

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

JAN VLACH

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza kortizolu a jeho význam pro lidský organismus

2020

Jan Vlach

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jan Vlach**
Osobní číslo: **C17135**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Analýza kortizolu a jeho význam pro lidský organismus**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Provedte literární rešerši zabývající se možnostmi, významem a fungováním kortizolu v lidském organismu. Následně se zaměřte na jeho izolaci ze slin a stanovení pomocí chromatografických technik.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 06. 2020

Jan Vlach

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou děkuji doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, užitečné a cenné rady, připomínky, trpělivost, příjemnou spolupráci a ochotu. Děkuji také své rodině a blízkým za podporu během studia.

ANOTACE

Práce je zaměřena na funkci kortizolu v lidském organismu, na jeho biologické vlastnosti, důvody jeho sekrece a vliv na lidský organismus. Druhá část je zaměřena na odběr a zpracování vzorků slin a analýzu využívající chromatografické techniky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kortizol, analýza, sliny, chromatografie

TITLE

Analysis of cortisol and its importance for human organism

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on the function of cortisol in the human body, its biological properties, the reasons for its secretion and its effect on the human body. The second part of the work is focused on the collection and processing of saliva samples and analysis using chromatographic techniques.

KEYWORDS

Cortisol, analysis, saliva, chromatography

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZNAČEK A ZKRATEK.....	10
ÚVOD.....	13
1 KORTIZOL – STEROIDNÍ HORMON.....	14
1.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI KORTIZOLU	14
2 METABOLISMUS KORTIZOLU.....	15
2.1 FYZIOLOGIE A ANATOMIE NADLEDVIN	15
2.2 SYNTÉZA KORTIZOLU	16
2.2.1 <i>Sekrece kortizolu.....</i>	<i>17</i>
3 TRANSPORT A INTERAKCE KORTIZOLU V ORGANISMU.....	18
3.1 INTERAKCE KORTIZOLU V ORGANISMU.....	18
3.2 GLUKOKORTIKOIDNÍ RECEPTORY JAKO PŘÍSTUP DO JÁDRA.....	18
4 VLIV KORTIZOLU NA LIDSKÝ ORGANISMUS.....	20
4.1 VLIV NA NERVOVÝ SYSTÉM	20
4.1.1 <i>Vliv kortizolu během stresu.....</i>	<i>20</i>
4.1.2 <i>Vliv kortizolu na cirkadiánní rytmus</i>	<i>21</i>
4.1.3 <i>Vliv kortizolu na kardiovaskulární systém.....</i>	<i>21</i>
4.2 VLIV KORTIZOLU NA IMUNITNÍ SYSTÉM.....	21
4.3 VLIV KORTIZOLU NA METABOLISMU	22
5 PATOLOGICKÉ STAVY ZPŮSOBENÉ KORTIZOLEM.....	23
5.1 HYPERKORTIKALISMUS	23
5.2 HYPOKORTIKALISMUS.....	23
6 ÚVOD DO ANALÝZY	24
6.1 SLINNÝ KORTIZOL.....	24
6.2 METODIKA POSTUPU	25
7 ODBĚR, UCHOVÁNÍ A ÚPRAVA VZORKU SLIN	26
7.1 ODBĚR A ZAŘÍZENÍ K ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ SLIN.....	26
7.2 UCHOVÁNÍ A ÚPRAVA VZORKŮ	28
8 EXTRAKCE	29
8.1 EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ.....	29
8.1.1 <i>Mikroextrakce tuhou fází.....</i>	<i>31</i>
8.1.2 <i>Extrakce tuhou fází s použitím nanovláken.....</i>	<i>31</i>

8.2	EXTRAKCE KAPALINA-KAPALINA.....	32
8.2.1	<i>Podporovaná extrakce kapalina-kapalina</i>	32
8.3	APLIKACE EXTRAKČNÍCH METOD.....	33
9	POEXTRAKČNÍ ÚPRAVY	34
9.1	ODPAŘENÍ	34
9.2	ROZPUŠTĚNÍ	34
9.3	DERIVATIZACE.....	34
10	CHROMATOGRAFICKÉ METODY	36
10.1	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	37
10.2	TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE.....	38
10.3	IMUNOCHROMATOGRAFICKÉ METODY	38
10.4	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	39
10.5	APLIKACE METOD.....	39
	ZÁVĚR.....	43
	SEZNAM ZDROJŮ A LITERATURY	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

OBRÁZEK 1 – SCHÉMA A PRŮŘEZ NADLEDVINAMI	15
OBRÁZEK 2 – REAKČNÍ SCHÉMA SYNTÉZY KORTIZOLU	16
OBRÁZEK 3 – PRINCIP PŘÍSTUPU KORTIKOIDŮ DO BUŇKY	19
OBRÁZEK 4 – GRAFICKÉ VYJÁDŘENÍ KONCENTRACE KORTIZOLU PRO ZDRAVOU OSOBU, POČÁTEČNÍ A POKROČILÉ STÁDIUM CUSHINGOVY CHOROBY	24
OBRÁZEK 5 – SCHÉMA POSTUPU ANALÝZY.....	25
OBRÁZEK 6 – ZAŘÍZENÍ VERSI SAL™	26
OBRÁZEK 7 – ZAŘÍZENÍ QUANTISAL™	27
OBRÁZEK 8 – ZAŘÍZENÍ INTERCEPT.....	27
OBRÁZEK 9 – ZAŘÍZENÍ SALIVETTE	27
OBRÁZEK 10 – PRINCIP METODY SPE.....	29
OBRÁZEK 11 – ROZVAHA VOLBY ROZPOUŠTĚDLA.....	30
TABULKA 1 – PŘEHLED NÁZVŮ A STRUKTUR KORTIZOLU	14
TABULKA 2 – FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI KORTIZOLU	14
TABULKA 3 – REFERENČNÍ HODNOTY KORTIZOLU V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH.....	24
TABULKA 4 – PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ KORTIZOLU ZE SLIN.....	40
TABULKA 5 – PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ KORTIZOLU POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE V SÉRU.....	42

SEZNAM ZNAČEK A ZKRATEK

ACN	–	acetonitril
ACTH	–	adrenokortikotropní hormon
ATP	–	adenosintrifosfát
BSA	–	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	–	<i>N,O</i> -bis (trimethylsilyl)trifluoracetamid
Ca²⁺	–	vápenatý kation
CBG	–	kortikotropní globulin
CN	–	nitrily
CNS	–	centrální nervový systém
CRF	–	kortikotropní faktor
DVB	–	divinylbenzen
EI	–	elektronová ionizace
ESI	–	elektrosprejová ionizace
FLD	–	fluorescenční detekce
GC	–	plynová chromatografie
GR	–	glukokortikoidní receptor
GRE	–	sekvence DNA reagující na glukokortikoidy
GRα	–	glukokortikoidní receptor α
GRβ	–	glukokortikoidní receptor β
HFBA	–	kyselina heptafluorobutyrová

HLB	–	hypofilní-lipofilní rovnováha
HMP	–	2-hydrazin-1-methylpyridin
HPA	–	hypotalamová-hypofýzní-nadledvinová osa
HPLC	–	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL-10	–	interleukin-10
IL-1	–	interleukin-1
K⁺	–	draselný kation
LC	–	kapalinová chromatografie
LLE	–	extrakce kapalina-kapalina
LOD	–	mez detekce
LOQ	–	mez kvantifikace
MAD	–	derivatizace v mikrovlnném poli
MS/MS	–	hmotnostní analyzátor v tandemovém uspořádání
MSTFA	–	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl) trifluoracetamid
MTBE	–	methyl <i>t</i> ert-butyl ether
Na⁺	–	sodný kation
NH₂	–	aminy
NH₄I	–	jodid amonný
PFSPE	–	extrakce tuhou fází s použitím nanovláken
PH	–	phenyl hexyl
QqQ	–	hmotnostní analyzátor s trojitým kvadrupólem

QTOF	–	kvadrupólový průletový analyzátor
QTrap	–	kvadrupólový hmotnostní analyzátor s iontovou pastí
SLE	–	podporovaná extrakce kapalina-kapalina
SPE	–	extrakce tuhou fází
SPME	–	mikroextrakce tuhou fází
TFA	–	trifluoroctová kyselina
TMCS	–	trimethylchlorsilan
TMSC	–	trimethylsilylchlorid
UHPLC	–	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	–	spektrofotometrie v ultrafialové oblasti světla

ÚVOD

Hlavním cílem práce je uvést funkce kortizolu v lidském organismu a možnosti jeho stanovení pomocí chromatografických technik ze slin, ve kterých se chová jako biomarker různých patologických stavů.

Stanovení kortizolu ve slinách se používá při diagnostice lidí s poruchou na úrovni nadledvin, následně hypofýzy a hypotalamu. Nadměrné nebo malé koncentrace kortizolu ve slinách jsou analyzovány u lidí s Cushingovou, Addisonovou nemocí a poruchou cyrkadiálního rytmu. Hlavním důvodem analýzy kortizolu ve slinách jsou, neinvazivní postup při vlastním odběru, snížení úprav vzorků a dobrá koncentrační stabilita.

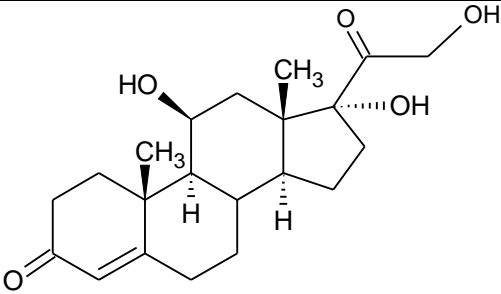
Samotné měření se neobejde bez extrakce kortizolu ze slin. Extrakce slouží zejména pro odstranění interferencí a zakoncentrování vzorku. Nejčastěji užívanou extrakční technikou je extrakce kapalina-kapalina a extrakce tuhou fází, kde se používají nepolární rozpouštědla a sorbenty. Samotné analytické metody jsou pak zaměřeny na chromatografické metody, které oproti běžným imunoanalytickým metodám mají vyšší selektivitu a senzitivitu. Nevýhodou těchto metod je používání velmi drahých přístrojů, které nejsou dostupné v každé laboratoři. Tyto metody se využívají zejména pro výzkumné účely.

1 Kortizol – steroidní hormon

1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti kortizolu

Kortizol, neboli hydrokortizon, je organická sloučenina patřící mezi steroidní hormony kůry nadledvin, tuto skupinu nazýváme glukokortikoidy [1, 2]. Patří mezi nepolární sloučeniny, která jsou ve velmi malém měřítku rozpustné ve vodě. Díky své steroidní struktuře je velmi dobře rozpustný v tucích, organických rozpouštědlech a látek tomu podobných [3]. V tabulce 1 jsou uvedeny názvy a struktury kortizolu, v tabulce 2 jsou uvedeny rozpustnosti, kdy jejich znalost se využívá při extrakčních a chromatografických technikách [2].

