrakcijskega postopka, temveč so rezultati še slabši kot pri običajnem postopku. Glede na rezultate smo se odločili, da v postopek priprave vzorca ne vpeljujemo dodatnih sprememb. Optimizirana priprava vzorca je opisana v poglavju 3.2.3.2. *Priprava vzorca*.

4.2. VALIDACIJA

Validacija je zadnji del razvoja metode, s katerim potrdimo, da metoda daje točne in ponovljive rezultate. Enako kot razvoj in optimizacijo priprave vzorca smo tudi validacijo najprej naredili na vodnih vzorcih. Plazemski vzorci so vsebovali visoko koncentracijo vitaminov A in E, zato smo analizo metodo za kvantifikacijo teh dveh vitaminov ovrednotili samo na vodnih vzorcih. S tem smo na vodnih vzorcih potrdili, da je metoda točna in ponovljiva za vitamina A in E. Validacijo metode za ostale vitamine pa smo izvedli tudi na plazemskih vzorcih (plazma št. 4), ki niso vsebovali metabolita 25-OH D3 in vitaminov D2, D3 ter K1. Na plazemskih vzorcih smo izvedli celotno validacijo, kot jo priporočajo smernice FDA (47), vključili pa smo tudi izračun učinka ekstrakcije in učinka matrice po priporočilih Matuszewskega (49).

4.2.1. Vodni vzorci

Pri validaciji vodnih vzorcev smo ovrednotili kalibracijsko krivuljo, točnost, ponovljivost in stabilnost delovne raztopine in preverili ali je potrebno pred validacijo plazemskih vzorcev uvesti še kakšne spremembe.

4.2.1.1. Kalibracijska krivulja

Kalibracijska krivulja je razmerje med odzivom in koncentracijo vzorca v širšem koncentracijskem območju. Razmerje med koncentracijo analita in odzivom je lahko premo sorazmerno ali pa gre za kakšno drugo obliko. Pri 25-OH D3, vitaminih A, E in K1 je bilo razmerje linearno, pri vitaminih D2 in D3 pa gre za polinomsko funkcijo drugega reda. Iz preglednice XXIX je razvidno, da so kalibracijske krivulje ustrezne in so vsi determinacijski koeficienti višji od predpisanega kriterija $R^2 > 0,99$. V primerjavi z literaturo predstavljeno v preglednici I je izbrano koncentracijsko območje za vitamin A primerljivo. Pri vitaminu E pa smo uporabili precej nižje območje, ker je dajal zelo visoke odzive in smo želeli vrednotiti analite pri koncentracijah s primerljivimi odzivi. Med analizo realnih plazemskih vzorcev smo narediti novo kalibracijsko krivuljo za vitamin E, ki je vključevala višje koncentracije (od 100 µg/L do 12000 µg/L). Umeritvena premica za višje koncentracije vitamina E je predstavljena v preglednici XXIX.

Preglednica XXIX: Podatki kalibracijskih krivulj za vitamine.

Linearna funkcija $y = kx + n$					
Analit	Območje (µg/L)	Naklon (k)	Odsek (n)	R ²	
25-OH D3	2-1000	1957,1	7722,1	0,9989	
Vitamin A	10-5000	548,97	7757,0	0,9982	
Vitamin E	1-500	2337,8	2266,4	0,9997	
Vitamin E -visoka	100-12000	2959,1	1000000	0,9963	
Vitamin K1	10-5000	248,15	3076,6	0,9983	
Polinomska funkcija drugega reda $y = ax^2 + bx + c$					
Analit	Območje (µg/L)	a	b	C	R ²
Vitamin D2	10-5000	-0,0468	354,74	5595	0,9989
Vitamin D3	10-5000	-0,0280	241,95	12515	0,9983

4.2.1.2. Točnost

S točnostjo preverjamo, kako blizu je povprečje izračunanih rezultatov z dejansko koncentracijo preiskovanih analitov v vzorcu. Točnost smo preverili po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.3. *Vrednotenje metode; točnost*. Iz preglednice XXX je razvidno, da

rezultati ustrezajo predpisanim kriterijem $100 \pm 15\%$. Pri med-dnevni točnosti so v večini rezultati slabši, kot pri dnevni.

Preglednica XXX: Točnost analitov vodnih vzorcev pri treh različnih koncentracijah.

TOČNOST (%)							
Vzorec		25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
V-QCvl	D	114,6	107,3	88,6	99,1	96,5	107,5
	M	112,7	106,2	86,0	97,2	94,1	114,5
V-QCvm	D	94,0	88,3	100,8	85,7	91,8	87,2
	M	85,8	88,1	103,1	85,0	87,2	87,7
V-QCvh	D	91,5	94,8	112,3	97,7	97,3	93,7
	M	89,8	90,9	112,7	98,2	86,8	97,8

*D: Dnevna, M: Med-dnevna

4.2.1.3. Ponovljivost

S ponovljivostjo preverjamo, kako podobni so si rezultati serije analiz istega biološkega vzorca in določimo natančnost analize. Ponovljivost je podana kot standardni odklon (SD) ali kot relativni standardni odklon (RSD). Preverili smo ponovljivost rezultatov v enem dnevu in pa med-dnevno ponovljivost. Kriterij ponovljivosti po FDA smernicah za validacijo bioanaliznih metode je $RSD < 15\%$. Vsi rezultati iz preglednice XXXI ustrezajo predpisanim kriterijem, razen pri vitaminu K1, kjer je med-dnevna ponovljivost neustrezna, kar je verjetno posledica nestabilnosti vitamina. Ta parameter smo v naslednjem poglavju tudi preverili.

