

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení kortizolu ve slinách metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní  
detekcí

Diplomová práce

2022

Bc. Jindřich Suchý

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jindřich Suchý**  
Osobní číslo: **C20461**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Stanovení kortizolu ve slinách metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí**  
Téma práce anglicky: **Determination Of Cortisol In Saliva By Liquid Chromatography With Mass Detection**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Možnosti stanovení kortizolu v biologických vzorcích, především ve slinách, zaměření se na metody HPLC-MS.

Příprava biologického vzorku před vlastní analýzou.

### Experimentální část:

Možnosti odběru slin, příprava vzorku slin pro analýzu kortizolu metodou HPLC-MS.

Validace metody HPLC-MS pro stanovení kortizolu ve slinách.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Michal Kopčil**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení kortizolu ve slinách metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí 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 4. 5. 2022

Jindřich Suchý

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé práce prof. Mgr. Romanu Kand'árovi a konzultantovi Mgr. Michalu Kopčilovi za jejich ochotu, vstřícnost, odborné rady a čas věnovaný mé práci. Dále bych chtěl poděkovat všem dobrovolníkům, kteří mi poskytli vzorky slin pro tuto práci.

## **Anotace**

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení koncentrace kortizolu ve slinách. V první části jsou popsány vlastnosti kortizolu, jeho funkce v organismu, onemocnění s ním spojená a možnosti jeho stanovení v různých biologických materiálech. V experimentální části je popsán odběr vzorků slin, jejich příprava k analýze a postup optimalizace metody stanovení kortizolu.

## **Klíčová slova**

kortizol, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, sliny

## **Title**

Determination of cortisol in saliva by liquid chromatography with mass detection

## **Annotation**

This thesis deals with the development and optimization of liquid chromatography with a mass detection method for the determination of cortisol in saliva. The first part describes the properties of cortisol, its role in human organism and in diseases, and methods used for its determination in different biological materials. The experimental part describes sample collection and preparation for analysis, and optimization of the method for cortisol determination.

## **Keywords**

cortisol, liquid chromatography, mass spectrometry, saliva

# Obsah

Úvod.....	12
1 Teoretická část.....	13
1.1 Syntéza a vlastnosti kortizolu.....	13
1.1.1 Syntéza kortizolu .....	13
1.1.2 Vlastnosti a metabolismus kortizolu.....	15
1.2 Funkce kortizolu.....	16
1.3 Onemocnění způsobené nadbytkem nebo nedostatkem kortizolu .....	18
1.3.1 Nadbytek kortizolu .....	18
1.3.2 Nedostatek kortizolu .....	19
1.4 Stanovení kortizolu .....	20
1.4.1 Stanovení kortizolu v krvi.....	20
1.4.2 Stanovení kortizolu v moči .....	21
1.4.3 Stanovení kortizolu ve slinách.....	22
1.4.4 Stanovení kortizolu ve vlasech .....	23
1.5 Separační techniky pro stanovení kortizolu .....	24
1.5.1 Příprava vzorku.....	24
1.5.2 Kapalinová chromatografie s hmotností spektrometrií.....	25
1.5.3 Plynová chromatografie .....	27
1.5.4 Elektromigrační techniky.....	28
1.5.5 Imunochemické metody.....	28
1.5.6 Další techniky pro stanovení kortizolu .....	29
2 Experimentální část .....	30
2.1 Vzorky.....	30
2.2 Přístroje, pomůcky .....	30
2.3 Chemikálie .....	31
2.4 Roztoky .....	32
2.5 Pracovní postup.....	33
2.5.1 Příprava vzorků slin k analýze.....	33
2.5.2 Parametry kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie .....	33
2.5.3 Kalibrace.....	34
2.5.4 Výběr vhodného extrakčního činidla.....	35
2.5.5 Optimalizace počtu extrakcí .....	35
2.5.6 Analytické parametry metody.....	35

2.5.6.1	Přesnost metody .....	36
2.5.6.2	Výtěžnost metody a účinky matrice .....	36
2.5.6.3	Linearita .....	37
2.5.7	Zpracování výsledků .....	37
3	Výsledky a diskuze .....	38
3.1	Optimalizace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie .....	38
3.2	Výběr vhodného extrakčního činidla .....	39
3.3	Optimalizace počtu extrakcí .....	40
3.4	Analytické parametry metody .....	40
3.4.1	Přesnost metody .....	40
3.4.2	Výtěžnost metody a účinky matrice .....	41
3.4.3	Linearita .....	42
3.5	Stanovení kortizolu ve vzorcích slin .....	42
3.6	Vliv fyzické zátěže na hladinu kortizolu ve slinách .....	43
4	Závěr .....	44
5	Použitá literatura .....	45
6	Přílohy .....	53



## Seznam zkratek

ACTH	kortikotropin, z angl. adrenocorticotropin hormone
AP	aktivátorový protein
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku, z angl. atmospheric pressure chemical ionization
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku, z angl. atmospheric pressure photo ionization
AVG	průměrná hodnota, z angl. average
CBG	kortizol vázající globulin, z angl. cortisol binding globulin
CRH	kortikoliberin, z angl. corticotropin releasing hormone
CV	variační koeficient, z angl. coefficient of variation
ECLIA	elektrochemiluminiscence, z angl. electrochemiluminescence immunoassay
EI	elektronová ionizace
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunosorbentní analýza, z angl. enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem, z angl. electrospray ionization
FLD	fluorescenční detekce
GC	plynová chromatografie, z angl. gas chromatography
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HFBA	anhydrid heptafluormáslé kyseliny, z angl. heptafluorobutyric anhydride
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie, z angl. high performance liquid chromatography
HSD	hydroxysteroiddehydrogenáza
IL	interleukin
IS	vnitřní standard, z angl. internal standard
LC	kapalinová chromatografie, z angl. liquid chromatography
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny, z angl. liquid-liquid extracton

MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie, z angl. micellar electrokinetic chromatography
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl. mass spectrometry
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MRM	sledování více reakcí, z angl. multiple reaction monitoring
MTBE	methyl- <i>terc</i> -butylether
RIA	radioimunoanalýza
SD	směrodatná odchylka, z angl. standard deviation
SDS	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
SERS	povrchem zesílená Ramanova spektrometrie, z angl. surface enhanced Raman spectroscopy
SPE	extrakce na pevné fázi, z angl. solid phase extraction
SPR	povrchová plazmonová rezonance, z angl. surface plasmon resonance
TOF	analyzátor doby letu, z angl. time of flight
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě, z angl. very low density lipoprotein

## Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1. Biosyntéza kortizolu.....	14
Obrázek 2. Změny koncentrace kortizolu v plazmě v průběhu dne .....	14
Obrázek 3. Odbourávání kortizolu.....	16
Obrázek 4. Vzhled osob s Cushingovým syndromem .....	19
Obrázek 5. Souprava k odběru slin Salivette .....	23
Tabulka 1. Koncentrace kortizolu v séru, moči a slinách.....	21
Tabulka 2. Mez detekce a kvantifikace při stanovení kortizolu různými metodami .....	27
Tabulka 3. Optimalizované parametry MS.....	34
Tabulka 4. Příprava standardů pro konstrukci kalibrační křivky.....	35
Tabulka 5. Přesnost stanovení kortizolu .....	41
Tabulka 6. Výťažnost metody a účinky matrice při stanovení kortizolu .....	41
Tabulka 7. Data pěti kalibračních křivek pro stanovení kortizolu ve slinách.....	42
Tabulka 8. Hladiny kortizolu ve vzorcích slin dobrovolných dárců.....	42
Tabulka 9. Vliv fyzické zátěže na hladinu kortizolu .....	43
Graf 1. Porovnání extrakčních činidel .....	39
Graf 2. Závislost relativní plochy píku kortizolu a vnitřního standardu na počtu extrakcí .....	40

# Úvod

Kortizol je významným hormonem, který ovlivňuje celou řadu metabolických pochodů. Kortizol pomáhá regulovat metabolismus sacharidů a lipidů, ovlivňuje syntézu a odbourávání bílkovin. Působí také na imunitní systém a uplatňuje se při reakci organismu na fyzický i psychický stres. Se změnami hladiny kortizolu jsou spojena různá onemocnění, jako je například Cushingův syndrom a Addisonova choroba. Stanovení hladiny kortizolu je významné z hlediska diagnostiky různých onemocnění, ale také kvůli monitorování fyzické zátěže nebo psychického stresu.