Tabulka 1 – Přehled názvů a struktur kortizolu [2]

Triviální název	Kortizol; hydrokortizon (farmakologické označení)
Systematický název	11 β , 17, 21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion
Sumární vzorec	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
Schematický vzorec	

Tabulka 2 – Fyzikálně chemické vlastnosti kortizolu [2]

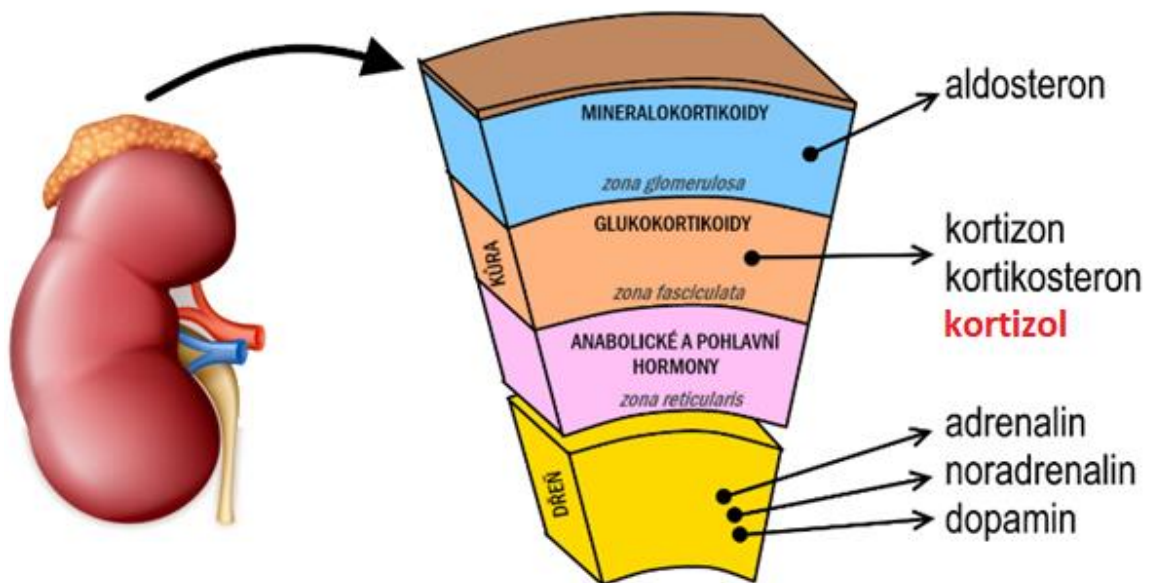
Parametr	Hodnota
Molární hmotnost	362,466 g/mol
Bod tání	220 °C
Barva	bílá
Rozpustnost	
Voda	0,30 mg/ml
Ethanol	15 mg/ml
Methanol	6,2 mg/ml
Aceton	9,3 mg/ml
Chloroform	1,6 mg/ml

2 Metabolismus kortizolu

Syntéza kortizolu probíhá v kůře nadledvin [4].

2.1 Fyziologie a anatomie nadledvin

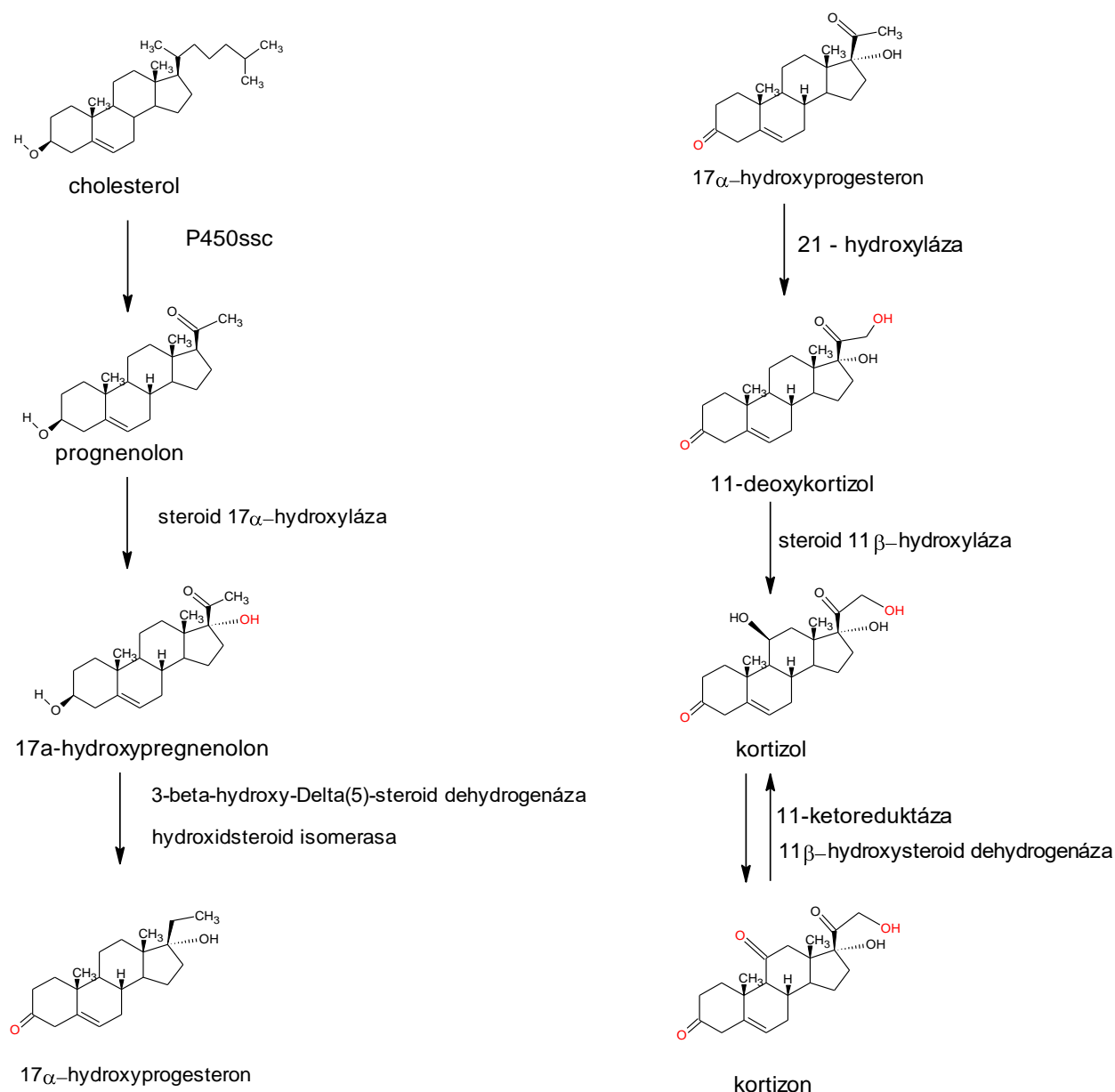
Nadledviny jsou žlázy s vnitřní sekrecí, které se nacházejí na horních částech ledvin. Jsou tvořeny vnější kůrou nadledvin, kůrou nadledvin, vnější dřeví nadledvin a dřeví nadledvin. Popis je sestupný, jako na obrázku 1. V kůře probíhá syntéza mineralokortikoidů (nejznámější aldosteron) a glukokortikoidů (kortizon, kortikosteron, kortizol). V dřeví jsou syntetizovány pohlavní hormony a katecholaminy (adrenalin, noradrenalin a dopamin) [4].



Obrázek 1 – Schéma a průřez nadledvinami Převzato z: https://cit.vfu.cz/klinpat_atlas/nadled1.jpg

2.2 Syntéza kortizolu

Počáteční látkou pro syntézu kortizolu je cholesterol. Syntéza probíhá v kůře nadledvin [5]. Schéma celé produkce je uvedeno na obrázku 2, kde je patrné že v poslední fázi je možný přechod kortizonu zpět na kortizol díky enzymu 11 β -3-hydroxid steroid dehydrogenázy. Je deklarováno, že tento enzym je přítomný ve slinných žlázách, jako ochrana mineralokortikoidních receptorů [6]. Proto v případě následujících analytických metod je doporučeno stanovovat i kortizon. [7]



Obrázek 2 – Reakční schéma syntézy kortizolu *Inspirace z: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRlkVOFnojmm13djl0QNR9EjDWAKEXH75OBwAsoTFQUZFitfuJ>*

2.2.1 Sekrece kortizolu

Sekrece kortizolu je zahájena podnětem, nejčastěji stresem, imunitní příčinou, nedostatkem glukózy v krvi (hypoglykemie). Tyto stavy jsou brány jako rozrušení, neboť organismus přichází do akutního stavu. Počátek tohoto stavu je aktivace hypothalamové-hypofýzní-nadledvinové cesty (HPA), která vede k sekreci kortizolu. Vše začíná vyloučením hypothalamovým kortikotropním faktorem (CRF), který je následně přesunut do hypofýzy a stimuluje vyloučení adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z přední hypofýzy. ACTH je následně přepraven do kůry nadledvin a aktivuje syntézu a následné vyloučení kortizolu. Aby se zabránilo neustálému vylučování předešlých hormonů, kortizol má funkci omezení a zastavení vylučování CRF a ACTH [8].

3 Transport a interakce kortizolu v organismu

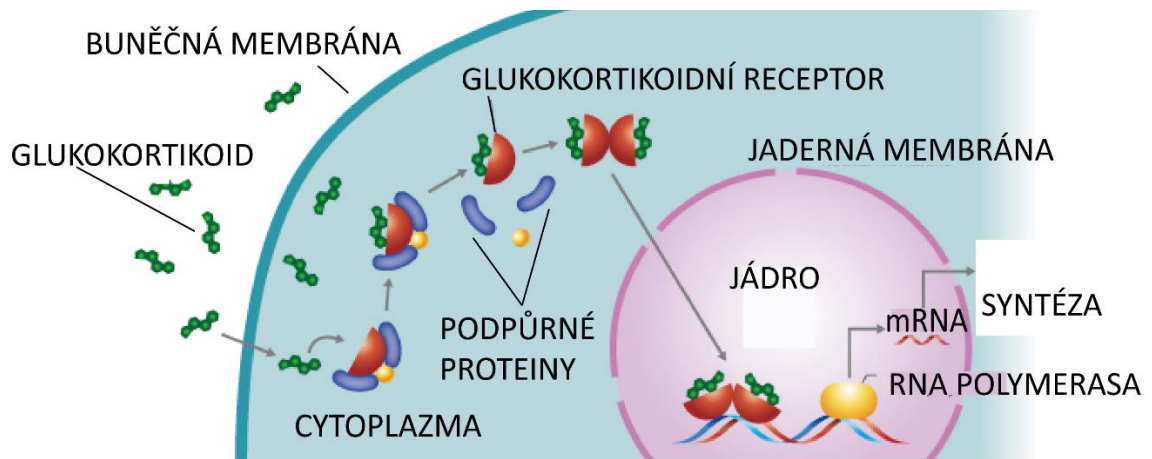
V organismu po vyloučení do krve zaznamenáváme dva druhy kortizolu, a to volný a vázaný. Pro samotné měření je nutné tyto dva typy odlišit. Většina kortizolu je vyvázaná na kortikoidní transportní protein (CBG). Tyto proteiny kvůli své enormní molekulové struktuře a případně i náboji nejsou schopny opustit krevní řečiště, v některých případech jsou glukokortikoidy schopny se navázat na albumin, ale často dochází k disociaci. Volný kortizol nalezený v krevním řečišti je odpovědí na hypotézu, že čím více dochází k jeho tvorbě tím více kortizol přestoupí pouhou difuzí z řečiště do tkáně a poté i zpět. Důvodem je vypotřebování CBG a tím pádem více kortizolu prostupuje z tkáně kvůli jeho vysoké produkci, jako volný kortizol [9].

3.1 Interakce kortizolu v organismu

Fyziologický účinek glukokortikoidů je zprostředkován jejich navázáním se na glukokortikoidní protein, který patří mezi jaderné hormonální receptory. Jejich hlavní charakteristikou je, že slouží jako transkripční faktory. Zjednodušeně řečeno, glukokortikoidový receptor zapříčiní navázání příslušného ligandu (glukokortikoidu), translokuje jej (přesune) do jádra, naváže se do příslušné sekvence DNA, kde dojde k syntéze imunitních, metabolických a toxických posílů, případně konkrétních sloučenin, které následně ovlivní tělní funkce. Kortikosteroid ovlivňuje imunitní systém tím, že omezuje/zvyšuje vyloučení bílých krvinek z kostní dřeně, brzlíku a periferní tkáně pomocí cytokinů (první poslové). Tito poslové fungují jako aktivátory příslušné imunitní buňky. Metabolické a toxické funkce souvisí s expozicí a nadměrnou/sníženou sekrecí kortikosteroidů. [10].