Preglednica XXXI: Ponovljivost analitov vodnih vzorcev pri treh različnih koncentracijah.

PONOVLJIVOST (%)							
Vzorec	Dan	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
V-QCvl	D	4,8	1,3	5,9	7,0	11,8	10,7
	M	0,1	9,9	5,6	9,0	4,9	28,6
V-QCvm	D	3,1	4,7	3,9	2,8	10,8	3,4
	M	11,2	5,9	2,1	1,0	14,8	36,5
V-QCvh	D	1,5	3,0	0,2	0,4	1,6	6,6
	M	3,6	6,2	2,1	1,5	14,4	27,7

*D: Dnevna, M: Med-dnevna

4.2.1.4. Stabilnost

Eden izmed parametrov validacije metode je tudi stabilnost. Stabilnost preverimo na različnih stopnjah postopka in pri različnih pogojih shranjevanja. Pri vodnih vzocih smo preverili stabilnost delovne raztopine za obogatitve vodnih vzorcev (QCvm). Iz preglednice XXXII je razvidno, da so metabolit 25-OH D3, vitamini D2 in D3 po 24 urah na sobni

temperaturi stabilni, saj se odzivi, v primerjavi s standardom shranjenim v hladilniku, ne spremnijo. Odziv vitamina A se nekoliko zmanjša, kar je pričakovano, saj je vitamin A termolabilen, fotolabilen in nestabilen ob prisotnosti oksidantov (3). Drugi, še bolj nestabilen analit je vitamin K1, kateremu se v kombinaciji z ostalimi vitamini po 24 urah na sobni temperaturi vsebnost za približno 5-krat zmanjšala. V literaturi smo zasledili, da je vitamin K1 stabilen pri različnih temperaturnih pogojih (48), kar pomeni, da na njegovo nestabilnost verjetno vpliva kombinacija z ostalimi vitamini v standardu.

Preglednica XXXII: Stabilnost delovne raztopine za obogatitve vodnih vzorcev po 24 urah na sobni temperaturi.

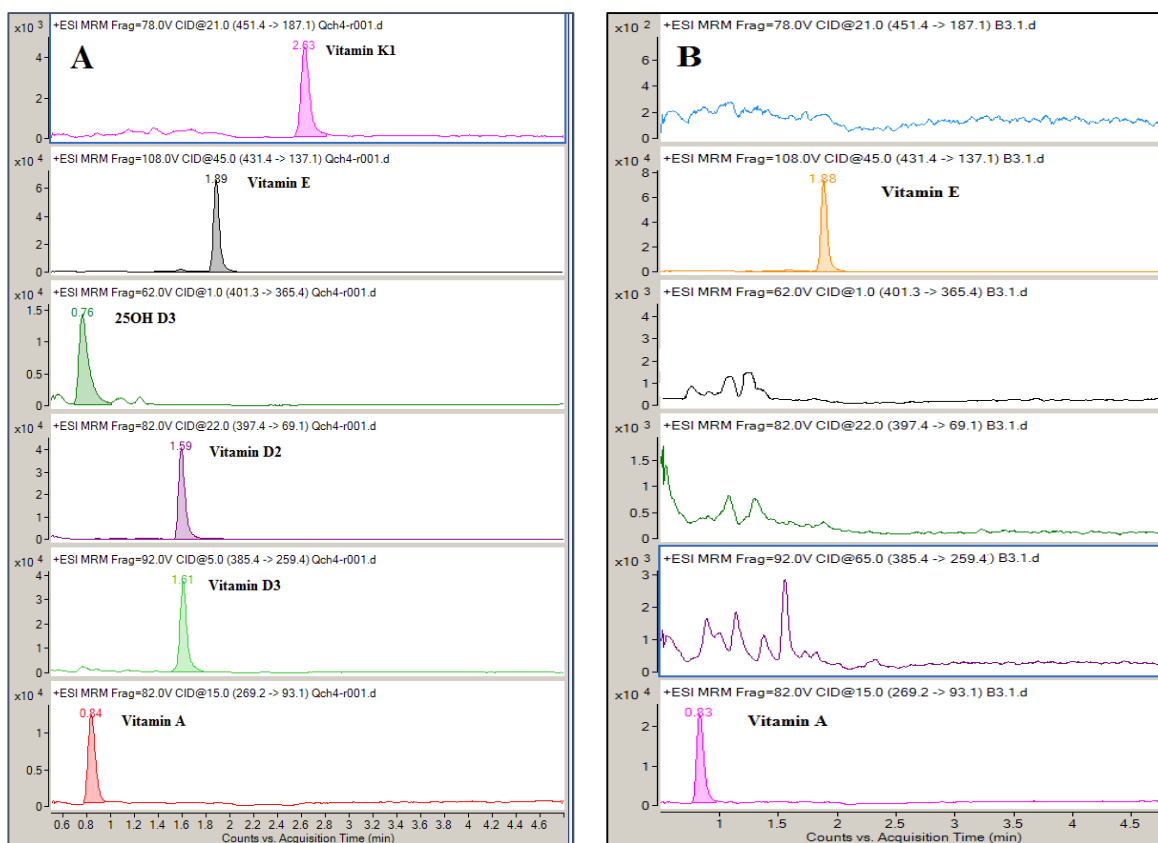
STABILNOST (%)						
	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin E	Vitamin K1
QCvm	100,4	90,2	108,1	108,1	103,7	19,6

4.2.2. Plazemski vzorci

Validacijo plazemskih vzorcev smo izvedli po priporočilih smernic FDA za validacijo bioanaliznih metod (47). Vrednotili smo vse parametre, ki jih priporočajo smernice za validacijo nove analizne metode, razen dolgoročne stabilnosti. Poleg tega pa smo določili tudi učinkovitost metode, učinkovitost ekstrakcije in učinek matrice po priporočilih Matuzewskega (49).