Kortizol je tradičně stanovován v séru imunochemickými metodami. V současné době je věnována pozornost stanovení kortizolu ve slinách, odběr slin je snadný a neinvazivní a koncentrace kortizolu odpovídá jeho biologické aktivitě. Imunochemické metody používané pro stanovení kortizolu v séru nemusí být dostatečně citlivé pro jeho stanovení ve slinách, a proto se pro stanovení kortizolu ve slinách používá obvykle kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která má vyšší citlivost a specificitu.

Cílem této práce je zavedení a optimalizace metody pro stanovení kortizolu kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

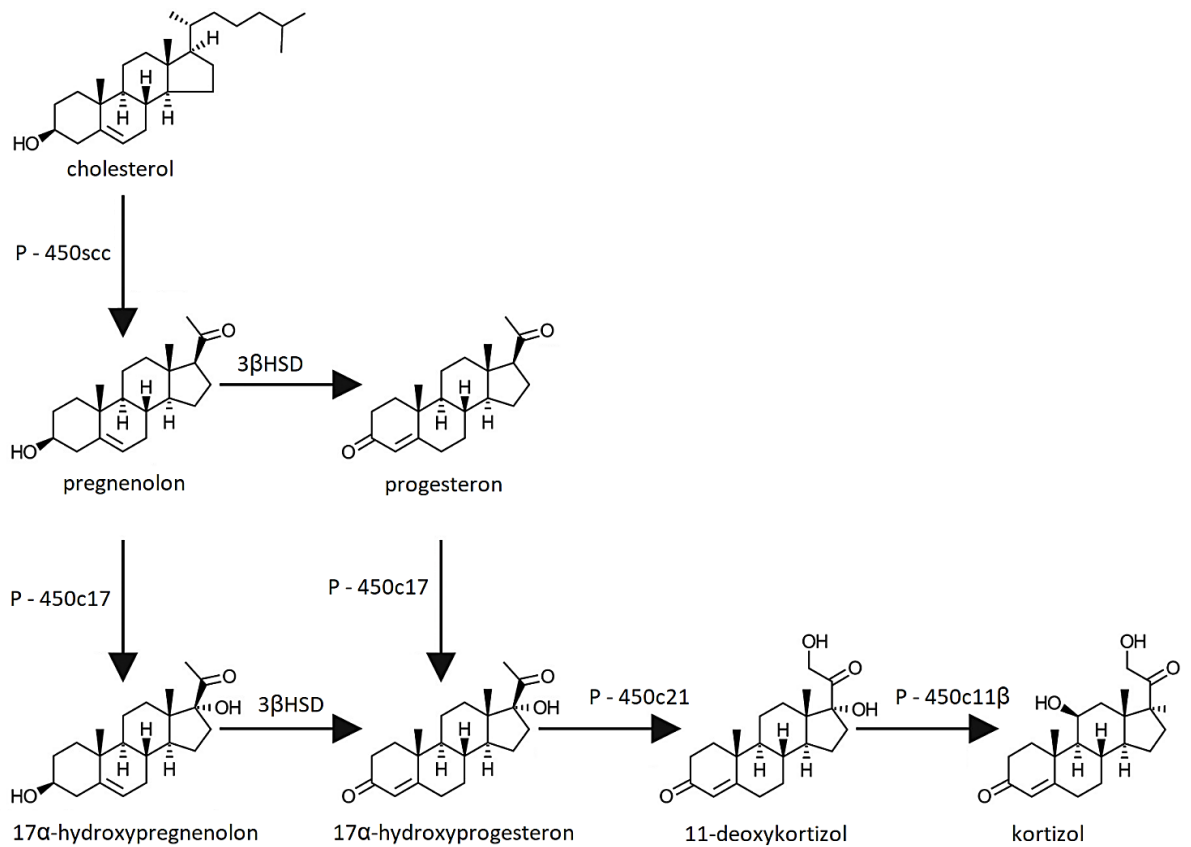
# 1 Teoretická část

## 1.1 Syntéza a vlastnosti kortizolu

### 1.1.1 Syntéza kortizolu

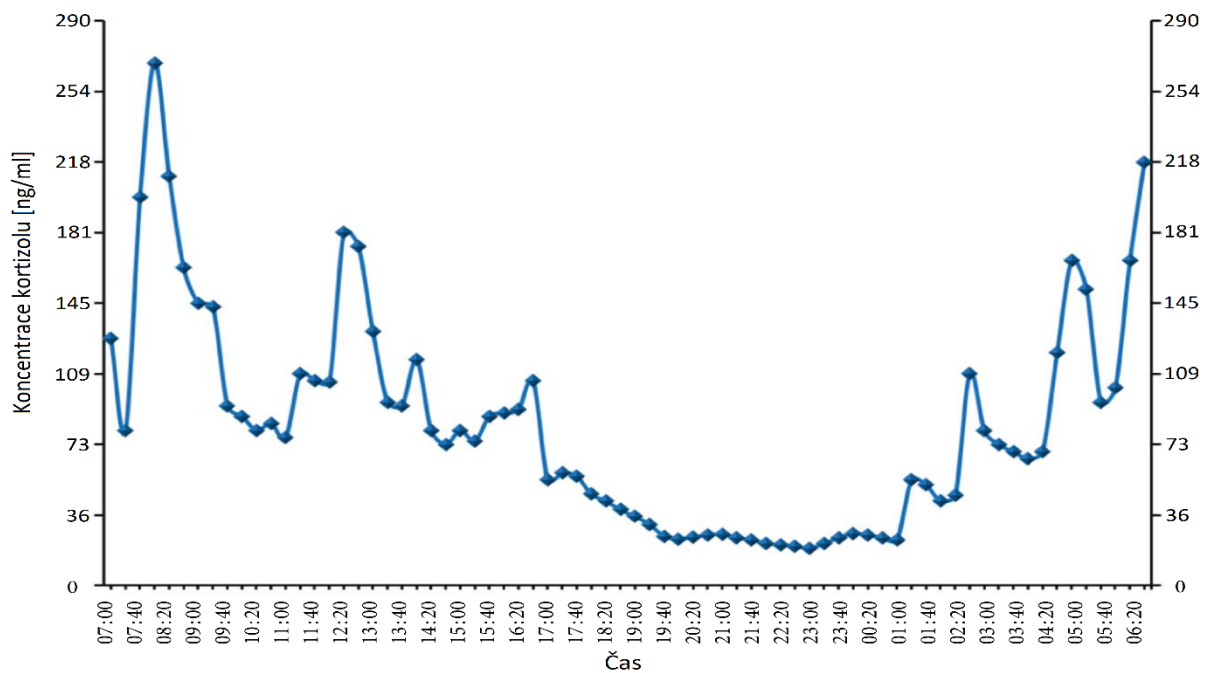
Kortizol je steroidní hormon produkovaný v *zona fasciculata* a *zona reticularis* kůry nadledvin. Základním stavebním kamenem pro syntézu kortizolu a ostatních steroidních hormonů je cholesterol. Ten je dodáván především z plazmy, v menší míře je syntetizován v kůře nadledvin z acetyl-S-CoA. Prvním krokem tvorby steroidních hormonů je přeměna cholesterolu na pregnenolon, tento krok má také hlavní význam v regulaci steroidogeneze. Následně je pregnenolon přeměněn na kortizol v sérii reakcí, jedná se především o hydroxylace a dehydrogenace (Obrázek 1). V syntéze kortizolu a ostatních steroidů se uplatňují dvě hlavní skupiny enzymů, cytochrom P450-oxidoreduktázy a hydroxysteroiddehydrogenázy (HSD). Kortizol v nadledvinách není skladován a míra jeho uvolňování z nadledvin je řízena rychlostí jeho syntézy. Tvorba kortizolu podléhá cirkadiálnímu rytmu řízenému centrální nervovou soustavou (Obrázek 2). Během večera a prvních hodin spánku klesá, mezi třetí a pátou hodinou spánku opět stoupá, maxima dosahuje mezi šestou a osmou hodinou spánku, po probuzení tvorba kortizolu opět klesá [1-4].

Syntéza kortizolu je řízena z hypotalamu sekrecí kortikoliberinu (CRH), který zvyšuje uvolňování kortikotropinu (ACTH) z adenohypofýzy, ten v kůře nadledvin zvyšuje přeměnu cholesterolu na pregnenolon. Sekreci ACTH zvyšuje také vasopresin. V řízení sekrece kortizolu se uplatňuje negativní zpětná vazba, tzn. nárůst koncentrace kortizolu v krvi snižuje vylučování CRH, vasopresinu a ACTH. Kortizol je uvolňován v reakci na fyzický i psychický stres, mechanismem je zvýšení sekrece CRH a ACTH [1-4].