3.2 Glukokortikoidní receptory jako přístup do jádra

Tyto receptory patří mezi velkou skupinu jaderných receptorů, které jsou aktivované po prostupu kortikosteroidů přes plazmatickou membránu do buňky. Jejich funkcí je přepravení kortizolu do jádra, kde slouží jako transkripční faktory. Lidský glukokortikoidní receptor (GR) je kódován kódem NR3C1. GR protein patří do skupiny jaderných receptorů, jež nazýváme ligand-dependentní (při nepřítomnosti ligandu nejsou aktivní). Jsou známy dvě izoformy těchto receptorů: glukokortikoidní receptor alfa ($GR\alpha$) a glukokortikoidní receptor beta ($GR\beta$). $GR\alpha$ představuje klasický receptor, který po navázání glukokortikoidu funguje jako transkripční faktor. $GR\beta$ inhibuje $GR\alpha$. Na obrázku 3 je znázorněn princip přístupu kortikoidů do buňky [10, 11].



Obrázek 3 – Princip přístupu kortikoidů do buňky *Převzato z: podle: http://csls-text3.c.utokyo.ac.jp/large_fig/fig15_04.html*

4 Vliv kortizolu na lidský organismus

4.1 Vliv na nervový systém

Kortizol hraje velkou roli v paměti, učení a rytmicitě bdělosti. Mechanismus glukokortikoidů je způsoben (jako ve všech buňkách) přítomností GR v neuronech a gliálních buňkách. Tyto buňky jsou přítomny v prefrontální kůře, hipokampu a basolaterální amygdale, které mají z fyziologického hlediska na starost vzrušivost a bdělost [11].

Základní funkce kortizolu v nervové soustavě spočívá ve zvýšení elektrické nervové aktivity, která souvisí se zvýšením ostražitosti, pozornosti, navozením chuti k jídlu, spuštění obraného mechanismu, kdy se kortizol chová jako zprostředkovatel obrany (proti infekci, nebezpečí, hladovění). Avšak jeho přítomnost ve velkém měřítku může způsobit patologické stavy. Deficit nebo nadbytek kortikosteroidů způsobuje ztrátu neuronů, kdy u dlouhodobě zvýšené nervové aktivity (dlouhodobý stres) vede k opotřebenosti neuronů s následným odumřením těchto buněk. Lze to uvést na příkladu dlouhodobé stresové situace: pokud je člověk v silně stresovém okamžiku stává se často, že po jeho ukončení si jej pořádně nepamatuje, podvědomě ví že se něco událo, ale zpětně si nedokáže celý okamžik dopodrobna vybavit [11].

4.1.1 Vliv kortizolu během stresu

Jak již bylo zmíněno výše, dostává se tělo v případě velkého ohrožení či silně nepříjemné situace do stavu, kdy je připraveno k obraně. Tato obranná odpověď organismu je známá pod pojmem stresová odpověď a podle délky se dělí na krátkodobou a dlouhodobou [12].

V případě krátkodobého vystavení stresu, vyšle hypotalamus nervový vzruch a aktivuje nadledviny, ty vyloučí dávky katecholaminů, jako adrenalin, noradrenalin, které následně způsobí tachykardii a hypertenzi, diaforézu, zvýší okysličování krve [12].

U dlouhodobého stresu přichází na řadu kortizol, ten je vylučován klasickou HPA cestou. Způsobí velké množství fyziologických kaskád v těle, jako je zvýšení tonusu, srdečního tepu, rozšíření zorniček, termodynamiku organismu (chlad, teplo, pocení) [12].

4.1.2 Vliv kortizolu na cirkadiánní rytmus

Zajímavostí je, že u kortikoidů dochází k postupné pulzující sekreci během dne. I když velký vliv na sekreci kortizolu má nervový systém, tak nadledvina sama o sobě upravuje citlivost na ACTH, které nastaví specifické časové intervaly pro maximální sekreci glukokortikoidů. Tomuto procesu se říká cirkadiánní rytmus. Nejvyšší sekrece nastává mezi 4 a 8 hodinou ráno, kdy dochází k naprostému vrcholu sekrece kortizolu. Důvodem je zejména lačnění, kdy tělo po spánku nemá dostatek glukózy, proto se vyloučí kortizol pro zahájení glukoneogeneze. Nejnižší koncentrace je pak v noci, méně než 50 % oproti ránu. V případě silné stresové situace může dojít ke stavu kdy tělo vylučuje ve velkém množství kortizol během celého dne. Při tomto stavu dojde k rozrušení tohoto tělního rytmu vedoucí k problému se spánkem, pamětí a metabolismem [12].

4.1.3 Vliv kortizolu na kardiovaskulární systém

Hlavní funkce kortizolu na kardiovaskulární systém je na principu zvýšení vaznosti angiotenzin II a noradrenalinu, hormonů zvyšující krevní tlak, na α a β receptory hladké a srdeční svaloviny [10]. Tato zvýšená exprese zapříčiní zvýšení prostupnosti Ca^{2+} elektricky dependentních kanálků (Ca^{2+} je hlavní iont pro stahování svaloviny), což vyústí ke zvýšení stahů v buňkách hladkého svalstva (svalstvo cév). Dále pak tyto hormony ovlivňují zvýšení transportu Na^+ a K^+ iontů v kardiomyocytech za účelem zvýšení elektrického vzruchu, což pak v závěru způsobí zvýšení srdečního tepu [10, 12].

4.2 Vliv kortizolu na imunitní systém

Kortikosteroidy jsou imunomodulátory. V organismu není imunitní buňky, která by nebyla ovlivněna kortikosteroidy. S ohledem na imunitní systém, má kortizol několik funkcí, které se dělí do dvou základních skupin, protizánětlivé a imunosupresivní [10]:

- protizánětlivé funkce:
 - zvyšuje endocytózní aktivitu,
 - způsobuje akumulaci neutrofilů na zánětlivých místech,
 - zprostředkovává přechod mezi Th1 na Th2 lymfocyty,
 - zprostředkovává syntézu protizánětlivé látky thymosin, hormonu sloužící ke zvýšení tvorby lymfocytů [13],
 - zprostředkovává syntézu interleukinu-1 (IL-1), což je cytokin který způsobuje aktivaci neutrofilů, aktivaci T-buněk a produkci dalších cytokinů zprostředkovávajících proliferaci fibroblastů a produkci kolagenu [14],

- imunosupresivní funkce:
 - umožňuje syntézu inhibitorů pro tvorbu strukturních glykoproteinů sloužících pro označení cizorodého mikroorganismu v těle pro lymfocyty [15],
 - jako zprostředkovatel slouží k syntéze interleukinu-10, cytokin sloužící k regulaci imunitního systému při zánětlivém onemocněním [16].

4.3 Vliv kortizolu na metabolismus

K vyloučení kortizolu do krve dojde z důvodu snížené koncentrace glukózy v krvi, následně ovlivní řadu biochemických reakcí v orgánech, jako jsou játra, svaly, tuková tkáň a slinivka břišní. V játrech vyvolá glukoneogenezi a sníží syntézu glykogenu (zásobní cukr). Glukoneogeneze je několikero reakcí vedoucích k syntéze glukózy, nejčastěji z glukoamino kyselin, laktátu, glycerolu-3-fosfátu. Glukoneogeneze zvrátí glykolýzu, cytoplazmatickou cestu používanou k přeměně glukózy na molekuly pyruvátu. Tato cesta se používá k uvolňování energie prostřednictvím fosforylace a oxidační reakce na úrovni substrátu. Na rozdíl od glykolýzy se glukoneogeneze stává aktivní, když tělo potřebuje energii. Svaly mají vlastní vnitřní zásobu glykogenu, která jim umožňuje rychle reagovat na změny v požadavcích na ATP. V přítomnosti kortizolu snižují svalové buňky příjem a spotřebu glukózy a zvyšují degradaci proteinu. V tukových tkáních zvyšuje kortizol lipolýzu. Lipolýza je katabolický proces, který vede k uvolňování glycerolu a volných mastných kyselin. Tyto volné mastné kyseliny mohou být použity při oxidaci β mastných kyselin a jako zdroj energie pro další buňky, protože pokračují v produkci glukózy. Kortizol také působí na pankreas, aby snižoval inzulín a zvyšoval glukagon. Glukagon je peptidový hormon vylučovaný pankreatickými alfa buňkami ke zvýšení glykogenolýzy jater, glukoneogeneze jater, ketogeneze jater, lipolýzy a také ke snížení lipogeneze. Kortizol zvyšuje aktivitu glukagonu, adrenalinu a dalších katecholaminů [12].

5 Patologické stavy způsobené kortizolem

5.1 Hyperkortikalismus

Známý jako Cushingův syndrom, je způsoben vysokou expozicí kortizolu v dlouhém časovém intervalu. Rozlišujeme dva druhy těchto syndromů [17]:

- exogenní Cushingův syndrom:
 - je způsoben vnějším příjmem kortikoidů (prášky či roztoky), který zvyšuje koncentraci kortizolu v těle. Tyto kortikoidy jsou často podávány k autoimunitním infekcím, na snížení vedlejších účinků, jako lupus, revmatoidní artritida.
- endogenní Cushingův syndrom:
 - je způsoben nadměrnou produkcí kortizolu v kůře nadledvin, většinou kvůli nádoru v této části těla, ledvin a podvěsku mozkovém.

Mezi nejčastější symptomy tohoto syndromu patří přibírání na váze, cukrovka, hypertenze, hirsutismus (růst chloupků u žen na nezvyklých místech), celková slabost a osteoporóza [17].

5.2 Hypokortikalismus

Těž známý, jako Addisonova nemoc. Příčinou je snížená produkce kortikosteroidů z nadledvin. Je způsoben zejména primární kůrovou nedostatečností a sekundární kůrovou nedostatečností [12]:

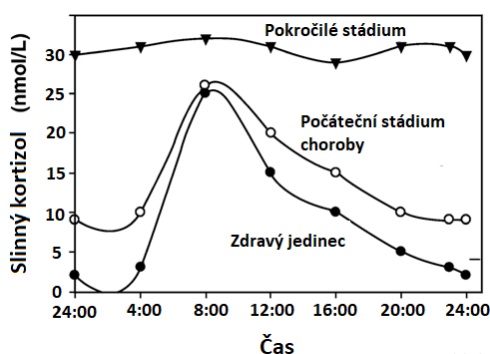
- primární kůrová nedostatečnost:
 - souvisí zejména s autoimunitním onemocněním, jako lupus a další, kdy tělo napadá vlastní nadledviny.
- sekundární kůrová nedostatečnost;
 - souvisí s nedostatečnou produkcí ACTH z hypofýzy, způsobeno nádory a zářnými hypofýzy.

6 Úvod do analýzy

6.1 Slinný kortizol

Slinný kortizol se dá považovat za index volného kortizolu v plazmě. Jeho sledování ve slinách lze užít jako nástroj pro fyziologické a diagnostické studie pro funkci HPA osy nadledvin. Dále jeho aplikaci lze použít pro diagnózu Cushingova syndromu. Na obrázku 4 je porovnávána normální koncentrace kortizolu ve slinách během dne, pak počáteční a pokročilé stádium Cushingovy choroby. Tato fakta jsou důležitá pro načasování odběrů vzorků. Dále pak znalost referenční hodnoty patří k dalšímu předpokladu vyhodnocení výsledků, jak je uvedeno v tabulce 3 [18].