4.2.2.1 Selektivnost

Selektivnost je lastnost analizne metode, da loči preiskovani analit od drugih snovi prisotnih v vzorcu, kot so endogeni elementi in od ostalih preiskovanih analitov. Pri LC-MS metodi se analiti med seboj ločijo glede na kromatografsko ločbo in glede na MRM prehode. Slika 6A prikazuje obogatene plazemske vzorce (OPV_v), slika 6B pa prazen plazemski vzorec št. 4 (P-B1). Iz slike vidimo, da je metoda selektivna, saj pri retencijskih časih analitov pri praznem plazemskem vzorcu ni kromatografskega vrha, razen pri vitaminih A in E, ki sta prisotna v tem plazemskem vzorcu. Njihovo istovetnost potrjuje tudi konstantno razmerje odzivov med kvantitativnim in kvalitativnim MRM prehodom posameznega analita tako pri obogatenem vodnem kot tudi plazemskem vzorcu, s čimer dodatno potrjujemo selektivnost metode glede na ostale endogene komponente. Poleg tega so kromatografski vrhovi ozki in dobro ločeni drug od drugega.



Slika 6: A: Slika prikazuje kromatogram obogatenega plazemskega vzorca (V-QCph); B: Slika prikazuje kromatogram praznega plazemskega vzorca (P-B1), prikazani so samo kvantitativni MRM prehodi analitov.

4.2.2.2. Kalibracijska krivulja

Kalibracijsko krivuljo smo vrednotili pri devetih različnih koncentracijah analita. Za vsak analit smo območje preverjanja linearnosti določili glede na odzive na LC-MS in glede na pričakovane koncentracije vitaminov v plazmi. Ugotovili smo, da pri vitaminu D3 in vitaminu D2 odziv ni premo sorazmeren od koncentracije analita, temveč gre za polinomsko funkcijo drugega reda.

Preglednica XXXIII: Podatki kalibracijskih krivulj vitaminov v plazemskih vzorcih.

Linearna funkcija $y = kx + n$					
Analit	Območje (µg/L)	Naklon (k)	Odsek (n)	R ²	
25-OH D3	2-1000	460,18	-954,52	0,9913	
Vitamin K1	10-5000	17,168	1,323	0,9943	
Polinomska funkcija drugega reda $y = ax^2 + bx + c$					
Analit	Območje (µg/L)	A	B	C	R ²
Vitamin D2	10-5000	- 0,0058	123,38	32,141	0,9963
Vitamin D3	10-5000	- 0,0043	91,516	1339,7	0,9963

Kot je razvidno iz preglednice XXXIII, je bila kalibracijska krivulja v celotnem območju in za vse analite ustrezna, saj so determinacijski koeficienti R^2 povsod višji od postavljenega kriterija $R^2 > 0,99$. V primerjavi z literaturo predstavljeno v preglednici I so območja validacije za metabolit 25-OH D3 primerljiva, v nekaterih primerih je naše območje nekoliko širše. Za vitamina D2 in D3 so območja podobna, pri vitaminu K1 pa so v literaturi območja metode pri nižjih vrednostih (npr. 0,15-15 $\mu\text{g/L}$).

4.2.2.3. Točnost

Iz preglednice XXXIV je razvidno, da so rezultati točnosti slabši pri analitu 25-OH D3. Ostali rezultati so znotraj območja od 85-108% in so znotraj predpisanega kriterija $100 \pm 15\%$. Rezultati znotraj enega dneva in povprečja več dni so primerljivi, razlika je posledica eksperimentalne napake. V primerjavi z rezultati točnosti vodnih vzorcev so rezultati primerljivi, razen rezultati metabolita 25-OH D3 ki odstopajo. Netočnost analize za 25-OH D3 je lahko posledica učinka matrice, ki smo ga kasneje tudi dokazali, saj pri vodnih vzorcih te težave ni bilo. Iz tega lahko sklepamo, da je metoda za vitamine D2, D3 in K1 točna, pri metabolitu 25-OH D3 pa so še potrebne izboljšave.

Preglednica XXXIV: Točnost analitov v plazemskih vzorcih pri treh različnih koncentracijah.

TOČNOST (%)					
Vzorec		25 OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
V-QCpl	D	77,0	92,2	86,7	100,7
	M	72,1	85,3	86,4	97,3
V-QCpm	D	85,6	107,0	101,7	107,6
	M	69,3	92,4	95,8	90,6
V-QCph	D	64,1	87,6	88,3	101,8
	M	62,2	86,9	85,6	90,4

*D: Dnevna, M: Med-dnevna

4.2.2.4. Ponovljivost

Iz rezultatov (preglednica XXXV) je razvidno, da je metoda ponovljiva, saj so vsi rezultati znotraj postavljene meje sprejemljivosti, ki je $RSD < 15\%$. Odzivi so ponovljivi tako znotraj enega dneva kot tudi med-dnevno, so pa RSD-ji pri med-dnevni ponovljivosti nekoliko višji. V primerjavi z ponovljivostjo pri vodnih vzorcih so RSD-ji pri plazemskih vzorcih nekoliko večji, kar je lahko posledica večje kompleksnosti plazme in drugih komponent plazme, ki ostanejo v vzorcu in lahko vplivajo na analizo metodo.