Obrázek 1. Biosyntéza kortizolu [3]

P450<sub>scc</sub>, enzym katalyzující odštěpení postranního řetězce kortizolu; P450<sub>c17</sub>, steroid-17 $\alpha$ -hydroxyláza; P450<sub>c21</sub>, steroid-21-hydroxyláza; P450<sub>c11 $\beta$</sub> , steroid-11 $\beta$ -hydroxyláza; 3 $\beta$ HSD, 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza.

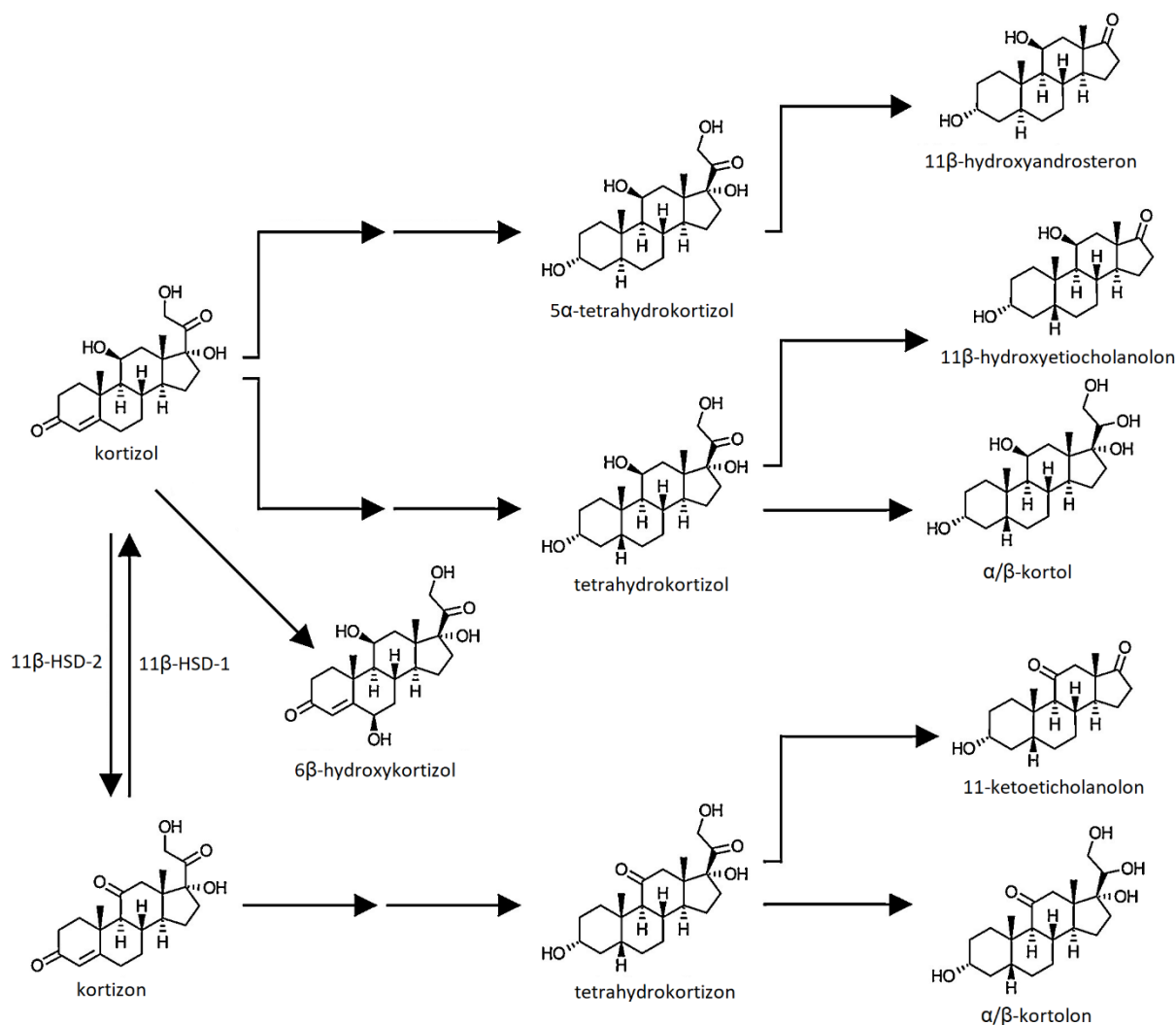


Obrázek 2. Změny koncentrace kortizolu v plazmě v průběhu dne [71]

### 1.1.2 Vlastnosti a metabolismus kortizolu

Kortizol je v krvi z většiny transportován ve vazbě na proteiny. Hlavní podíl kortizolu (cca 80 %) se váže na kortizol vázající globulin (CBG, transkortin), menší část (cca 10 %) se váže na albumin. Méně než 10 % celkového kortizolu je přítomno v plazmě ve volné formě, kdy pouze tento podíl je biologicky aktivní. Kortizol je stejně jako další steroidní hormony lipofilní látka, díky tomu volně prochází buněčnou membránu. V cytoplazmě se kortizol váže na glukokortikoidní receptor a vzniklý komplex hormonu s receptorem vstupuje do jádra. V jádře kortizol zvyšuje nebo snižuje expresi příslušných genů, jednak přímou vazbou na regulační úseky DNA (glucocorticoid response elements), dále také interakcí s transkripčními faktory (jaderný faktor  $\kappa$ B a aktivátorový protein AP-1). Kromě glukokortikoidního receptoru je kortizol schopen aktivovat i mineralokortikoidní receptor. Ve většině tkání k aktivaci mineralokortikoidních receptorů kortizolem za fyziologických podmínek nedochází. Mezi tkáně ovlivňované kortizolem prostřednictvím mineralokortikoidních receptorů patří některé části centrální nervové soustavy [1-3].

Před vyloučením je většina kortizolu metabolizována v játrech. Prvním krokem je redukce kortizolu na tetrahydrokortizol, který může být dále redukován nebo přeměněn odštěpením postranního řetězce. Další možnou cestou je přeměna kortizolu na  $6\beta$ -hydroxykortizol, který je rozpustný ve vodě, a tím pádem je vyloučen močí (Obrázek 3). Většina metabolitů kortizolu je konjugována s kyselinou glukuronovou a vyloučena močí. Kortizol je přeměňován také na kortizon za účasti enzymu  $11\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy typu 2 ( $11\beta$ -HSD-2), k čemuž dochází např. v ledvinách, slinných žlázách a střevě. Kortizon je biologicky neaktivní a je metabolizován a vylučován podobným způsobem jako kortizol. Funkcí přeměny kortizolu na kortizon je zabránění nadměrnému působení kortizolu a projevení jeho mineralokortikoidních účinků. Například v ledvinách vede aktivace mineralokortikoidních receptorů kortizolem k zadržování solí [1-3].



Obrázek 3. Odbourávání kortizolu [3]; 11-β-HSD, 11-β-hydroxysteroiddehydrogenáza

## 1.2 Funkce kortizolu

Jednou z oblastí ovlivňovanou kortizolem je metabolismus sacharidů. Kortizol zvyšuje hladinu glukózy v krvi, k tomu dochází jednak podporou glukoneogeneze v játrech a jednak snížením odbourávání glukózy periferními tkáněmi. K stimulaci glukoneogeneze dochází ovlivněním aktivity klíčových enzymů glukoneogeneze (fosfoenolpyruvátcarboxykinázy, glukóza-6-fosfatázy a fosfofruktokinázy/fruktóza-2,6-bisfosfatázy). Kortizol dále v periferních tkáních snižuje množství receptorů pro glukózu GLUT4, které se přesouvají do buněčné membrány, což vede k poklesu vychytávání glukózy v těchto tkáních. Kortizol má navíc také katabolické účinky na metabolismus bílkovin a lipidů, jejich odbourávání vede k uvolňování většího množství aminokyselin a glycerolu, které následně slouží jako substrát pro glukoneogenezi. Kortizol působí také na metabolismus glykogenu. V játrech kortizol zvyšuje aktivitu



glykogensyntázy a snižuje aktivitu glykogenfosforylázy, to vede k podpoře syntézy glykogenu [1, 2, 5-7].