Je nutno podotknout že v slinných žlázách dochází k sekreci 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy, která přeměňuje kortizol na kortizon a chrání tak mineralokortikoidové receptory (MR) před vazbou kortizolu. V důsledku toho jsou relativní hladiny kortizonu/kortizolu mnohem vyšší než v séru. V praxi je tedy při chromatografických metodách, analyzován i kortizon, aby se prokázala celá dysfunkce nadledvin. Tato práce je zaměřena zejména na samotný kortizol [7].



Obrázek 4 – Grafické vyjádření koncentrace kortizolu pro zdravou osobou, počáteční a pokročilé stádium Cushingovy choroby *Převzato a upraveno*

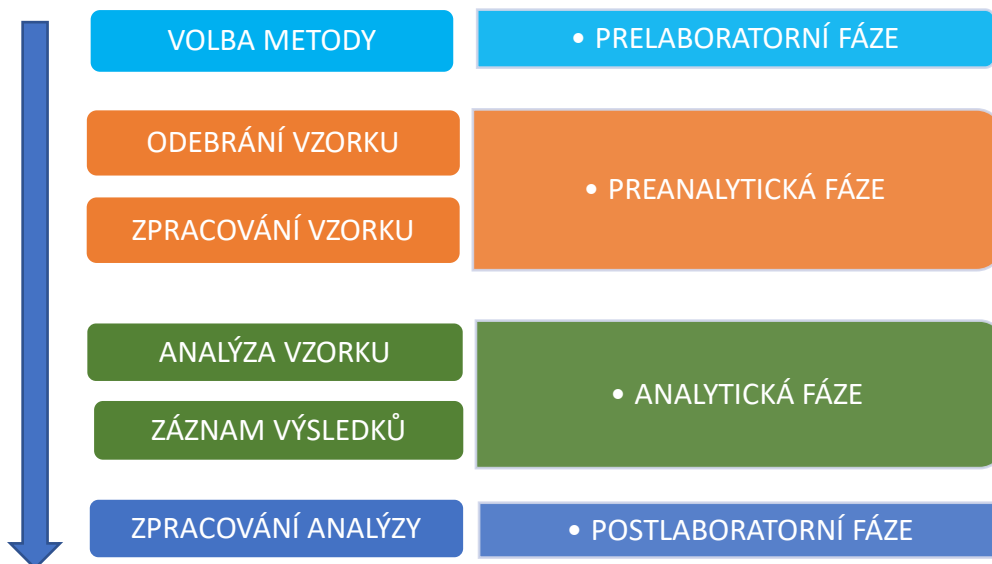
z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.513.4032&rep=rep1&type=pdf>

Tabulka 3 – Referenční hodnoty kortizolu v biologických tekutinách [18]

Čas	Sliny	Sérum	Moč
	c (nmol/l)	c (nmol/l)	c (nmol/24)
8:00 - 9:00	3,5 - 27,0	123,0 - 626,0	59,6 - 413
16:00 - 17:00	1,3 - 6,0	46,2 - 889,0	

6.2 Metodika postupu

Obecný postup volby metody začíná stejnými pravidly, které se dělí do několika bodů, jak je uvedeno na obrázku 5. Schéma zároveň představuje osnovu, podle které se laboratorní pracovník řídí [19].



Obrázek 5 – Schéma postupu analýzy *Inspirace z: [18]*

S využitím schématu na obrázku 5, bude postup pro analýzu kortizolu ze slin koncipován následujícím způsobem [19]:

- odběr slin a odběrová zařízení slin,
- uchování vzorků slin,
- úprava vzorků slin,
- zpracování vzorků slin (možnosti extrakčních technik),
- poextrakční úpravy (odpaření, derivatizace),
- vlastní analýza (možnosti chromatografických technik),
- validace metod.

7 Odběr, uchování a úprava vzorku slin

Pro zdařilou analýzu kortizolu je doporučeno dodržovat před odběrem tato pravidla [20]:

- nekouřit,
- minimálně 2 hodiny před odběrem se zdržet jídla a kofeinu,
- minimálně 2 hodiny před odběrem neprovádět fyzické aktivity,
- minimálně 2 hodiny před odběrem si nečistit zuby, kvůli kontaminování slin krví,
- těsně před odběrem vypít alespoň 500 ml vody.

7.1 Odběr a zařízení k odebírání vzorků slin

Odběr slin spočívá především ve slinění, případně žvýkání tampónku na pohlcení slin po určitou dobu [21]. Odebírané množství se pohybuje od 1 ml až 3 ml v závislosti na analytické metodě. Pro stimulaci slinění lze použít žvýkačky (bez cukru) a kyselinu citrónovou. U kyseliny citrónové je nutno sledovat pH slin, drastické snížení pH ovlivňuje výsledky měření, zejména pak u imunoanalytických metod [22, 23]. Pro zjednodušení odběru je možné využít specifických druhů zařízení [24]:

- Versi SalTM

Má jednorázový necelulózový absorbent, který je umístěn pod jazyk a je možno s ním odebrat přibližně 1,2 ml slin za 12 min. Po absorpci dostatečného množství slin se na úchopu zařízení změní barva indikace. Závěrem se zařízení vloží do pouzdra, stlačí se úchop a sliny přejdou do Eppendorfovy zkumavky. Zařízení je zobrazeno na obrázku 6 [24, 25].



Obrázek 6 – Zařízení Versi SALTM Převzato z: [24].

- Quantisal™

Má podobný princip, jako Versi SAL™. Skládá se z celulózového polštářku, který je připojen k úchopu s indikátorem. Polštářek je umístěn do úst a dochází k pohlcování slin. Při dokončení absorpce potřebného objemu slin dojde k barevné změně indikace. Zařízení je zobrazeno na obrázku 7 [24].



Obrázek 7 – Zařízení Quantisal™ Převzato z: [24].

- Intercept®

Známý jako orální drogový test. Zařízení je typově podobné jako Quantisal: žvýkáním tampónku se absorbují sliny. Dosažením žádaného objemu slin se změní indikace na úchopu. Používá se zejména pro dopingovou kontrolu. Zařízení je zobrazeno na obrázku 8 [24, 26].



Obrázek 8 – Zařízení Intercept® Převzato z: [24].

- Salivette

Nejznámější zařízení pro vzorkování slin. Vzhledově se neliší od zkumavky, rozdíl je v přítomné vnitřní nádobce doplněné o bavlněnou vložku, nebo tampónek. Žvýkáním tampónek pohltí 0,2 až 3 ml slin, v závislosti na typu zařízení. Pouzdro nádobky je nejčastěji tvořeno polypropylenem nebo polyethylenem. Vzhled zařízení je na obrázku 9 [24, 27].



Obrázek 9 – Zařízení Salivette Převzato z: [24].

7.2 Uchování a úprava vzorků

Po odběru jsou tampónky se Salivettou buď centrifugovány, nebo uloženy do mrazáku. Pro uložení vzorků do mrazáku na delší časový úsek jsou deklarovány teploty, při kterých nedojde k zásadním změnám koncentrace kortizolu za určitý čas. Jedná se konkrétně o teploty v rozmezí od -20 °C až -80 °C, maximálně po dobu jednoho roku [28, 29].

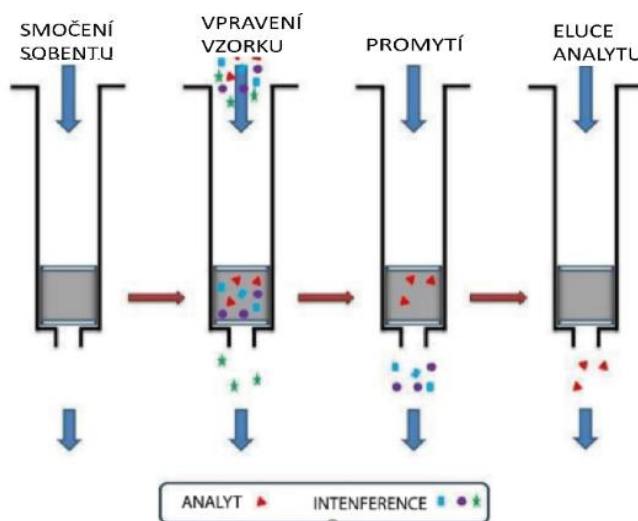
Dle dostupných informací, při 18 °C a 4 °C bez jakékoliv úpravy slin (centrifugaci a úpravy pH) dochází k zásadnímu poklesu koncentrace kortizolu. Pro zvýšení koncentrační stability se doporučují sliny centrifugovat, odebrat supernatant, uložit jej do Eppendorfovy zkumavky a případně přidat kyselinu trifluoroctovou (pro denaturaci enzymů, bílkovin) a azid sodný (proti bakteriálnímu růstu) [30].

8 Extrakce

Jedná se o proces, kdy jsou v kontaktu dvě nemísitelné fáze (tuhá, kapalná, plynná), přičemž v jedné z nich je náš stanovovaný analyt [31]. Analyt je převeden do fáze, ve které je možno jej analyzovat, bez rušivých elementů. Extrakce tuhou fází je využívána pro extrakci stanovovaných látek roztoků (slin) promytím a odstranění rušivých elementů. Další možností je metoda kapalina-kapalina [32]. Těmito technikami je možné extrahovat analyt ze vzorku z komplikované matrice, jako je například biologický materiál, který obsahuje velkou řadu chemických analytů. V dnešní době se hojně využívá extrakce tuhou fází. Pro nízké koncentrace jsou využívány mikroextrakční techniky. Z pohledu měření je fáze vlastní přípravy a zpracování vzorku k měření nejdůležitější, neboť pro měření analytu ve velmi komplexních maticích, není lehké z tisíců látek měřit konkrétní látky bez extrahování ze vzorku [31]. Extrakční techniku volíme podle typu analytu, matrice, ze které extrakci provádíme a chromatografické metody, kterou chceme následně pro měření použít [33].

8.1 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) patří mezi sorpční techniky, kdy se látky zachytávají na tuhém sorbentu, který je umístěn v kolonce [33]. Výsledkem je pak postupné eluování analytu vhodným rozpouštědlem. Na obrázku 10 jsou zobrazeny jednotlivé kroky SPE extrakce. Počátkem je smočení sorbentu (například methanolem, ethanolem), poté je vzorek nanesen na a dojde na něm k zachycení analytů. Následně se kolonka promyje vhodným rozpouštědlem, který odstraní interference. V závěru se pak použije vhodné rozpouštědlo, které uvolní analyt ze sorbentu [31].



Obrázek 10 – Princip metody SPE Převzato z: https://www.researchgate.net/profile/Dheyaa_Alkarawi2/publication/312498761/figure/fig3/AS:451913184485378@1484755907109/Stages-of-solid-phase-extraction-SPE.png

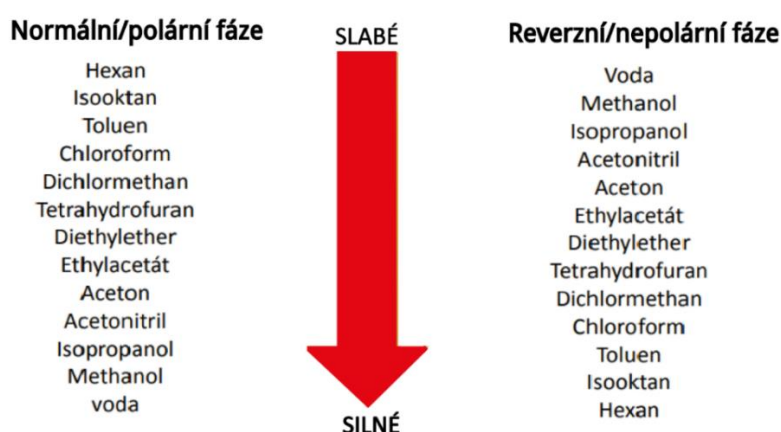
Mezi sorbentem a analytem mohou vzniknout tři možnosti interakcí. Hydrofobní – nepolární interakce, kdy dochází ke vzniku van der Waalsových sil a disperzních sil mezi analytem a sorbentem. Dalším typem je polární interakce, kdy dochází ke vzniku dipólového momentu, vodíky analytu se připojí k silně elektronegativnímu prvku sorbentu a vznikne vodíkový můstek. Jako poslední je iontová interakce za vzniku iontové vazby, kdy se přitahují opačně nabitě funkční skupiny analytu. Podle těchto interakcí dělíme zároveň fáze do tří skupin: polární fáze, nepolární fáze a iontoměničové [34, 35].