Preglednica XXXV: Ponovljivost analitov v plazemskih vzorcih pri treh različnih koncentracijah.

PONOVLJIVOST (%)					
Vzorec		25-OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
V-QCpl	D	6,6	14,2	14,3	8,0
	M	13,4	7,0	4,5	12,7
V-QCpm	D	14,2	10,7	9,8	12,5
	M	12,7	11,0	9,7	14,6
V-QCph	D	9,7	10,2	9,7	8,5
	M	14,3	3,8	7,7	14,7

4.2.2.5. Spodnja meja določitve (LLOQ)

LLOQ je najnižja koncentracija analita, ki ga lahko kvantitativno izmerimo v biološkem vzorcu. Po smernicah FDA za validacijo bioanaliznih metod mora LLOQ ustrezati pogoju točnosti (80 – 120%) in pogoju ponovljivosti (RSD <20%). LLOQ se razlikuje med analiti, saj so bili pri nekaterih analitih pri istih koncentracijah odzivi višji kot pri drugih.

Preglednica XXXVI: Točnost in ponovljivost analitov v plazemskih vzorcih pri LLOQ (n=6).

	25-OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
V-LLOQ (µg/L)	8,0	20,0	20,0	40,0
Točnost (%)	98,1	113,3	83,7	111,4
RSD (%)	13,5	3,6	6,6	13,5

Iz preglednice XXXVI je razvidno, da LLOQ ustreza pogoju točnosti in ponovljivosti, saj vsi rezultati ustrezajo predpisanim pogojem. V primerjavi z že poznanimi analiznimi metodami za vrednotenje lipofilnih vitaminov, so LLOQ-ji naše metode nekoliko višji. Primerljiv je LLOQ metabolita 25-OH D3, saj naj bi bil po smernicah nižji od 10 µg/L (34). LLOQ vrednosti vitaminov D2 in D3 so okoli 10 µg/L, vitamina K1 pa pod 1 µg/L, saj so to njihove pričakovane koncentracije v krvi. Z našo analizno metodo vitaminov D2, D3 in K1 najverjetneje kvantitativno ne bi mogli ovrednotiti v realnih plazemskih vzorcih, saj nismo dosegli dovolj nizkih LLOQ-jev. Smo pa v nadaljevanju validacije ugotovili, da je pri analizni metodi prisoten učinek matrice, ki močno zmanjša odzive in v primeru, da učinka matrice odstranimo, so lahko LLOQ tudi petkrat nižji, kar pa že predstavlja območje koncentracij vitaminov v realnih vzorcih.

4.2.2.6. Stabilnost

Stabilnost analita je odvisna od kemičnih lastnosti spojine, pogojev pod kakšnimi jo shranjujemo, matrice v kateri se nahaja in vsebnika. Za preverjanje stabilnosti analizne metode, smo uporabili vse tri koncentracije obogatenih plazemskih vzorcev V-QCp, ki smo

jih izpostavili različnim pogojem shranjevanja. Vse stabilne vzorce smo na koncu primerjali z rezultati QC-jev istega dne. Preverili smo tudi stabilnost ekstrahiranih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku in stabilnost delovnih raztopin za bogatenje plazemskih vzorcev.

Preglednica XXXVII: Rezultati različnih stabilnosti analitov v plazemskih vzorcih.

STABILNOST (%)					
Vzorec	Stabilnost	25-OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
QCpl	AST	93,7	106,2	133,8	124,3
	FT	54,7	103,2	97,5	97,8
	BT	111,2	98,8	92,8	87,3
QCpm	AST	116,4	125,5	123,4	170,9
	FT	84,1	93,4	86,9	99,0
	BT	76,0	97,4	94,3	86,2
	SS	103,1	74,4	74,5	33,4
QCph	AST	118,3	120,0	119,0	156,9
	FT	78,9	87,1	81,8	91,1
	BT	73,5	91,1	91,7	99,8

*AST: postoperativna stabilnost, FT: stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem, BT: stabilnost pri sobni temperaturi, SS: stabilnost delovne raztopine

Iz rezultatov (preglednica XXXVII) je razvidno, da je pri shranjevanju vzorca v avtomatskem vzorčevalniku, koncentracija vseh analitov pri vseh QCjih narastla, kar je lahko posledica hlapnosti ACN, v katerem smo na koncu postopka raztopili vzorec. Viala v vzorčevalniku ima po koncu analize preluknjani pokrovček, torej skozi luknjo izhlapeva ACN in se posledično poveča koncentracija analita v vzorcu. Iz tega lahko sklepamo, da ponovna analiza po 24 urah shranjevanja v vzorčevalniku pri 10 °C ni ustrezna. To težavo bi lahko rešili z uporabo internega standarda, saj bi spremembo koncentracij analitov korigirali z internim standardom.

Pri postopku večkratnega zamrzovanja in odtajevanja obogatenih plazemskih vzorcev so analiti stabilni, saj so rezultati znotraj dovoljenega odstopanja 15%. Večje odstopanje je le pri analitu 25-OH D3, pri katerem smo imeli težave že pri vrednotenju ponovljivosti in točnosti, kar pomeni da je pri tem analitu slabša natančnost rezultatov in da problem verjetno ni v stabilnosti analita, temveč v sami analizni metodi. Podobne rezultate smo dobili tudi pri testiranju »bench top« stabilnosti (BT), kar pomeni da lahko obogateni plazemski vzorec pustimo 24 ur na sobni temperaturi, ne da bi pri tem prišlo do večjih sprememb.