Další oblastí ovlivňovanou účinky kortizolu je metabolismus lipidů. V tukové tkáni kortizol snižuje syntézu lipidů a podporuje jejich odbourávání, tím dochází k nárůstu koncentrace volných mastných kyselin v krevním oběhu. Jedním z mechanismů potlačení syntézy lipidů je snížení příjmu glukózy z krve buňkami kvůli poklesu počtu receptorů GLUT4, právě přijatá glukóza slouží jako substrát pro syntézu lipidů. Dalším mechanismem je zvýšení aktivity lipolytických enzymů (adipocytární triglyceridová lipáza a hormon-senzitivní lipáza). Kortizol dále také zvyšuje aktivitu lipoproteinové lipázy, hlavně v oblasti břicha, což zvyšuje množství mastných kyselin dostupných buňkám. V játrech kortizol naopak podporuje syntézu lipidů. To následně vede k nárůstu uvolňování lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) z jater a jejich zvýšená koncentrace zvyšuje dostupnost mastných kyselin pro periferní tkáň [1, 2, 5, 6, 8].

Kortizol svými imunopresivními účinky působí na imunitní systém. Kortizol snižuje akumulaci leukocytů v místech zánětu a množství lymfocytů, monocytů, eozinofilů a bazofilů v krevním oběhu. U neutrofilů dochází k nárůstu jejich množství v krevním oběhu v důsledku jejich zvýšeného uvolňování z kostní dřeně a prodloužení doby života, ale naopak se snižuje jejich migrace do místa zánětu. Kortizol snižuje proliferaci T a B lymfocytů a aktivitu NK buněk, neboť ve zvýšené míře dochází k apoptóze thymocytů. Dále dochází k poklesu diferenciaci a činnosti makrofágů a k nižšímu účinku prezentace antigenů dendritickými buňkami. Dalším mechanismem, jakým kortizol ovlivňuje imunitní reakci, je inhibice vylučování prozánětlivých cytokinů, jako jsou interleukiny (IL1, IL2, IL3, IL6), tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ , interferon  $\gamma$  a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF). Je také potlačena činnost fosfolipázy A2 a cyklooxygenázy 2, což vede k poklesu syntézy prostaglandinů a leukotrienů. Kortizol ovlivňuje také kardiovaskulární systém, pomáhá řídit krevní tlak tím, že podporuje působení látek zvyšujících krevní tlak (např. angiotenzin II, noradrenalin). Kortizol také zvyšuje minutový srdeční výdej [1, 2, 5, 6, 9].

## 1.3 Onemocnění způsobené nadbytkem nebo nedostatkem kortizolu

### 1.3.1 Nadbytek kortizolu

Onemocnění způsobené nadbytkem kortizolu se označuje jako Cushingův syndrom. Nečastější příčinou vzniku tohoto onemocnění je nádor adenohypofýzy vedoucí k nadprodukci ACTH. Nadbytek ACTH může být způsoben také nádorem v jiné části těla. Další příčinou může být ektopická produkce CRH. Cushingův syndrom může být způsoben také onemocněním kůry nadledvin, která pak produkuje kortizol nezávisle na regulaci. Příznaky Cushingova syndromu mohou být vyvolány také syntetickými glukokortikoidy podávanými jako léčiva [1, 2].

Nadbytek kortizolu vede k hyperglykémii (podpora glukoneogeneze, potlačení vychytávání glukózy periferními tkáněmi). Může dojít také k rozvoji *diabetes mellitus*, jelikož je omezena funkce GLUT4 receptorů. Navíc dochází k poruše funkce  $\beta$ -buněk pankreatu a sekrece inzulínu. Pro Cushingův syndrom je typická obezita s ukládáním tuku na obličeji a břiše, ale ne např. na končetinách (Obrázek 4). Kortizol v místech, ve kterých dochází k zvýšenému ukládání tuku, zvyšuje aktivitu lipoproteinové lipázy. Dále dochází také k zvýšenému uvolňování VLDL částic játry. To vede k většímu příjmu mastných kyselin tkáněmi, ty poté syntetizují více lipidů. Na vzniku viscerální obezity může mít podíl také vysoká aktivita 11 $\beta$ -HSD typu 1 v těchto tkáních, která katalyzuje přeměnu kortizonu na kortizol, což vede k nárůstu množství kortizolu působícího na tyto tkáně. Mezi další účinky kortizolu, které se mohou uplatňovat v rozvoji obezity, patří podpora diferenciací adipocytů a zvýšení příjmu stravy. Zvýšená koncentrace kortizolu se projevuje také vznikem hypertenze. Ta je způsobena mineralokortikoidním účinkem kortizolu, tzn. je překročena kapacita 11 $\beta$ -HSD typu 2 a dochází k zvýšenému zadržování sodíku a vylučování draslíku. Dále kortizol podporuje působení vasokonstrikčních látek. Kortizol také aktivuje renin-angiotenzinový systém a snižuje působení radikálu oxidu dusnatého a dalších vasodilatátorů [1, 10-12].

Kortizol má katabolické účinky na metabolismus bílkovin. To při jeho dlouhodobě zvýšené koncentraci vede k atrofii svalů, neboť aminokyseliny jsou využity jako zdroj energie. Atrofii podléhá také kůže, dochází k jejímu zeslabení, tvorbě strií (Obrázek 4) a dalším změnám. Nadbytek kortizolu ovlivňuje také fungování kostí. Dochází ke snížení počtu a funkce osteoblastů a poklesu syntézy a nárůstu odbourávání kolagenu, to má za následek degradaci kostí. Zvýšená hladina kortizolu také zvyšuje množství koagulačních faktorů (hlavně faktoru VIII a von Willebrandova faktoru) a snižuje míru fibrinolýzy, což zvyšuje riziko vzniku

trombóz. Imunosupresivní účinek kortizolu způsobuje při jeho nadbytku také zvýšenou náchylnost k infekcím [1, 10-12].



Obrázek 4. Vzhled osob s Cushingovým syndromem (centrální obezita, strie) [2, 62]

### 1.3.2 Nedostatek kortizolu

Jednou z příčin nedostatku kortizolu je Addisonova nemoc, ta je způsobená poškozením kůry nadledvin nejčastěji v důsledku autoimunitní reakce, dále např. kvůli nádoru, infekci (tuberkulóza) nebo krvácení. U Addisonovy nemoci klesá jak hladina kortizolu, tak také hladina aldosteronu a příznaky nemoci jsou způsobené nedostatkem obou hormonů. Mezi další příčiny nedostatku kortizolu patří porucha sekrece ACTH z adenohipofýzy (např. kvůli rakovině) a porucha sekrece CRH z hypotalamu [1, 2,].

Jedním z příznaků nedostatku kortizolu je hypoglykémie, která vzniká v důsledku snížení podpory glukoneogeneze kortizolem. Snížení množství kortizolu vede také k menší podpoře činnosti látek zvyšujících krevní tlak, což může vést k poklesu krevního tlaku. Kortizol snižuje sekreci vasopresinu, jeho zvýšené množství při nedostatku kortizolu vede k nižšímu vylučování vody a k hyponatrémii. Kortizol snižuje tvorbu kalcitriolu přes  $1\alpha$ -hydroxylázu, při jeho nedostatku může docházet k nárůstu hladiny kalcitriolu a v důsledku toho k hyperkalcémii, neboť dochází k zvýšené absorpci vápníku ve střevě. Nedostatek kortizolu se projevuje také únavou a poklesem tělesné hmotnosti [1, 2, 13-16].

## **1.4 Stanovení kortizolu**

### **1.4.1 Stanovení kortizolu v krvi**

V dnešní době je běžně stanovena koncentrace celkového kortizolu v séru imunochemickými metodami. Většina kortizolu je ale v krvi navázaná na proteiny a koncentrace celkového kortizolu proto závisí na množství proteinů (albuminu, CBG). Biologicky aktivní je pouze volný kortizol a koncentrace celkového kortizolu v séru nemusí odrážet míru jeho působení. Při imunochemické analýze neupraveného vzorku séra může také docházet k tomu, že proteiny plazmy soutěží ve vazbě kortizolu s protilátkami použitými k analýze. Tuto interferenci je možné eliminovat použitím různých blokovacích činidel. Interferovat při stanovení kortizolu mohou také další látky přítomné v séru, např. jiné steroidy. Stanovení hladin volného kortizolu v séru imunochemickými metodami vyžaduje separaci vázaného kortizolu před vlastní analýzou, k tomu se využívá např. dialýza, ultrafiltrace nebo gelová filtrace. Tyto kroky vedou k zvýšení složitosti a časové náročnosti analýzy a stěžují její rutinní uplatnění. Alternativou k přímému stanovení koncentrace volného kortizolu je její výpočet na základě koncentrace celkového kortizolu a množství CBG a albuminu. Tato metoda ale nezohledňuje možné rozdíly v afinitě kortizolu k vazebným bílkovinám a nemusí správně fungovat u nemocných osob. Další nevýhodou stanovení kortizolu v séru je invazivní způsob odběru venózní krve a s ní spojený stres, který může vést k nárůstu hladiny kortizolu. Koncentrace celkového kortizolu v séru (plazmě) se pohybuje v desítkách až stovkách ng/ml (Tabulka 1) [17-19, 28].