Nejznámější sorbentem u polární fáze je silikagel, oxid hlinitý, florisil, nebo polárně modifikovaný silikagel, kde funkční skupinu tvoří CN (nitrily), diol, nebo NH₂ (aminy). Tyto sorbenty umožňují zadržení polárních látek z nevodných roztoků [34, 35].

U nepolární fáze, známé častěji pod pojmem reverzní fáze, jsou sorbenty C₁₈ (oktadecyl), C₈ (oktyl), PH (phenyl-hexyl). Tyto sorbenty se užívají k retenci nepolárních látek z vodných roztoků [35].

Poslední skupinou jsou iontové sorbenty, které způsobují retenci látek z vodných roztoků. Jsou to sorbenty obvykle obsahující funkční skupiny, které jsou vždy ionizované, jako kvartérní aminy a sulfonové kyseliny [34, 35].

Pro volbu eluentů/rozpouštědel je na obrázku 11 ilustrována síla jednotlivých rozpouštědel od nejméně polárních po polární a naopak. Pokud je sorbent z polární fáze, promytí silným nepolárním organickým rozpouštědlem bude bez výsledku, jelikož samotný analyt je také polární, nedojde tedy k jeho uvolnění. [35].



Obrázek 11 – Rozvaha volby rozpouštědla Inspirace z: [35]

8.1.1 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) patří do kategorie extrakčních technik používající tuhé sorbenty. Změna oproti klasické SPE je v instrumentaci a použití velmi malého množství sorbentu (proto mikroextrakce). Nejčastější uspořádání je s použitím polymerního vlákna, které má modifikovaný povrch. Toto vlákno je uloženo v jehle, kdy při vpichu jehly do místa se vzorkem (vialka) se vlákno vysune a dojde k sorpci analytů. Při ukončení sorpce se vlákno zasune zpět do jehly a následuje desorpční krok v chromatografu (desorpce teplem v případě GC nebo kapalinou v případě HPLC), nebo mezikrok, a to desorpce analytu v rozpouštědle do další vialky [36, 37].

Jsou dvě základní možnosti sorbování analytu na SPME vlákno. Sorpce v tzv. headspace prostoru, nebo přímý odběr tzv. direct immersion (přímé vzorkování z kapaliny). Sorpce v headspace prostoru se používá zejména pro těkavé látky a přímé vzorkování pro látky v kapalném stavu [36,37].

Sorpce analytů lze urychlit zahříváním, použitím více pórovitého materiálu, míchání vzorku. Další možnosti je přidání soli, nebo úprava pH, kdy principem těchto úprav je zvýšení polarity roztoku (zvýší se iontová síla roztoku), nepolární analyt se takto stane méně rozpustný a dochází k lepší sorpci [36].

8.1.2 Extrakce tuhou fází s použitím nanovláken

Extrakce tuhou fází s použitím nanovláken (PFSPE) spočívá v použití nanovláken jako sorbentu. Taková vlákna mohou být buď z polystyrenu, nebo polypyrolu [38, 39]. Tato vlákna jsou nejčastěji vpravena do špičky plastové stříkačky. Vzorek se nasaje a analyt se zachytí na sorbentu. Poté se zatlačí na píst stříkačky a zbytková matrice je vytlačena. Následně se nasaje vhodný eluent, ten uvolní analyt ze sorbentu, poté se tlakem pístu analyt vytlačí s rozpouštědlem [40].

Metoda se používá u postupů, kde je nutný velmi citlivý přístup odebrání a úpravy vzorku. To může být například postup, kde se užívá derivatizace s užitím silných kyselin, které mohou ovlivnit chromatografické měření. S použitím PFSPE je možno takto vzniklý derivatizovaný analyt z kyselého prostředí odstranit [41].

Metoda byla použita při extrakci slinného kortizolu, kdy vzniká derivát schopný vyzařovat fluorescenční záření za použití kyseliny sírové, jako derivatizačního činidla. PFSPE se používá k vyselektování derivátu před měřením a k odstranění kyselé matrice [41].

8.2 Extrakce kapalina-kapalina

Při extrakci kapalina-kapalina (LLE) se používají dvě navzájem nemísitelná rozpouštědla a analyt přechází do toho rozpouštědla, ve kterém je více rozpustný [42]. Volba extrakčního činidla je opět na základě polariry. Přechod analytu mezi fázemi lze urychlit zvětšením plochy, nejčastěji třepáním. Extrakce se nejčastěji provádí v dělicí nálevce. Pro zakoncentrování analytu po vlastní extrakci je možné odpařit rozpouštědlo. Odpařování u steroidů se provádí buď pod vakuem, nebo v proudu dusíku [43, 44]. Zbytek po odpaření se poté rozpustí ve vhodném rozpouštědle a následuje buď samotná analýza, nebo další nutné úpravy (derivatizace) [44].

8.2.1 Podporovaná extrakce kapalina-kapalina

Podporovaná extrakce kapalinou (SLE) patří mezi klasickou LLE, kdy rozdíl je v tom, že celá extrakce probíhá v kolonce naplněné sorbentem (nejčastěji křemelinou). Tento sorbent má tu vlastnost, že vsákne vodný roztok do sebe a nepolární analyt ponechá na jeho povrchu. S použitím vhodného rozpouštědla následně dojde k eluování analytu. Metoda patří mezi LLE z důvodu, že v daný moment selekce jsou v kontaktu dvě nemísitelné kapalně fáze. Výhoda této metody spočívá ve značném snížení objemů rozpouštědel [45, 46]. Příkladem takového rozpouštědla je MTBE (methyl *tert*-butyl ether) [45].

8.3 Aplikace extrakčních metod

S užitím informací z kapitol (8.1-8.2.1) lze přejít na samotné extrakční techniky steroidů včetně kortizolu z biologických materiálů, jako jsou sliny. Úvodem je důležité zmínit chemické vlastnosti steroidů, zejména pro výběr vhodných sorbentů a rozpouštědel [35].

Steroidy jsou tvořeny z lipofilních (hydrofobních, nepolárních) steranových jader, tato jádra jsou na postranních řetězcích doplněna hydrofilní skupinou. S užitím těchto informací se dá říci, že jsou do určité míry rozpustné v organických rozpouštědlech a je možná extrakce z vodných prostředí. Tato skutečnost je spojována zejména s LLE. Pro extrakci steroidů metodou SPE je důležité kromě volby vhodného rozpouštědla, zvolit vhodný sorbent, který musí interagovat s analytem. Pro steroidy se nabízejí nepolární sorbenty, jako je oxid křemičitý potažený oktadecylem (C18), oktylem (C8), phenyl-hexylem (PN) a další [35]. Mezi často užívaná rozpouštědla patří zejména hexan, cyklohexan, dichlormethan, chloroform, ethylacetát [35].

Pro analýzu kortizolu ze slin pomocí chromatografických technik (UV, fluorescenční, hmotnostní detekce) se jako extrakční metody užívá jak SPE, SPME, PFSPE, LLE a SLE. Pro jednotlivé chromatografické metody budou uvedeny konkrétní extrakční techniky (tabulka 4; str.41), nutno ale na úvod zmínit nejčastěji užívané sorbenty a rozpouštědla. Jako sorbent je nejčastěji užíván C18, C8 a sorbent zvaný HLB (hydrofilní – lipofilní rovnováha) [47, 48, 49, 50]. Tento sorbent má jak polární, tak nepolární funkční skupinu, tato vlastnost umožňuje schopnosti interakce s nepolárními i polárními organickými molekulami [51]. Pro kortizol jsou nejčastější volbou u jednotlivých extrakčních technik tato rozpouštědla:

- LLE: dichlormethan, ethylacetát [47] [52],
- SPE: methanol, diethyléter, methanol/kyselina mravenčí [47, 48, 53],
- SPME 1% kyselina octová/methanol (50/50) [54],
- PFSPE methanol [41],
- SLE: methyl *tert*-butyl ether [45].

9 Poextrakční úpravy

Po získání extraktu následuje několik úprav před následným měřením. Mezi tyto úpravy patří odpaření rozpouštědla, rozpuštění vysušeného zbytku po extrakci a případná derivatizace [35].

9.1 Odpaření

Mezi nejčastěji užívané techniky patří odpařovací techniky za použití proudu dusíku (např. při 40 °C) [35, 48, 52, 55].

9.2 Rozpouštění

Před aplikací do chromatografu je nutné vysušený extrakt rozpustit, často užívaným rozpouštědlem je methanol, ethanol, acetonitril/voda, nebo samotná mobilní fáze [35, 47, 48, 52].

9.3 Derivatizace

Některé metody mají svá specifika pro strukturu stanovované látky, takovým specifikem může být těkavost, teplotní stabilita, případně schopnost vyzařovat fluorescenční záření [41, 56, 57]. Je známo, že steroidy tyto skutečnosti nesplňují [35]. V takovém případě nastupuje derivatizace, což je metoda (postup), kdy se získá chemický derivát analytu, který splňuje podmínky pro analýzu. Derivatizace se nejčastěji používá u plynové chromatografie, nebo u metod, kde je principem měření fluorescenční záření. U plynové chromatografie se derivatizace provádí zejména pro získání derivátu analytu, který je těkavý a při nástřiku do kolony je zplyněn. Nevýhodou těchto reakcí je časová náročnost a udržování stálé teploty po dobu derivatizační reakce [56, 57]. Zjednodušením derivatizačních podmínek se naskýtá užití derivatizace v mikrovlnném poli - MAD na principu vysílání mikrovlnných vln, které mají funkci udržování reakčních teplot. Oproti klasickým zahřívacím metodám (vodní lázeň) má tu výhodu, že zahřívá celý systém současně, snižuje reakční časy a je automatizovatelná. Pro derivatizaci steroidů se tento čas může snížit až na 60 s, v závislosti na reagentech vystupujících v reakci [58, 59]. Původní časy a teploty pro klasické derivatizační techniky pro steroidní látky se řádově pohybují od 30 minut až do 24 hodin za použití různých teplot [57, 60].

Pro plynovou chromatografii se u steroidních látek k derivatizaci používají nejčastěji silylační činidla za vzniku těkavých esterů. Významným silylačním činidlem je *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoracetamid (MSTFA) s jodidem amonným (NH₄I), dithioerythritolem a trimethylsilylchloridem (TMSC) [60, 61].

V současné době není dostupná žádná literatura popisující plynovou chromatografii po předchozí derivatizaci kortizolu izolovaného ze slin. Jsou však popsány metody pro stanovení kortizolu v séru. Například reakce kortizolu s methoxyaminem hydrochloridem v pyridinu (30 min, 100 °C), kdy po proběhnutí následovala reakce s BSA: *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (2 h, 100 °C) [62]. Další metoda je s užitím kyseliny heptafluorobutyrové kyseliny-HFBA, kdy reakce probíhá 4 h, při pokojové teplotě [63].

10 Chromatografické metody

Principem je rozdělení složek vzorku mezi dvě fáze: stacionární a mobilní. Obě fáze mají svá specifika (např. polaritu), která určují integritu s analyty. Mobilní fáze má funkci unášení složek a stacionární fáze zadržování složek. Díky struktuře analytu a struktuře fází jsou některé analyty zadržovány déle než druhé, tímto způsobem dochází k separaci složek a jejich následnou identifikací a kvantifikací. Tyto separace probíhají nejčastěji v separačních kolonách nebo v plošném uspořádání (tenkovrstvá chromatografie). Pro steroidní látky se nejčastěji volí adsorpční kapalinová chromatografie s nepolárními sorbenty. Jednotlivé druhy fází (stacionární fáze a mobilní fáze) jsou vypsány a okomentovány v kapitolách níže a v tabulce 4 (str.41) [31, 32, 35].