Preverili smo tudi stabilnost delovne raztopine standarda za obogatenje plazemskih vzorcev (QCpm) in ugotovili, da koncentracija vseh analitov pri shranjevanju na sobni temperaturi upada. Še posebej se koncentracija zniža pri vitaminu K1, ki v kombinaciji z ostalimi

vitamini v standardu pri sobni temperaturi razpada, kar smo opazili že pri delovni raztopini za obogatitve vodnih vzorcev. Iz tega lahko sklepamo, da moramo raztopino standarda shranjevati v hladilniku, kar smo tudi upoštevali pri našem delu.

4.2.2.7. Učinkovitost metode

Na celokupno učinkovitost metode vpliva tako učinkovitost priprave vzorca (npr. učinkovitost ekstrakcije), kot tudi sama instrumentalna metoda (npr. učinek matrice). Pripravo vzorca smo že optimizirali v prvem delu magistrske naloge, pri sami instrumentalni metodi pa smo se osredotočili na že poznane metode, ki so jih že predhodno uporabljali v literaturi (preglednica I), zato so na tem delu še možne izboljšave.

Preglednica XXXVIII: Rezultati celokupne učinkovitosti metode.

UČINKOVITOST METODE (%)				
Vzorec	25-OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
V-QCpl	14,9	16,6	11,3	11,3
V-QCpm	20,7	18,3	20,1	14,5
V-QCph	19,8	35,2	35,7	12,8

Iz rezultatov (preglednica XXXVIII) je razvidno, da je učinkovitost metode precej slaba, kar je verjetno predvsem posledica učinka matrice, ki analitom zmanjša odziv. Najslabša učinkovitost metode je pri nižjih koncentracijah vitaminov v plazmi in pri vitaminu K1.

Učinkovitost ekstrakcije

Učinkovitost ekstrakcije smo pri obogatenih plazemskih vzorcih vrednotili pri treh različnih koncentracijah. Odziv obogatenega plazemskega vzorca smo primerjali z odzivom ekstrahirane prazne plazme, ki smo jo na koncu postopka raztopili v enaki delovni raztopini, kot smo jo dodali v obogateni plazemski vzorec (enačba 3).

Preglednica XXXIX: Rezultati učinkovitosti ekstrakcije.

UČINKOVITOST EKSTRAKCIJE(%)				
	25-OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
V-QCpl	164,7	85,5	83,5	58,6
V-QCpm	97,2	79,6	80,9	68,0
V-QCph	102,0	90,8	90,7	66,1
Povprečje	99,6	85,3	85,0	64,2

Iz rezultatov (preglednica XXXIX) je razvidno, da je izkoristek ekstrakcije med 59 in 100 %. Slabši rezultati so pri vitaminu K1, kjer pri ekstrakciji izgubimo precejšen del analita.

Učinek matrice

Učinek matrice je vpliv endogenih ali eksogenih komponent v vzorcu, ki jih nismo uspeli odstraniti tekom priprave vzorca in se izločajo iz kromatografskega sistema skupaj z analiti in lahko povečajo ali zmanjšajo ionizacijo analita in njegov odziv. Supresija iona se pojavi, če vzorec vsebuje velike količine komponente, ki se izloča v istem časovnem okvirju kot analit (32). FDA smernice zahtevajo, da se pri razvoju bioanaliznih metod preveri učinek matrice, nikjer pa ni zapisano, kako se to izvede med validacijo (47). Absolutni učinek matrice smo zato vrednotili po priporočilih Matuzewskega (49) in rezultati so pokazali, da se absolutni učinek matrice pojavlja pri vseh analitih in precej zmanjša njihov odziv (preglednica XL).

Preglednica XL: Rezultati absolutnega učinka matrice.

UČINEK MATRICE (%)				
	25-OH D3	Vitamin D2	Vitamin D3	Vitamin K1
V-QCpl	9,0	19,4	24,2	19,3
V-QCpm	18,8	23,0	24,8	21,3
V-QCph	19,4	38,8	39,3	19,4

Za dodatno potrditev bi lahko ovrednotili še relativen učinek matrice. To se izvede tako, da se pri vsaj petih različnih bioloških vzorcih pripravi umeritveno premico in se nato pogleda za koliko se razlikujejo nakloni premic. V primeru, da je RSD naklonov višji od 4%, to pomeni, da se pojavlja učinek matrice (49).

V literaturi smo zasledili še en način dokazovanja učinka matrice z injiciranjem na kromatografsko kolono. Neposredno v MS se enakomerno injicira raztopina analita, ki daje konstanten odziv na kromatogramu. Istočasno se skozi kromatografsko kolono injicira prazno plazmo in na tistem delu kromatograma, kjer odziv pade, gre za supresijo ionizacije zaradi učinka matrice. S tem lahko dokažemo na katerem delu kromatograma prihaja do učinka matrice, ne moremo pa ga kvantificirati (32).

Problem učinka matrice bi bilo mogoče zmanjšati z uporabo internega standarda. Najpogosteje se v ta namen uporabljajo izotopsko označeni analogi preiskovanih analitov, ki imajo podobne fizikalno kemijske lastnosti. Interne standarde dodamo v vzorec in jih izpostavimo enakim pogojem kot analite. Po analizi odzive analitov preračunamo relativno na odzive internih standardov in se s tem izognemo učinku matrice (43).