## 1.4.2 Stanovení kortizolu v moči

Do moči přechází pouze volný kortizol (okolo 2 % kortizolu z krve), tím pádem hladina kortizolu v moči odráží míru jeho biologické aktivity. Kortizol v moči se většinou stanovuje jako celkové množství volného kortizolu vyloučeného za 24 h, při tomto stanovení je výsledek nezávislý na cirkadiálním rytmu produkce kortizolu. Nevýhodou tohoto stanovení jsou možné problémy se správným odběrem moči během 24 h, jelikož může být odebráno množství odpovídající kratšímu nebo delšímu období. Vliv těchto chyb je možné omezit vztahením koncentrace kortizolu ke koncentraci kreatininu, v případě normální glomerulární filtrace je koncentrace kreatininu v moči konstantní. Při použití imunochemických metod je nutné před vlastní analýzou provést extrakci do dichlormethanu nebo ethylacetátu, aby došlo k odstranění interferujících látek (metabolitů kortizolu), kterých je zde větší množství než v séru. Ke stejnému účelu lze využít také extrakci na pevné fázi. Další možností stanovení kortizolu v moči je využití chromatografických metod. Z nich je nejčastěji využívána kombinace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, která má vyšší citlivost a specifitu než imunochemické metody [17-19].

Tabulka 1. Koncentrace kortizolu v séru, moči a slinách

Vzorek	Doba odběru	Koncentrace kortizolu [ng/ml]	Zdroj
sliny	-	0,254 – 3,770	[28]
sliny	23:00 – 12:00	0,17 – 0,97	[64]
sliny	8:00	0,979 – 8,301	[65]
	23:00	0,0906 – 1,0350	
sliny	20:00 – 8:00	0,475 – 3,170	[63]
sérum (celkový)	20:00 – 8:00	55,6 – 168,4	[63]
sérum (celkový)	8:30 – 10:00	12,905 – 397,440	[28]
sérum (celkový)	-	133,0 – 174,5	[33]
sérum (volný)	8:30 – 10:00	0,181 – 4,495	[28]
sérum (volný)	8:00 – 10:00	0,761 – 6,624	[69]
moč	ráno	4,85 – 32,68	[66]
moč	8:00 – 10:00	37	[36]
moč	-	17,99	[33]

### 1.4.3 Stanovení kortizolu ve slinách

Sliny vznikají v acinech slinných žláz přestupem vody a elektrolytů z plazmy a sekrecí proteinů (např. mucinu) z buněk acinů, tím vznikají primární sliny, které mají podobné složení jako plazma. Primární sliny jsou dále upravovány ve slinných vývodech resorpcí a sekrecí iontů, čímž z nich vznikají sekundární sliny, které jsou vylučovány do ústní dutiny. Složení slin se liší v závislosti na slinné žláze, ve které vznikly. V průšních žlázách vnikají řídké sliny s nízkým obsahem mucinu, sliny z podčelistních žláz obsahují mucinu více, sliny z podjazykových žláz obsahují nejvíce mucinu a jsou nejhustší. Na bazální sekreci slin se nejvíce podílí podjazykové žlázy, po stimulaci mají největší podíl průšní žlázy. Bazální produkce slin je přibližně 0,5 ml/min, po stimulaci stoupá až na 4 ml/min. Za den vzniká 0,5-1,5 l slin [20, 59, 60].

Kortizol přechází z krve do slin pasivní difuzí přes buňky acinů. Do slin přechází z krve pouze volný kortizol a množství kortizolu přešlého do slin nezávisí na velikosti tvorby slin. Koncentrace kortizolu ve slinách odráží změny koncentrace kortizolu v krvi v rámci cirkadiálního rytmu. Koncentrace kortizolu ve slinách je menší než v séru, proto měření vyžaduje citlivější metody, což může působit problémy při použití imunochemických metod, u kterých může být limit detekce vyšší, než je nejnižší fyziologická koncentrace kortizolu ve slinách. Ve slinných žlázách je navíc přítomna 11 $\beta$ -HSD typu 2, jejímž působením je ve slinách větší poměr kortizonu ke kortizolu než v plazmě a přítomný kortizon může interferovat při imunochemickém stanovení. Možným řešením těchto nevýhod je použití hmotnostní spektrometrie, která má vyšší citlivost a specificitu [17-20].

Podle některých studií má metoda odběru slin vliv na stanovení hladin kortizolu. Nejčastěji se k odběru slin používají tamponky (např. Salivette, Obrázek 5), které se nechají nasáknout slinami. Odebrané sliny se z tamponků získávají centrifugací. Použití tamponků snižuje viskozitu vzorku a zabraňuje jeho kontaminaci pevnými částicemi. Podle některých studií vede použití bavlněných tamponků k nižším naměřeným hodnotám kortizolu, proto je vhodnější použít tamponky ze syntetického materiálu. Další možností odebrání vzorku je plivání nebo nechání ztést sliny do zkumavky. Někdy je při odběru tvorba slin stimulována, např. kyselinou citrónovou. Doporučuje se 0,5-2,0 h před odběrem slin nejíst, nepít (kromě vody) a nečistit si zuby a 10-15 min před odběrem vypláchnout ústa vodou. Výsledky stanovení může ovlivnit také kontaminace slin krví nebo kouření před samotným odběrem, výsledkem jsou falešně vyšší hodnoty. Také kofein je považován za látku falešně zvyšující hodnoty kortizolu. Kortizol má ve slinách vysokou stabilitu, ve vzorku uchovávan při pokojové teplotě je stabilní několik dní, při 5 °C tři měsíce a při -20 °C minimálně 1 rok [17-20, 51, 58, 61].



Obrázek 5. Souprava k odběru slin Salivette [20]

#### 1.4.4 Stanovení kortizolu ve vlasech

Dalším materiálem, ve kterém je možné stanovit hladiny kortizolu jsou vlasy. V rostoucím vlasu dochází k difuzi a ukládání volného kortizolu. Množství kortizolu ve vlasu pak odpovídá jeho koncentraci v těle během delšího období. Volbou analyzované části vlasu je možné určit koncentraci kortizolu v daném časovém období. Povrch vlasů může být kontaminován kortizolem z potu a mazu, a pro odstranění těchto interferencí je nutné vzorek propláchnout např. isopropanolem. Následně je vzorek rozmělněn a je provedena extrakce kortizolu, např. do methanolu. Kortizol ve vlasech je v porovnání s kortizolem v biologických tekutinách stabilnější, tím pádem může být vzorek skladován dlouho dobu při laboratorní teplotě. Nevýhodou stanovení kortizolu ve vlasech je postupné snižování množství kortizolu se zvyšujícím se stářím dané části vlasu. K degradaci kortizolu zde dochází zřejmě vlivem UV záření a mytím vlasů. Množství kortizolu může být ve vlasech ovlivněno také různými úpravami vlasů (např. barvením) [21, 22].

## 1.5 Separační techniky pro stanovení kortizolu

### 1.5.1 Příprava vzorku

Před chromatografickou analýzou ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) a v některých případech také před analýzou imunochemickými metodami je kortizol extrahován do organického rozpouštědla, jako je např. dichlormethan, ethylacetát, methyl-*terc*-butylether (MTBE) a směs methyl-*terc*-butyletheru a hexanu. Kromě extrakce do kapaliny se provádí také extrakce na SPE kolonkách s nepolární stacionární fází (C8, C18). K promytí kolonky po nadávkování vzorku se používá voda s příměsí organického rozpouštědla (např. s 5 nebo 20 % methanolem). K eluci kortizolu z kolonky se používá čisté organické rozpouštědlo (např. methanol nebo acetonitril). Extrakci metodou SPE je možné využít také v on-line uspořádání na předkoloně. Použití extrakce v off-line upořádání prodlužuje analýzu a zvyšuje její složitost, což může působit problémy při rutinní analýze. V on-line uspořádání je analýza rychlejší, dochází k menším ztrátám analytu a výsledky méně závisí na osobě provádějící analýzu. Po extrakci v off-line uspořádání se organické rozpouštědlo odpaří pod proudem dusíku a odparek se rozpustí nejčastěji v mobilní fázi v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo v jiném organickém rozpouštědle při využití plynové chromatografie (GC). Pro analýzu elektroforézou se odparek rozpustí v elektrolytu použitým pro měření. Dalším možným způsobem přípravy vzorku k analýze je precipitace proteinů a následná centrifugace vzorku. Mezi používaná precipitační činidla patří organická rozpouštědla, jako je např. acetonitril, dále pak kyselina trichloroctová nebo anorganické soli (např. síran zinečnatý). Precipitace proteinů je rychlá metoda, ale vzorek je naředěn precipitačním činidlem, což vede k poklesu citlivosti měření. Někdy je využívána také kombinace precipitace proteinů a extrakčních technik. Při analýze moči byl v některých případech do chromatografu dávkován přímo zředěný vzorek, to ale může vést k znečištění systému a snížení životnosti kolony [23-25, 27, 29].