Pro analýzu kortizolu ve slinách jsou dostupné následující chromatografické techniky:

- vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti (HPLC/UV) [47, 48],
- vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD) [41],
- vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí v tandemovém uspořádání (HPLC/MS-MS) [45, 55],
- tenkovrstvá chromatografie (TLC) [64],
- imunochromatografie [65].

10.1 Kapalinová chromatografie

Pokud užíváme mobilní fázi v kapalném skupenství, hovoříme o kapalinové chromatografii. Princip metody je na základě ustanovené rovnováhy analytu mezi mobilní a stacionární fází, kdy na základě těchto rozdílů dochází k separaci složek [31, 66]. Často užívanými mobilními fázemi pro separaci kortizolu v systému HPLC jsou acetonitril/voda v poměru 70/30, nebo acetonitril/methanol (30/70) [67, 68]. Pro separaci kortizolu se používá nejčastěji stacionární fáze s polymerně vázaným oktadecylem nebo oktylem na oxidu křemičitém [35 44].

Pro analýzu kortizolu chromatografickými technikami jsou používány tyto druhy detekce:

- UV – spektrofotometrie v ultrafialové oblasti světla [47] [48]

Ultrafialová absorpční spektrofotometrie je technika založená na měření útlumu elektromagnetického záření absorpční látkou. Tento útlum je nejčastěji znám jako absorbance, veličina, která udává kolik světla je pohlceno analytem (kortizol) [69 70].

- FLD – fluorescenční detekce

Základním předpokladem pro detekci je vznik fluorescenčního záření. Toto záření vzniká po excitaci elektronů do vyšších hladin a jejich návratu do původních hladin. Důležitým předpokladem pro odlišení fluorescence od dalších typů záření je délka doby záření, která je v řádech 10^{-8} s až 10^{-6} s [71]. Samotné steroidní látky nejsou schopny fluoreskovat, proto je nutná příprava derivátů kortizolu, které vykazují fluorescenci. Pro přípravu takového derivátu se používá například kyselina sírová [41, 72].

- MS – hmotnostní detekce

Principem hmotnostní spektrometrie je interakce nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace) [73]. Často užívaným iontovým zdrojem pro steroidní analýzu pomocí LC je zejména elektrosprejová ionizace (ESI) a u GC elektronová ionizace (EI) [49]. U hmotnostních analyzátorů, kde dochází k separaci iontů na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z) se nejčastěji používají analyzátory kvadrupólové, trojitě kvadrupólové (QqQ), kvadrupólové iontové pasti (QTrap), tandemové uspořádání (MS/MS) [56, 73].

10.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tento druh chromatografie má stejný princip jako předešlé chromatografické techniky, kdy opět dochází k rovnovážnému ustanovování analytu mezi mobilní a stacionární fází. Rozdíl oproti předešlým metodám je, že dělení směsi probíhá na tenké ploše pokryté sorbentem. Tenkovrstvá chromatografie se nejčastěji používá pro kvalitativní analýzu [74].

Pro steroidy se užívá jako stacionární zejména silikagel a mobilní fáze jsou nejčastěji chloroform/ethanol/voda. Pro zvýraznění vizualizace se používá kyselina sírová, která vytvoří v místech kontaktu s kortizolem hnědé/spálené skvrny. Podle vzdálenosti těchto skvrn od startu se určí daný typ analytu. Pokud se tyto skvrny ozáří UV lampou, dojde k vyzáření fluorescence, která umožní lepší odečet výsledků separovaných analytů. Metoda se používá zejména pro kvalitativní analýzu [64].

10.3 Imunochromatografické metody

Jedná se o imunoanalytické metody, které spočívají v přítomnosti antigenu a protilátky za vzniku imunokomplexů. U této metody dochází k dělení látek na tuhé fázi nasycené kapalinou. Tuhá fáze je nejčastěji tvořena celulózou. Analýzy jsou hojně prováděny ve formě stripů a kazet. Tyto kazety jsou tvořeny startovací ploškou, konjugační, testovací a kontrolní zónou. [75].

V případě kortizolu se jedná o typ stripu, který je v tzv. kompetitivním uspořádání. V místě nanášeného analytu jsou protilátky značené nejčastěji koloidním zlatem, tyto protilátky jsou specifické proti analytu (kortizol). V místě jejich střetu dojde ke vzniku imunokomplexu, který je dál unášen směrem k testovací zóně. Zde je pevně zafixovaná syntetická molekula antigenu (syntetický kortizol). Pokud jsou veškeré molekuly stanovovaného antigenu vyvázány na značených protilátkách zlatem, v testovací zóně nedojde k barevné indikaci. V případě tohoto stavu lze říci, že vzorek je pozitivní. Kortizol se v tomto uspořádání chová jako antigen, jako protilátka se užívá albumin značený nanočásticemi ze zlata, test zabírá pouhých 10 min, nejnižší koncentrace na průkaz (v imunologii hodnota zvaná cut off) činí 10 ng/ml [65].

10.4 Plynová chromatografie

Analýza slinného kortizolu pomocí plynové chromatografie není v současné době dostupná, přesto jsou dohledatelné informace pro stanovení kortizolu v séru a moči. S použitím těchto informací je možná budoucí analýza kortizolu ve slinách s použitím plynové chromatografie. Níže jsou uvedeny základní charakteristiky pro sérum, zejména pak v tabulce 5 na str. 43 [63, 76].

Plynová chromatografie (GC) nese název podle používané mobilní fáze, kdy nosičem je plyn. Princip je založen na ustanovení rovnovážné koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fází [32, 66]. Jako nosné plyny se nejčastěji užívají helium a dusík [32]. Příkladem stacionární fáze může být dimethylpolysiloxan, 5 % phenyl s 95 % methylpolysiloxanem, methylsiloxan [61]. Odlišnost od kapalinové chromatografie (LC) je v použité mobilní fázi, zplynění vzorku při nástřiku, vysokých teplotách a délkách kolon, které u GC dosahují v řádech desítek metrů (až 30 m), kdežto u LC jsou v řádech centimetrů (10-30) [77]. Plynová chromatografie je nejčastěji spojována hmotnostní detekcí (MS) s elektronovou ionizací. Nejčastěji používané jsou hmotnostní analyzátory kvadrupólové jak v jednoduchém, tak v tandemovém uspořádání a TOF [56, 66].

10.5 Aplikace metod

V tabulce 4 jsou uvedeny dostupné metody pro stanovení kortizolu ve slinách pomocí kapalinové chromatografie a v tabulce 5 pro plynovou chromatografii pro stanovení v séru. Jako hodnotící kritérium kvality provedené metody je uveden limit detekce, patřící mezi hodnotící kritérium použité metody. Definice tohoto parametru zní: jedná se o nejnižší koncentrace analytu, která může být danou metodou detekována na stanovené úrovni spolehlivosti [78].

Tabulka 4 – Přehled metod pro stanovení kortizolu ze slin

KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE SE SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKCÍ					
Množství vzorku pro zpracování	Extrakce	Derivatizace	Metoda	LOD	Zdroj
1 ml	LLE dichlormethan	-	HPLC/ UV kolona: C18 mobilní fáze: izokratická; acetonitril/voda (35/65) $\lambda = 240$ nm	1 ng/ml	[47]
1 ml	SPE C18 methanol	-	HPLC/UV kolona: C18 mobilní fáze: izokratická; acetonitril/voda (35/65) $\lambda = 240$ nm	3 ng/ml	[47]
2 ml	SPE C18 diethyléter	-	HPLC/UV kolona: HS F5 mobilní fáze: izokratická; acetonitril/voda (27/73) $\lambda = 254$ nm	40 pg/ml	[48]
KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S FLUORIMETRICKOU DETEKCÍ					
Množství vzorku pro zpracování	I Extrakce	Derivatizace	II Extrakce	Metoda	LOD
2 ml	LLE ethylacetát	I. kyselina sírová/ethanol (70/30); 30 s vortex II. inkubace 70 °C; 2 min	PFSPE polystyren methanol	HPLC/ FLD kolona: C18 mobilní fáze: izokratická; roztok acetátu amonného/methanol (30/70) + kyselina fosforečná (pH= 5) $\lambda = 370$ a 380 nm	10 ng/ml
KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ					
Množství vzorku pro zpracování	Extrakce	Derivatizace	Metoda	LOD	Zdroje
2 ml	LLE ethylacetát	-	HPLC-MS/MS kolona: C18 mobilní fáze: izokratická; 2 mM roztok octan amonný/0,1 % kyselina mravenčí + 2 mM roztok methanol/octan amonný	0,1 ng/ml	[52]

3 ml	SLE MTBE	-	HPLC-MS/MS kolona: C18 mobilní fáze: izokratická; ACN/0,01 % kyselina mravenčí (40/60)	0,2 ng/ml	[45]
200 µl	SPME (DVB) 1 % kyselina octová/methanol (50/50)	-	HPLC-MS kolona: C8 mobilní fáze: izokratická; 1 % kyselina octová/methanol (50/50)	5 pg/ml	[54]
1 ml	I. SPE HLB methanol II. SPE (C18) methanol/0,1 % kyselina mravenčí	-	HPLC-MS/MS kolona: C18 mobilní fáze: gradientová; methanol/kyselina mravenčí	11 pg/ml	[53]
100 µl	LLE dichlormethan	-	HPLC-MS/MS kolona: C18 mobilní fáze: gradientová; voda/methanol	25 pg/ml	[79]
1 ml	SPE HLB methanol	-	UHPLC-MS/MS kolona: C18 mobilní fáze: gradientová: I roztok H ₂ O + 0,1 % kyselina mravenčí II roztok methanolu + 0,1 % kyselina mravenčí	5,1 pg/ml	[80]
200 µl	SPE C-18 0,1 % kyselina mravenčí + ACN	HMP + TFA + ETHANOL (60 °C, 60 min)	HPLC/MS-MS kolona: C18 mobilní fáze: gradientová; I roztok 0,1 % kyselina mravenčí + voda II roztok 0,1 % kyselina mravenčí + ACN	2 pg/ml	[81]

TENKOVSTVÁ CHROMATOGRRAFIE

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Zdroje
nH ₂	chloroform/ethanol (95/5), závěrem postřík H ₂ SO ₄	fluorescenční záření	[64]
diol	chloroform	denzitometricky	

Tabulka 5 – Přehled metod pro stanovení kortizolu pomocí plynové chromatografie v séru

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE				
Úprava vzorku	Extrakce	Derivatizace	Metoda	Zdroje
pH=1,5 0,5 % kyselina fosforečná	SPE HLB methanol/voda (70:30)	aceton + HFBA (4 h, pokojová teplota)	GC/MS nosný plyn: helium	[63]
pH=9,5 1 M NaOH + 0,2 M uhličitanový pufr	LLE <i>n</i> -hexan/ethylacetát (70/30)	MSTFA + NH ₄ I + dithioerythritol (30 min, 60 °C)	GC-Q-MS nosný plyn: helium	[76]

ZÁVĚR

Kortizol patří mezi hormony s rozsáhlou působností. Jeho působení představuje výraznou součást metabolických drah, buněk i celých tkání. Pomáhá zvyšovat nervovou aktivitu v nebezpečí, zprostředkovává zisk energie, umožňuje zvládat stres, aktivuje imunitní systém, je součástí syntézy důležitých enzymů hormonů a proteinů. V současné době, kdy je téměř každý neustále vystaven stresovým situacím, nekvalitnímu stravování, nedostatku odpočinku, dochází ke značným patologickým problémům souvisejícím s kortizolem, které mohou mít fatální následky při pozdní diagnostice.