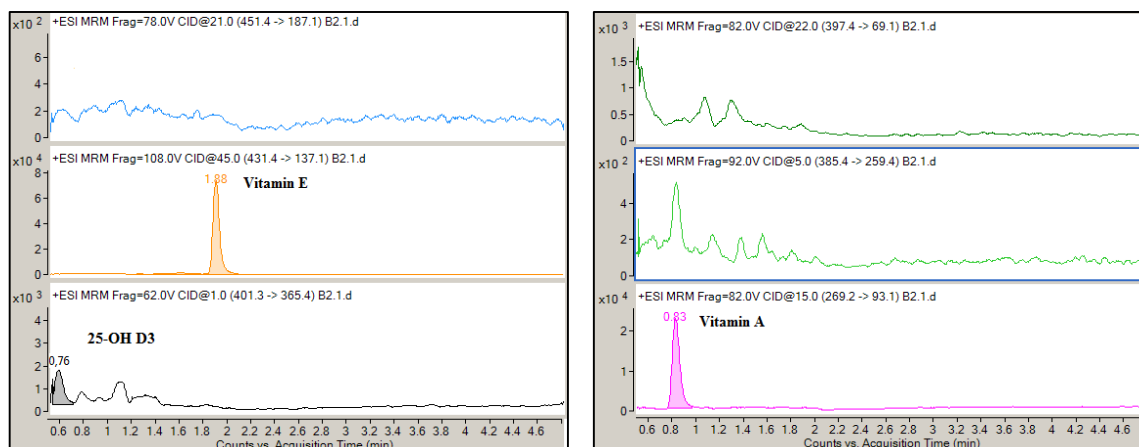
Učinek matrice lahko, kljub uporabi internega standarda, še vedno zmanjša občutljivost metode, zato je dobro, da ga čim bolj minimiziramo. To lahko dosežemo s spremembo

priprave vzorca, na primer namesto LLE bi uporabili SPE, ki je bolj učinkovita pri odstranjevanju endogenih komponent, ki povzročajo učinek matrice. Pristopi k zmanjševanju učinka matrice so še injiciranje manjšega volumna vzorca ali pa priprava manj koncentriranega vzorca (43).

ESI sistem ionizacije je občutljiv na učinek matrice, saj lahko endogene komponente motijo uporevanje ioniziranih analitov. Analit v ESI sistemu tekmuje sam s sabo in s komponentami matrice za ionizacijo. Nasičenje kapljic z analitom ali s komponentami matrice lahko povzroči težave nastanku ionov iz kapljic (32). Učinek matrice lahko rešujemo tudi z zmanjšanjem hitrosti vbrizgavanja vzorca v ionizator (manjši pretok mobilne faze), saj to pomeni, da nastajajo manjše kapljice, ki se lažje uplinijo in ionizirajo. APCI sistem je manj podvržen učinku matrice, saj se analiti uplinjujejo s pretokom vzorca skozi vročo komoro in se šele nato ionizirajo s prenosom naboja iz topila na analite. APCI sistem bi bil primeren za analizo lipofilnih vitaminov, saj so temperaturno stabilni, zato bi bilo v prihodnje smiselno našo metodo preizkusiti še s tem ionskim izvorom.

4.3. ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV

Po validaciji smo preverili ali z metodo lahko izmerimo koncentracijo vitaminov v realnih plazemskih vzorcih. Metodo smo preizkusili na treh različnih plazemskih vzorcih. Uspeli smo izmeriti 25-OH D3 ter vitamina A in E. Zaradi slabega izkoristka metode in učinka matrice je bil odziv ekstrahiranega vzorca prenizek za vitamine D2, D3 in K1. Slika 7 prikazuje kromatogram plazme št. 2, ki potrjuje prisotnost metabolita 25-OH D3, vitamina A in vitamina E pri njihovih kvantitativnih MRM prehodih. Ostali vitamini v plazmi niso prisotni.



Slika 7: Kromatogram ekstrahiranega vzorca plazme št. 2. Prisotni so metabolit 25-OH D3, vitamin A in vitamin E.

Koncentracije vitaminov v realnih plazemskih vzorcih so podane v preglednici XLI. Koncentracija metabolita 25-OH D3 je pri vseh treh realnih plazemskih vzorcih precej nizka, pri 2. plazmi bi lahko govorili celo o pomanjkanju, saj je koncentracija nižja od 10 µg/L (11). Tudi koncentracija vitamina A je nekoliko nižja od normalne vrednosti, vendar ne gre za pomanjkanje, saj mora biti v tem primeru vrednost nižja od 200 µg/L (8). Pri vitaminu E bi glede na izmerjene vrednosti lahko zaključili, da gre za pomanjkanje vitamina E, saj so koncentracije v plazmi nižje od 5000 µg/L (25). Možno je tudi, da so koncentracije nižje, ker gre za starejše plazemske vzorce, kjer bi lahko prišlo do zmanjšanja koncentracije analitov.

Preglednica XLI: Koncentracije vitaminov v realnih plazemskih vzorcih.

Koncentracija (µg/L)			
Vzorec	25-OH D3	Vitamin A	Vitamin E
1. plazma	24,22	309,61	2501,39
2. plazma	6,80	253,59	2253,09
3. plazma	11,09	265,82	3352,67

5. SKLEPI

V okviru magistrske naloge smo uspeli razviti in optimizirati novo metodo za vrednotenje lipofilnih vitaminov v plazmi z uporabo LC-MS/MS. Metoda omogoča vrednotenje metabolita 25-OH D3 ter vitaminov A, D2, D3, E in K1 v plazemskih vzorcih. Za analizno metodo potrebujemo samo 100 μ L biološkega vzorca, kar je manj kot pri večini do sedaj predstavljenih analiznih metodah za vrednotenje lipofilnih vitaminov v krvi.