Při měření volného kortizolu v séru je potřeba nejprve oddělit vázaný kortizol. Jednou z používaných technik je dialýza, která ale trvá dlouho (až 24 h), navíc během dialýzy může docházet ke změnám ve vazbě kortizolu na proteiny. Další možností je ultrafiltrace, ta je rychlejší a podle jedné z prací je i správnější [69]. Při gelové filtraci je vzorek aplikován na kolonu s gelem, volný kortizol je stacionární fází zadržován na koloně déle než kortizol vázaný na proteinech (gelová permeační chromatografie), nevýhodou této metody je spotřeba velkého množství vzorku [18].



## 1.5.2 Kapalinová chromatografie s hmotností spektrometrií

Kortizol se nejčastěji stanovuje metodou HPLC v systému obrácených fází. Jako stacionární fáze slouží především C8 a C18 uhlovodíkové zbytky nebo fenyl. Při separaci na fenylové stacionární fázi se uplatňují  $\pi$ - $\pi$  interakce stacionární fáze s aromatickým kruhem, čímž je zvýšena selektivita pro separaci kortizolu od látek s podobnou strukturou. K detekci kortizolu se využívá nejčastěji hmotnostní spektrometrie. V kombinaci s ní se jako mobilní fáze používá směs voda/methanol nebo voda/acetonnitril. Methanol je protické rozpouštědlo, a díky tomu podporuje tvorbu iontů ( $[M+H]^+$ ). Jeho směs s vodou má ale vyšší viskozitu, kvůli tomu je v koloně generován vyšší tlak, to může vést ke zkrácení životnosti kolony. V případě acetonnitrilu je tlak generovaný v koloně menší, ale na druhou stranu acetonnitril nepodporuje tvorbu iontů, jelikož se jedná o aprotické rozpouštědlo. Mobilní fáze se proto obvykle modifikuje přidávkem dalších látek, nejčastěji kyselinou mravenčí (např. 0,1 %). Její přidavek podporuje ionizaci kortizolu, zvyšuje citlivost stanovení a zlepšuje tvar píku. Mechanismem je v pozitivním módu poskytování protonů pro tvorbu  $[M+H]^+$  iontů, v negativním módu tvorba aduktů s kortizolem. Dále se pro modifikaci mobilní fáze používá např. octan amonný nebo chlorid amonný, tyto látky také podporují tvorbu iontů. Pro zlepšení citlivosti detekce může být kortizol derivatizován, například hydroxylaminem nebo 2-hydrazino-1-methylpyridinem (HMP).

Nejčastější ionizační technikou je ionizace elektrosprejem (ESI). Obvykle se pracuje v pozitivním módu, nicméně ionizace v negativním módu vedla v některých studiích ke zlepšení poměru signálu k šumu. Mechanismem, který se může podílet na lepších výsledcích v negativním módu je tvorba aduktů látek použitých k modifikaci mobilní fáze (např. kyseliny mravenčí) s kortizolem. U technik chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) se méně uplatňují vlivy matrice. Použití APCI v některých studiích vedlo k nárůstu poměru signálu k šumu. Kortizol se stanovuje většinou tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS), kdy nejčastěji používaným analyzátozem je trojitý kvadrupól, který pracuje v MRM módu. V pozitivním módu je nejčastěji využíván přechod 363→121, ten má nejvyšší citlivost a je využíván ke kvantifikaci, může být ale méně selektivní. Dále jsou využívány přechody 363→327 a 363→97, ty mají vyšší specificitu a jsou využívány k ověření, že je měřen skutečně kortizol. V negativním módu jsou obvykle sledovány ionty a přechody odpovídající aduktů kortizolu s látkou použitou k modifikaci mobilní fáze. V některých případech byla pro detekci využita kombinace kvadrupólu a analyzátoru doby letu (TOF), jeho výhodou je zaznamenání celého hmotnostního spektra, může

mít ale nižší citlivost. Ke kvantitativnímu stanovení kortizolu se využívá metoda vnitřního standardu s využitím stabilního izotopicky (většinou deuteriem) značeného kortizolu (např. 9,11,12,12-d<sub>4</sub> kortizol), který se při chromatografické separaci a ionizaci chová stejně jako kortizol. Jeho použití je vhodnější než použití strukturních analogů kortizolu (např. 6 $\alpha$ -methylprednisolon, flumethazon). Oproti nejčastěji využívanému stanovení kortizolu imunochemickými metodami má stanovení metodou HPLC-MS vyšší citlivost a specifitu a vykazuje menší rozdíly ve výsledcích mezi různými laboratořemi. V důsledku vyšší specifity jsou hladiny kortizolu stanovené HPLC-MS nižší než hladiny stanovené imunochemicky. V Tabulce 2 jsou srovnány limity detekce a kvantifikace při měření kortizolu různými metodami [23-30].

Další možnou metodou detekce je fluorescenční. V tomto případě je nutné kortizol derivatizací přeměnit na fluoreskující látku, například reakcí s 9-antroylnitrilem nebo reakcí s kyselinou sírovou v ethanolu. Po derivatizaci se vzorek purifikuje, například extrakcí na tuhé fázi (C18). U mobilní fáze (methanol, acetonitril) se upravuje pH na hodnotu cca 5 přidáním kyseliny fosforečné. Měření se provádí při excitační vlnové délce 360 nm, přičemž emitované záření má 460 nm. Kortizol lze detekovat také měřením absorpce UV záření při vlnové délce okolo 250 nm. Fluorescenční a UV detekce má v porovnání s MS detekcí menší citlivost a specifitu, ale využívá dostupnější instrumentaci [31-36].

Tabulka 2. Mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) při stanovení kortizolu různými metodami

Metoda	Vzorek	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Zdroj
LC – MS/MS	sliny	0,005	0,005	[27]
LC – MS/MS	moč	-	1,015	[31]
LC – MS/MS	sliny	0,020	0,100	[24]
LC – MS/MS	sliny	0,002	0,005	[26]
LC – FLD	moč	-	10,005	[31]
LC – UV	moč	-	5,000	[35]
GC – MS	moč	7,300	-	[39]
GC – MS	moč	-	1,813	[68]
ECLIA	sliny	0,544	1,088	[27]
Elektrochemický imunosenzor	sliny	1,700	-	[50]
Elektrochemický imunosenzor	sliny	0,010	-	[70]
EIA	sliny	0,109	-	[67]
Imunoanalýza se značením stříbrem	sliny	0,500	-	[47]
MEKC	moč	2,000	5,000	[41]

ECLIA, elektrochemiluminiscence; EIA, enzymová imunoanalýza; FLD, fluorescenční detekce; LC, kapalinová chromatografie; GC, plynová chromatografie; MS, hmotnostní spektrometrie; MEKC, micelární elektrokinetická chromatografie.

### 1.5.3 Plynová chromatografie

Další technikou, která je využívána pro stanovení hladin kortizolu je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Kortizol se před analýzou derivatizuje pro zvýšení jeho těkavosti a tepelné stability. Mezi používaná derivatizační činidla patří anhydrid heptafluormásečné kyseliny (HFBA) a deriváty trimethylsilanu, kdy derivatizace často probíhá v bezvodém prostředí. Kortizol může být měřen i bez derivatizace, to ale vede při opakovaném měření ke kontaminaci kolony. Kortizol nebo derivát kortizolu je před GC analýzou extrahován, organické rozpouštědlo odpařeno v atmosféře dusíku a odparek rekonstituován ve vhodném organickém rozpouštědle. Při využití MS jako detektoru, se k ionizaci kortizolu (derivátu kortizolu) většinou používá elektronová ionizace (EI), případně pro dosažení vyšší citlivosti je možné využít chemickou ionizaci. Ke kvantifikaci kortizolu se používá vnitřní standard, většinou se jedná o deuterovaný kortizol. Stanovení kortizolu GC-MS má vysokou citlivost a specifitu, často se používá i jako referenční metoda. Nevýhodou této metody je její složitost

a časová náročnost díky dlouhé přípravě vzorku, jelikož derivatizace může trvat i několik hodin. Kvůli tomu se tato metoda nehodí pro rutinní měření [37-40].