Proto se přistupuje k novým inovativním metodám jako je analýza ze slin, kterou ulehčuje několik aspektů, jako je například odebírání vzorků bez nutné přítomnosti zdravotnického personálu, přítomnost pouze volného kortizolu ve slinách bez globulinů, který odráží funkčnost nadledvin, značná koncentrační stabilita kortizolu po delší časový úsek při různých teplotách a téměř žádná speciální úprava slin před selekcí kortizolu ze slin extrakčními technikami.

Jelikož sliny jsou biologický materiál, který obsahuje velké množství interferujících analytů, pro jejich odstranění se používají extrakční techniky. Mezi nejčastěji užívané metody extrakce patří extrakce tuhou fází a extrakce kapalina-kapalina. Obě zmíněné extrakční techniky jsou vhodné, neboť detekční limity dosahovaly k nižším koncentračním hodnotám, než jsou referenční hodnoty kortizolu ve slinách. Jako další možností je použití speciálních technik pro extrakci, jako je SPME, PFSPE a SLE.

K vlastnímu stanovení kortizolu ze slin patří ve velké míře chromatografické metody. Mezi hlavní typy pro stanovení kortizolu ve slinách je zejména kapalinová chromatografie s UV a hmotnostní detekcí. S novodobým využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je možno dosáhnout koncentrací až v řádech desetin pg/ml. Jako hlavní výhoda těchto metod je vysoká specificita, kdy s použitím vhodných kolon a mobilních fází je možno dosáhnout opravdu kvalitních výsledků.

SEZNAM ZDROJŮ A LITERATURY

- [1] TURPEINEN, Ursula a Esa HÄMÄLÄINEN. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2013, **27**(6), 795–801. ISSN 1521690X. Dostupné z: doi:10.1016/j.beem.2013.10.008
- [2] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Hydrocortisone, CID=5754, Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrocortisone>.
- [3] WISHART DS, KNOX C, GUO AC, SHRIVASTAVA S, HASSANALI M, STOTHARD P, CHANG Z, WOOLSEY J. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006.
- [4] Nadledviny [online], 2019. Maxdorf [cit. 2019-12-12]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/nadledviny>.
- [5] TOMAS, Cara, Julia NEWTON a Stuart WATSON. A Review of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Chronic Fatigue Syndrome. *ISRN Neuroscience* [online]. 2013, **2013**, 1–8. ISSN 2314-4661. Dostupné z: doi:10.1155/2013/784520
- [6] POZO, Oscar J, Josep MARCOS, Andreu FABREGAT, Rosa VENTURA, Gregori CASALS, Paula AGUILERA, Jordi SEGURA a Jordi TO-FIGUERAS. Adrenal hormonal imbalance in acute intermittent porphyria patients: results of a case control study. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2014, **9**(1), 54. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-9-54
- [7] FINDLING, James W. a Hershel RAFF. Screening and Diagnosis of Cushing’s Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* [online]. 2005, **34**(2), 385–402. ISSN 08898529. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecl.2005.02.001
- [8] LEE, Do Yup, Eosu KIM a Man Ho CHOI. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports* [online]. 2015, **48**(4), 209–216. ISSN 1976-6696. Dostupné z: doi:10.5483/BMBRep.2015.48.4.275
- [9] SHERIFF, Michael J., Ben DANTZER, Brendan DELEHANTY, Rupert PALME a Rudy BOONSTRA. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* [online]. 2011, **166**(4), 869–887. ISSN 0029-8549, 1432-1939. Dostupné z: doi:10.1007/s00442-011-1943-y
- [10] OPREA A, Nicolas C. G. BONNET, Olivier POLLÉ a Philippe A. LYSY. Novel insights into glucocorticoid replacement therapy for pediatric and adult adrenal insufficiency. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* [online]. 2019, **10**, 204201881882129. ISSN 2042-0188, 2042-0196. Dostupné z: doi:10.1177/2042018818821294
- [11] FERRARA, Giovanna, Maria PETRILLO, Teresa GIANI, Edoardo MARRANI, Cesare FILIPPESCHI, Teresa ORANGES, Gabriele SIMONINI a Rolando CIMAZ. Clinical Use and Molecular Action of Corticosteroids in the Pediatric Age. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(2), 444. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20020444

- [12] LAUREN Thau; SANDEEP Sharma. Physiology, Cortisol. [Updated 2019 Feb 15]. In: StatPearls [Inter-net]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/?report=reader#!po=93.7500>.
- [13] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Thymosin, CID=44286042, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymosin> (accessed on Feb. 11, 2020).
- [14] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Interleukin-1 be-ta, NCBI Protein=P01584, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P01584> (accessed on Feb. 11, 2020).
- [15] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CD1D - CD1d molecule (human), NCBI Gene=912, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/CD1D/human> (accessed on Feb. 11, 2020).
- [16] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. NCBI Gene=16153, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/Il10/mouse> (accessed on Feb. 11, 2020).
- [17] HAMMAD S. Chaudhry; GURDEEP Singh. Cushing Syndrome. [Updated 2019 Jan 23]. In: StatPearls [In-ternet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470218/>.
- [18] LJUBIJANKIĆ, Nevzeta, Ranka POPOVIĆ-JAVORIĆ, Sabiha ŠĆETA, Aida ŠAPČANIN, Ismet TAHIROVIĆ a Emin SOFIĆ. Daily Fluctuation of Cortisol in the Saliva and Serum of Healthy Persons. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* [online]. 2008, **8**(2), 110–115. ISSN 1840-4812, 1512-8601. Dostupné z: doi:10.17305/bjbms.2008.2962
- [19] BADRICK, Tony, Stephanie GAY, Euan J. MCCAUGHEY a Andrew GEORGIU. External Quality Assessment beyond the analytical phase: an Australian perspective. *Biochemia Medica* [online]. 2017, 73–80. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2017.009
- [20] FRANCAVILLA, Vincenzo Cristian, Francesco VITALE, Marcello CIACCIO, Tindaro BONGIOVANNI, Claudia MAROTTA, Rosalia CALDARELLA, Lorenzo TODARO, Maurizio ZARCONE, Roberto MURATORE, Chiara BELLIA, Giuseppe FRANCAVILLA a Walter MAZZUCCO. Use of Saliva in Alternative to Serum Sampling to Monitor Biomarkers Modifications in Professional Soccer Players. *Frontiers in Physiology* [online]. 2018, **9**, 1828. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2018.01828
- [21] POLL, Eva-Maria, Ilonka KREITSCHMANN-ANDERMAHR, Yvonne LANGEJUERGEN, Sven STANZEL, Joachim Michael GILSBACH, Axel GRESSNER a Eray YAGMUR. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2007, **382**(1–2), 15–19. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2007.03.009
- [22] ATKINSON, Kelly R., Kim R. LO, Steve R. PAYNE, John S. MITCHELL a John R. INGRAM. Rapid saliva processing techniques for near real-time analysis of salivary steroids and protein. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2008, **22**(6), 395–402.

- [23] INDER, Warrick J., Goce DIMESKI a Anthony RUSSELL. Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clinical Endocrinology* [online]. 2012, **77**(5), 645–651. ISSN 03000664. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04508.x
- [24] BELLAGAMBI, Francesca G., Tommaso LOMONACO, Pietro SALVO, Federico VIVALDI, Marie HANGOUËT, Silvia GHIMENTI, Denise BIAGINI, Fabio DI FRANCESCO, Roger FUOCO a Abdelhamid ERRACHID. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **124**, 115781. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115781
- [25] © Copyright 2020, Oasis Diagnostics® Zařízení VersiSal. [online]. Dostupné z: <https://4saliva.com/products/versisal/>
- [26] © 2020 OraSure Technologies, Inc. Zařízení Intercept. [online]. Dostupné z: <https://www.orasure.com/products-substance/products-substance-abuse-intercept.asp>
- [27] SOARES NUNES, Lazaro Alessandro, Sayeeda MUSSAVIRA a Omana SUKUMARAN BINDHU. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica* [online]. 2015, **25**(2), 177–192. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2015.018
- [28] GARDE, A. H. a Å. M. HANSEN. Long-term stability of salivary cortisol. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2005, **65**(5), 433–436. ISSN 0036-5513, 1502-7686. Dostupné z: doi:10.1080/00365510510025773
- [29] KEIL, Margaret F. Salivary Cortisol: A Tool for Biobehavioral Research in Children. *Journal of Pediatric Nursing* [online]. 2012, **27**(3), 287–289. ISSN 08825963. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedn.2012.02.003
- [30] GRÖSCHL, M. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids* [online]. 2001, **66**(10), 737–741. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-128X(01)00111-8
- [31] FREEMAN W.H. Exploring chemical analysis. 4th ed. New York s. 501-503. ISBN 978-1-4292-0147-6.
- [32] COSKUN, Ozlem. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. Northern Clinics of Istanbul [online]. 2016 [vid. 2020-04-18]. ISSN 21484902. Dostupné z: doi:10.14744/nci.2016.32757
- [33] GONZALO-LUMBRERAS, R., D. PIMENTEL-TRAPERO, a R. IZQUIERDOHORNILLOS, Solvent and solid-phase extraction of natural and synthetic anabolic steroids in human urine. *Journal of Chromatography B*, 2001. 754(2): s. 419-425. nedatováno.
- [34] DIEHL, D.M. EXTRACTION | Sorptive Extraction Methods. In: *Encyclopedia of Separation Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2007 [vid. 2020-04-19], s. 1–7. ISBN 978-0-12-226770-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012226770-3/10678-8

- [35] MAKIN, Hugh L. J., John W. HONOUR, Cedric H. L. SHACKLETON a William J. GRIFFITHS. General Methods for the Extraction, Purification, and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. In: Hugh L. J. MAKIN a D.B. GOWER, ed. *Steroid Analysis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010 [vid. 2020-04-18], s. 163–282. ISBN 978-1-4020-9774-4. Dostupné z: doi:10.1023/b135931_3
- [36] PAWLISZYN, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2000, **38**(7), 270–278. ISSN 0021-9665, 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/38.7.270
- [37] MADEJ, Katarzyna a Wojciech PIEKOSZEWSKI. Modern Approaches to Preparation of Body Fluids for Determination of Bioactive Compounds. *Separations* [online]. 2019, **6**(4), 53. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations6040053
- [38] MA, Lei, Xiaoyan SHEN a Xuejun KANG. Solid-Phase Extraction with Packed-Fiber is a Biological Sample Preparation Tool for Neuro-Active Molecule Detection. In: Oliver THEWS, Joseph C. LAMANNA a David K. HARRISON, ed. *Oxygen Transport to Tissue XL* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018 [vid. 2020-04-22], *Advances in Experimental Medicine and Biology*, s. 423–430. ISBN 978-3-319-91285-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-91287-5_68
- [39] ZHAO, Renshan, Lanling CHU, Yu WANG, Yuan SONG, Ping LIU, Chen LI, Jingjing HUANG a Xuejun KANG. Application of packed-fiber solid-phase extraction coupled with GC–MS for the determination of short-chain fatty acids in children’s urine. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2017, **468**, 120–125. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2017.02.016
- [40] LIU, Zhiyong, Xuejun KANG a Fang FANG. Solid phase extraction with electrospun nanofibers for determination of retinol and α -tocopherol in plasma. *Microchimica Acta* [online]. 2010, **168**(1–2), 59–64. ISSN 0026-3672, 1436-5073. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-009-0263-y
- [41] CHEN, Li-Qin, Xue-Jun KANG, Jing SUN, Jian-Jun DENG, Zhong-Ze GU a Zu-Hong LU. Application of nanofiber-packed SPE for determination of salivary-free cortisol using fluorescence precolumn derivatization and HPLC detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(15), 2369–2375. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201000071
- [42] HOUCK, Max M. a Jay A. SIEGEL. Separation Methods. In: *Fundamentals of Forensic Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2015 [vid. 2020-04-18], s. 121–151. ISBN 978-0-12-800037-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800037-3.00006-6
- [43] LIU, Jian, Xuemei QIU, Daoming WANG, Yantao LI, Yang ZONG, Yichen LIU, Yue ZHANG, Ping YANG, Yong ZUO, Huanming YANG, Jian WANG, Yutao DU a Jin ZI. Quantification of 10 steroid hormones in human saliva from Chinese adult volunteers. *Journal of International Medical Research* [online]. 2018, **46**(4), 1414–1427. ISSN 0300-0605, 1473-2300. Dostupné z: doi:10.1177/0300060517752733