Razvili smo nov način priprave vzorcev z uporabo obarjanja proteinov in ekstrakcijo tekoče-tekoče. Plazemske proteine smo oborili z dodatkom hladnega acetonitrila in vzorec nato ekstrahirali z etilacetatom. Pri ekstrakcijskem postopku smo ugotovili, da na ekstrakcijo ugodno vpliva tudi uporaba UZ kadičke. Izkoristek ekstrakcije je bil pri vseh treh molekulah vitamina D v povprečju višji od 85%, nekoliko slabši je bil pri vitaminu K1 (65%). Določili smo, da je najugodnejša temperatura za sušenje ekstrahiranega vzorca 35° C in da se nato vzorec najbolje raztopi v 200 μ L acetonitrila.

Optimizirali smo instrumentalno metodo z uporabo LC-MS/MS in sicer smo najprej izbrali primerno mobilno fazo in kromatografske pogoje za naše analite. Nato smo določili po dva MRM prehoda za vsak analit, enega za kvantifikacijo in drugega za identifikacijo vitaminov. Validacijo smo najprej izvedli na vodnih vzorcih in kasneje še na plazemskih. Z vodnimi vzorci smo potrdili, da je metoda linearna, točna in ponovljiva za vitamin A v območju 10 - 5000 μ g/L in E v območju 1-12000 μ g/L. Pri plazemskih vzorcih smo dokazali selektivnost metode. Potrdili smo tudi, da je metoda točna in ponovljiva za vitamine D2, D3 in K1 v območju 10-5000 μ g/L. Za metabolit 25-OH D3 nam v plazemskih vzorcih v območju 2–1000 μ g/L ni uspelo potrditi točnosti, zato so še potrebne izboljšave. Potrdili smo stabilnost vitaminov v plazemskih vzorcih pri shranjevanju pri sobni temperaturi in ob procesu odtajevanja in zamrzovanja vzorcev. Opazili smo tudi, da je vitamin K1 nestabilen v delovni raztopini v kombinaciji z ostalimi vitamini, saj se njegova vsebnost značilno zmanjša.

Med validacijo metode smo ugotovili, da imamo težavo z učinkom matrice, ki precej zmanjša odzive analitov. To je tudi razlog, da je bila učinkovitost metode samo okoli 20% in da nismo uspeli doseči dovolj nizkih mej določitve, da bi lahko vse preiskovane vitamine kvantitativno ovrednotili v realnih plazemskih vzorcih. Smo pa v vseh plazemskih vzorcih uspeli kvantificirati 25-OH D3, vitamin A in vitamin E.

Pri nadaljnji optimizaciji te metode bi se bilo potrebno osredotočiti predvsem v smeri minimizacije učinka matrice. To bi bilo mogoče s spremembo priprave vzorca, kromatografskih pogojev ali pa z uporabo kakšne druge bolj primerne ionizacijske tehnike.

V analizo metodo bi bilo smiselno vključiti še druge vitamine in njihove metabolite (npr. 1,25-(OH)₂ D3, metabolite vitamina D2, retinojsko kislino, retinal, karotenoide, ostale tokoferole, tokotrienole in vitamin K2), ki izkazujejo primerljive kemijske lastnosti kot izbrani analiti, in bi jih zato lahko ekstrahirali in analizirali na podoben način.

Povzamemo lahko, da smo uspeli razviti novo metodo za sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov, ki pa potrebuje še nekaj izboljšav, da bi bila primerna za splošno uporabo v kliničnih laboratorijih.

6. LITERATURA

1. Bellows L, Moore R: Water-Soluble Vitamins: B-Complex and Vitamin C. Food and nutrition series <http://extension.colostate.edu/topic-areas/nutrition-food-safety-health/water-soluble-vitamins-b-complex-and-vitamin-c-9-312/>
2. Albahrani A, Greaves R: Fat-Soluble Vitamins: Clinical Indications and Current Challenges for Chromatographic Measurement. *The Clinical Biochemist. Reviews* 2016; 37(1): 27-47.
3. Eitenmiller R R, Ye L, Landen Jr.W O, Vitamin Analysis for the Health and Food Science, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2008.
4. Stephensen C: Vitamin A, infection, and immune function: *Annual Review of Nutrition* 2001; 21: 167-192.
5. Perraud A, Nouaille M, Akil H, et al: Retinoid acid receptors in human colorectal cancer: An unexpected link with patient outcome: *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011; 2(3): 491-497.
6. Niles RM: Vitamin A and cancer: *Nutrition* 2000; 16(7-8): 573-576.
7. Chen W, Chen G: The Roles of Vitamin A in the Regulation of Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism: *Journa of Clinical Medicine* 2014; 3(2), 453-479.
8. De Pee S, Dary O: Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein: *The Journal Of Nutrition* 2002; 132(9): 2895S-2901S.
9. Dickens A, Lang I, Langa K, Kos K, Llewellyn D: Vitamin D, Cognitive Dysfunction and Dementia in Older Adults. *CNS Drugs* 2011;25(8):629-639.
10. Plum L, DeLuca H: Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9(12): 941-955.
11. Miodownik C, Lerner V: *Vitamin D Deficiency* [e-book]. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2012.
12. Nemerovski C W, Dorsch M P, Simpson R U, Bone H G, Aaronson K D, Bleske B E: Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2009, 29: 691-708.
13. Pittas A G, Lau J, Hu F B et al.: The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2007; 92: 2017-2029.
14. Bikle D: Nonclassic Actions of Vitamin D, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009; 94; 26-34
15. Ustianowski A, Shaffer R, Collin S, Wilkinson R J, Davidson R N: Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign-born persons with tuberculosis in London. *Journal of Infection* 2005; 50(5): 432-437.
16. Munger K, Levin L, Ascherio A, et al: Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA: Journal Of The American Medical Association* 2006; 296(23): 2832-2838.
17. Litonjua A, Weiss S: Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic?. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 2007; 120(5): 1031-1035.
18. Rizvi S, Raza S, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F: The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 2014; 14(2): 157-165.
19. Clarke M, Burnett J, Croft K: Vitamin E in human health and disease. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences* 2008; 45(5): 417-450.

20. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al: Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: The Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300: 2123–33
21. Wada S: Chemoprevention of tocotrienols: the mechanism of antiproliferative effects. *Forum Of Nutrition* 2009; 61: 204-216
22. Gysin R, Azzi A, Visarius T: Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology* 2002; 16(14): 1952-1954.
23. Mangialasche F, Kivipelto M, Fratiglioni L, et al: High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *Journal Of Alzheimer's Disease* 2010; 20(4): 1029-1037.
24. Meydani S, Meydani M, Stollar B, et al: Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *Jama* 1997; 277(17): 1380-1386.
25. Chan A: Normal plasma vitamin E concentration. *The Biochemical Journal* 1989; 260(2): 623.
26. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminK-HealthProfessional/>, html
27. Shearer M, Fu X, Booth S: Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Advances In Nutrition* 2012; 3(2): 182-195.
28. Suttie JW: Vitamin K. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al., eds. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed. London and New York: Informa Healthcare; 2010:851-60
29. Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, Shearer M, Gilbody S, Torgerson D: Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine* 2006; 166(12): 1256-1261.
30. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM, et al: Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Journal of Nutrition* 2004; 134: 3100-5
31. Sadowski J, Hood S, Dallal G, Garry P: Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 1989; 50(1): 100-108.
32. Grebe SK, Singh RJ: LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?. *The Clinical Biochemist Reviews* 2011; 32(1): 5-31.
33. Farrell C, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M: State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clinical Chemistry* 2012; 58(3): 531-542
34. Ofenloch-Haehnle B: Approaches to measurement of Vitamin D concentrations - Immunoassays. *Scandinavian Journal Of Clinical & Laboratory Investigation* 2012; 72: 50-53.
35. Khaksari M, Mazzoleni L, Ruan C, Kennedy R, Minerick A: Data representing two separate LC-MS methods for detection and quantification of water-soluble and fat-soluble vitamins in tears and blood serum. *Data In Brief* 2017; 11: 316-330.
36. Petruzzello F, Grand-Guillaume Perrenoud A, Thorimbert A, Fogwill M, Rezzi S: Quantitative Profiling of Endogenous Fat-Soluble Vitamins and Carotenoids in Human Plasma Using an Improved UHPSFC-ESI-MS Interface. *Analytical Chemistry* 2017; 89(14): 7615-7622.

37. Albahrani A, Rotarou V, Roche P, Greaves R: A simultaneous quantitative method for vitamins A, D and E in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2016; 159: 41-53.
38. Konieczna L, Kaźmierska K, Roszkowska A, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Bączek T: 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. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* 2016; 124 :374-381.
39. Midttun Ø, McCann A, Ueland P, et al: Combined Measurement of 6 Fat-Soluble Vitamins and 26 Water-Soluble Functional Vitamin Markers and Amino Acids in 50 µL of Serum or Plasma by High-Throughput Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2016; 88(21): 10427-10436.
40. Hrvolová B, Martínez-Huélamo M, Colmán-Martínez M, Hurtado-Barroso S, Lamuela-Raventós R, Kalina J: Development of an Advanced HPLC-MS/MS Method for the Determination of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Human Plasma. *International Journal Of Molecular Sciences* 2016; 17(10).
41. Priego Capote F, Jiménez J, Granados J, de Castro M: Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Communications In Mass Spectrometry: RCM* 2007; 21(11): 1745-1754.
42. Chatzimichalakis P, Samanidou V, Papadoyannis I: Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *Journal Of Chromatography. B, Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences* 2004; 805(2): 289-296.
43. Roškar R, Trdan Lušin T: *Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples*. INTECH Open Access Publisher, 2012: Ch. 4; 79-126.
44. Agilent technologies primer: Basic of LC-MS: Publication 5968-2543EN
45. Skoog DA, West DM: *Principles of instrumental analysis*. New York: Saunders College Publishing, 1997, 5. Edicija; Ch. 20: 499-534
46. Korfmacher W: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today* 2005; (20): 1357-1367.
47. Food and drug administration: FDA draft guidance for industry: bioanalytical method validation Rockville, MD: Us Department for Health and Human Services. Food and drug administration, Center for drug evaluation and research 2013; Revision 1.
48. Gutzeit D, Baleanu G, Winterhalter P, Jerz, G: Determination of Processing Effects and of Storage Stability on Vitamin K1 (Phylloquinone) in Sea Buckthorn Berries (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) and Related Products. *Journal of Food Science* 2007; 72; C491–C497.
49. Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez C M: Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry* 2003; 75(13); 3019-3030.
50. Kloepfer A, Quintana J, Reemtsma T: Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography. A* 2005; 1067(1-2): 153-160.
51. <http://lab.biarti.si/>, html