#### **1.5.4 Elektromigrační techniky**

Jednou z dalších technik používaných pro stanovení kortizolu je micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Analýza se provádí obvykle v borátovém pufru o pH asi 9, neboť migrační čas kortizolu je při vyšším pH kratší. V některých studiích zabývajících se analýzou steroidů metodou MEKC se do pracovního elektrolytu pro zvýšení rozlišení přidává organické rozpouštědlo (např. methanol). Přídavek methanolu ale zvyšuje migrační časy a může vést k zhoršení separace kortizolu. K tvorbě micel se nejčastěji používá dodecylsírán sodný (SDS). Pro zvýšení účinnosti separace se k tvorbě micel mohou použít polymerní látky společně s SDS. Kortizol je detekován nejčastěji spektrofotometricky při 254 nm. Elektromigrační techniky jsou využívány také ve spojení s imunochemickými metodami. Jednou z těchto metod je separace komplexu protilátky s kortizolem elektroforézou na čipu, k detekci slouží např. laserem indukovaná fluorescence [41-46].

#### **1.5.5 Imunochemické metody**

Kortizol se v dnešní době stanovuje nejčastěji imunochemickými metodami. Z imunochemických metod je nejvhodnější metodou ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay), která bývá používána i jako referenční metoda pro stanovení kortizolu. Analýza touto metodou ale trvá delší dobu a vyžaduje větší objemy vzorků a činidel. Mezi další metody se značením patří elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA) a radioimunoanalýza (RIA), nevýhodou RIA metody je nutnost práce s radioaktivním materiálem. Vzhledem k malé velikosti molekuly kortizolu má protilátka pouze jedno vazebné místo pro kortizol, což ztěžuje práci v sendvičovém uspořádání, a proto se kortizol obvykle stanovuje v kompetitivním uspořádání. Měření imunochemickými metodami pracujícími se značenými reaktanty vyžaduje větší počet kroků, analýza se však dá zjednodušit použitím imunochemických metod bez značení reaktantů. Jednou z těchto metod je povrchová plasmonová rezonance (SPR). Tato metoda využívá změnu optických vlastností substrátu po navázání kortizolu na protilátku ukotvenou na povrchu substrátu nebo po navázání protilátky proti kortizolu na analog kortizolu na povrchu substrátu. Analýzou SPR byly dosaženy limity detekce srovnatelné s HPLC-MS/MS. Dalším způsobem stanovení kortizolu ve vazbě na substrát je použití elektrochemických metod, vazba kortizolu na substrát mění jeho elektrické vlastnosti. Elektrochemická detekce může být použita také u metod se značením, kdy reakce

enzymu použitého jako značka se substrátem vede ke změně elektrických vlastností substrátu. Detekce se často provádí voltametriky, s využitím cyklické, diferenčně pulsní nebo square-wave voltametrie. Dále se používají také amperometrické metody nebo elektrochemická impedanční spektroskopie. Elektrochemické imunosenzory mají vysokou citlivost a nízké limity detekce. Imunochemické metody stanovení kortizolu jsou v porovnání s chromatografií jednodušší a snáze dostupné, dají se snadno automatizovat. Nevýhodou imunochemických metod je nižší citlivost a specifita v důsledku zkřížených reakcí protilátek. Další nevýhodou je malá shoda výsledků změřených různými laboratořemi, tudíž tyto výsledky nelze přímo srovnávat [46-51]

### **1.5.6 Další techniky pro stanovení kortizolu**

Jednou z dalších technik využívaných pro stanovení kortizolu je analýza s využitím aptamerů (synteticky vytvořené oligonukleotidy DNA nebo RNA, které se specificky váží na cílovou molekulu) namísto protilátek. Výhodou použití aptamerů v porovnání s protilátkami je jejich nižší cena, vysoká stabilita a snadnější práce s nimi. K detekci se u aptamerů používají stejné metody jako v případě protilátek. Další možností je stanovení kortizolu senzory vytvořenými molekulárním imprintingem. V tomto případě je vytvořen polymer z monomerů s navázaným analytem. Poté je analyt z výsledného polymeru vymyt, přičemž po něm zůstanou dutiny odpovídající tvarem a velikostí danému analytu, který se do nich při samotné analýze specificky váže. Senzory vytvořené molekulárním imprintingem jsou stabilní a levné. K detekci se používají například elektrochemické senzory nebo fluorescenční značení. Kortizol lze stanovovat také Ramanovou spektrometrií. Kvůli malé intenzitě Ramanova rozptylu se kortizol měří povrchem zesílenou Ramanovou spektrometrií (SERS). U ní se analyt váže na nanostrukturovaný kovový povrch, což vede k zesílení signálu. K vazbě kortizolu na kovový povrch se využívají například protilátky [52-57].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Vzorky

Vzorky slin byly získány od dobrovolných dárců (18 žen, 20 mužů, rozmezí věku dárců bylo 15-76 let, průměrný věk 47 let) pliváním do polypropylenových zkumavek. Všichni dobrovolní dárce byli dopředu informováni o průběhu a účelu celé studie a poskytli písemný informovaný souhlas s účastí ve studii. Dobrovolníci byli instruováni, že minimálně 30 min před odběrem nemají jíst, nic pít (kromě vody), kouřit a asi 5 min před odběrem si mají vypláchnout ústa vodou. Od každé osoby bylo odebráno přibližně 1,5 ml slin. Pro otestování vlivu fyzické zátěže na hladinu kortizolu byl od šesti dobrovolníků (3 muži a 3 ženy) odebrán vzorek slin, poté každý dobrovolník absolvoval 30 min jízdy na rotopedu, a byl od něj odebrán vzorek ihned po zátěži a 1 h po skončení zátěže. Pro určení analytických parametrů metody bylo od 4 osob odebráno dohromady cca 70 ml slin, a od 3 z těchto osob v jiném týdnu cca 20 ml slin. Odebrané sliny byly následně smíchány. Odebrané vzorky slin byly do doby analýzy skladovány v mrazničce při -20 °C.

### 2.2 Přístroje, pomůcky

Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Pumpy LC-20AD

Odplynovač mobilní fáze DGU-20A

Autosampler SIL-20AC

Termostat kolony CTO-40A

Řídící jednotka CBM-20A

Hmotnostní spektrometr LCMS 8045 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Software LC Solution (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

Analytická kolona Discovery<sup>®</sup> C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm). (Supleco, Bellefonte, PA, USA)

Předkolona Discovery<sup>®</sup> C18 (5 x 4.6 mm; 5 µm). (Supleco, Bellefonte, PA, USA)

Třepačka Reax top (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Centrifuga Sorvall TC6 (Sorvall Instruments, Newtown, CT, USA)

Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)

Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Nylonové filtry, porozita 0,2  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Odpařovací zařízení Reacti-EVAP, model TS-18825 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Ultrazvuková lázeň Ecoson (Ecoson, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)

Chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)

Automatické pipety Biohit (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)

Polypropylenové zkumavky

Mikrozkumavky typu Eppendorf, 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné zkumavky, gumové zátky

Kádinky, odměrné válce

Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné inserty do vialek (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

## 2.3 Chemikálie

Deionizovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}$ ), Mr 18, G = 0,055  $\mu\text{S}$

Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ), Mr 32,04 (Merck, Darmstadt, Německo)

Acetonitril ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ), Mr 41,05 (Merck, Darmstadt, Německo)

Kyselina mravenčí ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ), Mr 46,03 (Merck, Darmstadt, Německo)

Ethylacetát ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), Mr 88,11 (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), Mr 74,12 (Merck, Darmstadt, Německo)

Methyl-*tert*-butylether (MTBE,  $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ), Mr 88,15 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Hexan ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ), Mr 86,18 (Merck, Darmstadt, Německo)

Analytický standard kortizolu ( $C_{21}H_{30}O_5$ , 1 mg/ml, v methanolu) Mr 362,5 (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Vnitřní standard, deuterovaný kortizol (9, 11, 12, 12-D<sub>4</sub> kortizol, 100 µg/ml, v methanolu) Mr 366,5 (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

## **2.4 Roztoky**

### Mobilní fáze A (voda s 0,1 % kyselinou mravenčí)

K 500 ml deionizované vody bylo přidáno 500 µl kyseliny mravenčí a roztok byl odvzdušněn v ultrazvukové lázni.