- [44] LUDOVICI, Matteo, Cristiano IALONGO a Emanuela CAMERA. Principles, current applications, and future perspectives of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical chemistry. In: *Liquid Chromatography* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2020-04-19], s. 727–751. ISBN 978-0-12-805392-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805392-8.00022-0
- [45] CHEN, Binbin, Haiyan LYU, Xiangzhen XU a Chen WANG. Simultaneous quantification of cortisol and cortisone in serums and saliva from depressive patients by supported liquid extraction coupled to HPLC–MS/MSs. *Acta Chromatographica* [online]. 2020, **32**(4), 269–275. ISSN 2083-5736. Dostupné z: doi:10.1556/1326.2020.00733
- [46] RAMESH, B., N. MANJULA, S.R. BIJARGI, V.U.M. SARMA a P. Sita DEVI. Comparison of conventional and supported liquid extraction methods for the determination of sitagliptin and simvastatin in rat plasma by LC–ESI–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2015, **5**(3), 161–168. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2014.11.003
- [47] DZIURKOWSKA, Ewelina a Marek WESOŁOWSKI. Evaluation of Two Techniques for Extraction of Cortisol from Human Saliva. *Chromatographia* [online]. 2009, **70**(5–6), 769–774. ISSN 0009-5893, 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-009-1239-0
- [48] DE PALO, Elio F., Giorgia ANTONELLI, Arianna BENETAZZO, Maddalena PREARO a Rosalba GATTI. Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2009, **405**(1–2), 60–65. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2009.04.006
- [49] HAWLEY, James M. a Brian G. KEEVIL. Endogenous glucocorticoid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in routine clinical laboratories. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2016, **162**, 27–40. ISSN 1879-1220. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2016.05.014
- [50] RAUL, Jean-Sébastien, Vincent CIRIMELE, Bertrand LUDES a Pascal KINTZ. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clinical Biochemistry* [online]. 2004, **37**(12), 1105–1111. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.02.010
- [51] JEONG, Yoonah, Andreas SCHÄFFER a Kilian SMITH. Equilibrium partitioning of organic compounds to OASIS HLB® as a function of compound concentration, pH, temperature and salinity. *Chemosphere* [online]. 2017, **174**, 297–305. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.116
- [52] JENSEN, Marie Aarrebo, Åse Marie HANSEN, Peter ABRAHAMSSON a Asger W. NØRGAARD. Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011, **879**(25), 2527–2532. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.07.005
- [53] ANTONELLI, Giorgia, Filippo CECCATO, Carlo ARTUSI, Mariela MARINOVA a Mario PLEBANI. Salivary cortisol and cortisone by LC–MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing’s syndrome. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **451**, 247–251. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2015.10.004

- [54] KATAOKA, Hiroyuki, Eriko MATSUURA a Kurie MITANI. Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2007, **44**(1), 160–165. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2007.01.023
- [55] JENSEN, Marie A., Leen MORTIER, Eitetsu KOH, Brian KEEVIL, Sirpa HYTTINEN a Åse M. HANSEN. An interlaboratory comparison between similar methods for determination of melatonin, cortisol and testosterone in saliva. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2014, **74**(5), 454–461. ISSN 0036-5513, 1502-7686. Dostupné z: doi:10.3109/00365513.2014.900693
- [56] STASHENKO, Elena a Jairo REN. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: Xinghua GUO, ed. *Advances in Gas Chromatography* [online]. B.m.: InTech, 2014 [vid. 2020-04-19]. ISBN 978-953-51-1227-3. Dostupné z: doi:10.5772/57492
- [57] HILL, M., V. HÁNA, M. VELÍKOVÁ, A. PAŘÍZEK, L. KOLÁTOROVÁ, J. VÍTKŮ, T. ŠKODOVÁ, M. ŠIMKOVÁ, P. ŠIMJÁK, R. KANCHEVA, M. KOUCKÝ, Z. KOKRDOVÁ, K. ADAMCOVÁ, A. ČERNÝ, Z. HÁJEK, M. DUŠKOVÁ, J. BULANT a L. STÁRKA. A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Physiological Research* [online]. 2019, 179–207. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934124
- [58] BOWDEN, John A., Dominic M. COLOSI, Whitney L. STUTTS, Diana C. MORAMONTERO, Timothy J. GARRETT a Richard A. YOST. Enhanced Analysis of Steroids by Gas Chromatography/Mass Spectrometry using Microwave-Accelerated Derivatization. *Analytical Chemistry* [online]. 2009, **81**(16), 6725–6734. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac900663c
- [59] SÖDERHOLM, Sandra L., Markus DAMM a C. Oliver KAPPE. Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Molecular Diversity* [online]. 2010, **14**(4), 869–888. ISSN 1381-1991, 1573-501X. Dostupné z: doi:10.1007/s11030-010-9242-9
- [60] SPARKMAN, O. David, Zeldia E. PENTON a Fulton G. KITSON. Steroids. In: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide* [online]. B.m.: Elsevier, 2011 [vid. 2020-04-21], s. 403–406. ISBN 978-0-12-373628-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-373628-4.00034-4
- [61] WU, Zhexue, Jong Cheol SHON a Kwang-Hyeon LIU. Mass Spectrometry-based Lipidomics and Its Application to Biomedical Research. *Journal of Lifestyle Medicine* [online]. 2014, **4**(1), 17–33. ISSN 2234-8549, 2288-1557. Dostupné z: doi:10.15280/jlm.2014.4.1.17
- [62] SHIBASAKI, Hiromi, Izumi ARAI, Takashi FURUTA a Yasuji KASUYA. Simultaneous determination of cortisol and cortisone in human plasma by stable-isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1992, **576**(1), 47–52. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(92)80173-N

- [63] KAWAGUCHI, Migaku a Akiko TAKATSU. Development of a Candidate Reference Measurement Procedure for the Analysis of Cortisol in Human Serum Samples by Isotope Dilution-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* [online]. 2009, **25**(8), 989–992. ISSN 0910-6340, 1348-2246. Dostupné z: doi:10.2116/analsci.25.989
- [64] BHAWANI, S.A, O SULAIMAN, R HASHIM a M.N IBRAHIM. Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2010, **9**(3) [vid. 2020-04-19]. ISSN 1596-9827, 1596-5996. Dostupné z: doi:10.4314/tjpr.v9i3.56293
- [65] NARA, Seema, Vinay TRIPATHI, Harpal SINGH a Tulsidas G. SHRIVASTAV. Colloidal gold probe based rapid immunochromatographic strip assay for cortisol. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, **682**(1–2), 66–71. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.09.041
- [66] HOUCK, Max M. a Jay A. SIEGEL. Separation Methods. In: *Fundamentals of Forensic Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2015 [vid. 2020-04-18], s. 121–151. ISBN 978-0-12-800037-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800037-3.00006-6
- [67] SUMINA, E. G., S. N. SHTYKOV, O. N. SOROKINA a V. Z. UGLANOVA. Liquid chromatography of some steroid hormones in aqueous-organic, micellar, and cyclodextrin mobile phases. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2014, **69**(10), 1009–1016. ISSN 1061-9348, 1608-3199. Dostupné z: doi:10.1134/S1061934814100153
- [68] NOWAKOWSKA, Joanna, Piotr PIKUL, Krzesimir CIURA a Jakub PIOTROWICZ. A simple TLC and HPTLC method for separation of selected steroid drugs. *Open Chemistry* [online]. 2013, **11**(8) [vid. 2020-04-19]. ISSN 2391-5420. Dostupné z: doi:10.2478/s11532-013-0258-8
- [69] DEHGHANI MOHAMMAD ABADI, Malihe, Narges ASHRAF, Mahmoud CHAMSAZ a Farzaneh SHEMIRANI. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. *Talanta* [online]. 2012, **99**, 1–12. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.05.027
- [70] L.C. PASSOS, Marieta a M. Lúcia M.F.S. SARAIVA. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement* [online]. 2019, **135**, 896–904. ISSN 02632241. Dostupné z: doi:10.1016/j.measurement.2018.12.045
- [71] LICHTMAN, Jeff W a José-Angel CONCHELLO. Fluorescence microscopy. *Nature Methods* [online]. 2005, **2**(12), 910–919. ISSN 1548-7091, 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth817
- [72] SWEAT, M. L. Sulfuric Acid-Induced Fluorescence of Corticosteroids. *Analytical Chemistry* [online]. 1954, **26**(4), 773–776. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac60088a057
- [73] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR, Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab*, 2012. 20(41): s. 152-157. nedatováno.

- [74] CAI, Li. Thin Layer Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. 2014, **8**(1), 6.3.1-6.3.18. ISSN 19483430. Dostupné z: doi:10.1002/9780470089941.et0603s08
- [75] BÍLKOVÁ, Zuzana, Lucie KORECKÁ, UNIVERZITA PARDUBICE a CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ FAKULTA. *Vybraná laboratorní cvičení z imunoanalytických metod*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2013. ISBN str 69-73 978-80-7395-610-3.
- [76] TORIBIO-DELGADO, A. F., M. MAYNAR-MARINO, M. J. CABALLERO-LOSCOS, M. C. ROBLES-GIL, G. J. OLCINA-CAMACHO a J. I. MAYNAR-MARINO. Qualification and Quantification of Seventeen Natural Steroids in Plasma by GC-Q-MS and GC-IT-MS/MS. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2012, **50**(4), 349–357. ISSN 0021-9665, 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bms009
- [77] RAHMAN, Md. Musfiqur, A.M. ABD EL-ATY, Jeong-Heui CHOI, Ho-Chul SHIN, Sung Chul SHIN a Jae-Han SHIM. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. In: Veronica PINO, Jared L ANDERSON, Alain BERTHOD a Apryll M STALCUP, ed. *Analytical Separation Science* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015 [vid. 2020-04-19], s. 823–834. ISBN 978-3-527-67812-9. Dostupné z: doi:10.1002/9783527678129.assep024
- [78] SUCHÁNEK, M., *Kvalimetrie*. 20. *Vhodnost analytických metod pro daný účel*. 2015, Eurachem ČR, Praha. s. 63. nedatováno.
- [79] TURPEINEN, Ursula, Matti Juhani VÄLIMÄKI a Esa HÄMÄLÄINEN. Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2009, **69**(5), 592–597. ISSN 0036-5513, 1502-7686. Dostupné z: doi:10.1080/00365510902890331
- [80] BAKUSIC, Jelena, Siemon DE NYS, Matteo CRETA, Lode GODDERIS a Radu Corneliu DUCA. Study of temporal variability of salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS using a new atmospheric pressure ionization source. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 19313. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-55571-3
- [81] MAGDA, Balázs, Zoltán DOBI, Katalin MÉSZÁROS, Éva SZABÓ, Zoltán MÁRTA, Tímea IMRE a Pál T. SZABÓ. Charged derivatization and on-line solid phase extraction to measure extremely low cortisol and cortisone levels in human saliva with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2017, **140**, 223–231. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.03.028