### Mobilní fáze B (methanol s 0,1 % kyselinou mravenčí)

K 500 ml methanolu bylo přidáno 500 µl kyseliny mravenčí, získaný roztok byl zfiltrován a odvzdušněn v ultrazvukové lázni.

### Mobilní fáze C (acetonitril s 0,1 % kyselinou mravenčí)

K 500 ml acetonitrilu bylo přidáno 500 µl kyseliny mravenčí, připravený roztok byl zfiltrován a odvzdušněn v ultrazvukové lázni.

### Směs methanol/voda (1:1, v/v)

Směs byla připravena smícháním 100 ml deionizované vody a 100 ml methanolu.

### Směs butanol/ethylacetát (1:1, v/v)

Směs byla připravena smícháním 5 ml ethylacetátu a 5 ml butanolu.

### Směs MTBE a hexanu (8:2, v/v)

Směs byla připravena smícháním 2 ml hexanu a 8 ml MTBE.

### Pracovní roztok standardu kortizolu I (10 µg/ml)

Pracovní roztok byl připraven naředěním 10 µl roztoku kortizolu (1 mg/ml) 990 µl methanolu.

### Pracovní roztok standardu kortizolu II (2,5 µg/ml)

Pracovní roztok byl připraven naředěním 250 µl pracovního roztoku standardu kortizolu I (10 µg/ml) 750 µl methanolu.

### Pracovní roztok vnitřního standardu I (1 µg/ml)



Pracovní roztok byl připraven naředěním 10 µl roztoku vnitřního standardu (100 µg/ml) 990 µl methanolu.

#### Pracovní roztok vnitřního standardu II (100 ng/ml)

Pracovní roztok byl připraven naředěním 100 µl pracovního roztoku vnitřního standardu I (1 µg/ml) 900 µl methanolu.

## **2.5 Pracovní postup**

### **2.5.1 Příprava vzorků slin k analýze**

Každý vzorek byl nechán rozmraznout při laboratorní teplotě, odstředěn při 2700 x g po dobu 5 min a 750 µl supernatantu bylo přeneseno do čisté zkumavky. K 750 µl slin bylo přidáno 20 µl pracovního roztoku vnitřního standardu II (100 ng/ml) a 3 ml ethylacetátu. Obsah zkumavky byl třepán na třepačce po dobu 5 min a poté odstředěn (2000 x g, 5 min). Do čisté zkumavky byla přenesena organická fáze a odpařena pod proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 75 µl směsi methanol/voda (1:1, v/v), směs přenesena do insertu vialky a analyzována.

### **2.5.2 Parametry kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie**

Kortizol byl separován na koloně s vázanou reverzní fází (C18). K ionizaci byl použit elektrosprej v pozitivním módu a jako hmotnostní analyzátor byl používán trojitý kvadrupól pracující v MRM módu. Optimalizované parametry MRM módu, při kterém probíhalo měření jsou uvedeny v Tabulce 3.

#### **Parametry HPLC-ESI-MS/MS:**

Doba analýzy: 9 min

Mobilní fáze A: voda s 0,1 % kyselinou mravenčí

Mobilní fáze B: methanol s 0,1 % kyselinou mravenčí

Gradient:      0,01 min – 50 % B  
                     5,00 min – 100 % B  
                     6,00 min – 100 % B  
                     6,01 min – 50 % B  
                     9,00 min – STOP

Teplota kolony: 40 °C

Průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min

Dávkovaný objem: 10 µl

Loop time: 0,2 s

Průtok zmlžovacího plynu: 2 l/min

Průtok sušícího a vyhřívacího plynu: 10 l/min

Teplota interface: 300 °C

DL teplota: 250 °C

Teplota vyhřívacího bloku: 400 °C

Tabulka 3. Optimalizované parametry MS

Analyt	Prekurzor [m/z]	Produkt [m/z]	Dwell time [ms]	CE [V]	Q <sub>1</sub> pre bias [V]	Q <sub>3</sub> pre bias [V]
Kortizol (1)	363,3	121,15	30	-24	-17	-13
Kortizol (2)	363,3	105,15	30	-50	-13	-21
Kortizol (2)	363,3	309,25	30	-18	-17	-22
IS	367,3	121,2	97	-27	-13	-13

CE, kolizní energie; IS, vnitřní standard; Q, pre bias, usměrňovací napětí na kvadrupólech; 1, kvantifikátor; 2, kvalifikátor.

### 2.5.3 Kalibrace

Ředěním pracovního roztoku standardu kortizolu II (2500 ng/ml) methanolem byly připraveny standardy s různou koncentrací kortizolu (Tabulka 4). K 730 µl slin bylo přidáno 20 µl připravených standardů kortizolu, čímž byly získány vzorky slin s koncentrací kortizolu uvedenou v Tabulce 4. Dále bylo k 730 µl slin přidáno 20 µl methanolu, čímž byl připraven kalibrační roztok odpovídající nulové koncentraci kortizolu. Ke každému vzorku slin bylo přidáno 20 µl roztoku vnitřního standardu II (100 ng/ml), vzorky byly dále zpracovány stejně jako v části 2.5.1.

Tabulka 4. Příprava standardů pro konstrukci kalibrační křivky

Koncentrace kortizolu ve slinách [ng/ml]	Koncentrace standardu [ng/ml]	Objem pracovního roztoku kortizolu (2500 ng/ml) [μl]	Objem methanolu [μl]
0,67	25	10	990
1,33	50	10	490
2,67	100	10	240
6,67	250	10	90
13,33	500	10	40
26,67	1000	20	30
66,67	2500	20	0

Koncentrace kortizolu ve slinách je koncentrace získaná po přidavku 20 μl standardu k 730 μl slin.

#### 2.5.4 Výběr vhodného extrakčního činidla

Testovanými extrakčními činidly byl butanol, směs butanol/ethylacetát (1:1, v/v), ethylacetát, MBTE a směs MBTE/hexan (8:2, v/v). K 1 ml slin bylo přidáno 20 μl pracovního roztoku vnitřního standardu II (100 ng/ml) a 3 ml extrakčního činidla. Obsah zkumavky byl třepán po dobu 5 min, odstředěn (2000 x g, 5 min), horní organická vrstva přenesena do čisté zkumavky a odpařena pod proudem dusíku, odparek rozpuštěn ve 100 μl směsi methanol/voda (1:1, v/v) a směs přenesena do insertu vialky a analyzována. Vzorky byly zpracovány v triplicátu.

#### 2.5.5 Optimalizace počtu extrakcí

K 1 ml slin bylo přidáno 20 μl pracovního roztoku vnitřního standardu II (100 ng/ml) a 3 ml ethylacetátu. Obsah zkumavky byl třepán po dobu 5 min, odstředěn (2000 x g, 5 min) a horní organická vrstva přenesena do čisté zkumavky. Ke zbytku byly přidány 3 ml ethylacetátu a postupováno stejně. Tímto způsobem byla provedena dvou, tří a čtyřnásobná extrakce kortizolu. Vzorky byly zpracovány v triplicátu.

#### 2.5.6 Analytické parametry metody

Vzorky slin pro určení analytických parametrů metody byly rozmrazeny při laboratorní teplotě, odstředěny (2700 x g, 5 min) a získané supernatanty spojeny.

### 2.5.6.1 Přesnost metody

Přesnost metody v sérii byla určena opakovaným (5x) měřením stejného vzorku za stejných podmínek. Přesnost byla určena na vzorku slin s koncentrací kortizolu odpovídající referenčním hodnotám a na vzorcích slin s přidavkem kortizolu o jeho výsledné koncentraci vyšší než referenční hodnoty. Kvůli tomu, že nebyly k dispozici sliny s koncentrací kortizolu nižší než referenční hodnoty, byla přesnost při této koncentraci určena na roztoku standardu kortizolu ve vodě o koncentraci nižší než referenční, ale vyšší než nejnižší bod kalibrace. Celý postup byl proveden dvakrát ve dvou různých dnech pro určení přesnosti mezi sériemi.

Míra přesnosti v sérii je udána variačním koeficientem (CV), který se vypočítá podle vztahů:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$

$$CV [\%] = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

kde SD je směrodatná odchylka, AVG aritmetický průměr,  $x_i$  naměřená hodnota, n celkový počet měření.

### 2.5.6.2 Výtěžnost metody a účinky matrice

Pro určení výtěžnosti metody byly ředěním pracovního roztoku vnitřního standardu I (1000 ng/ml) methanolem připraveny roztoky IS o koncentraci 50 a 250 ng/ml. K 750 ml slin bylo přidáno 20  $\mu$ l roztoku IS o koncentraci 50, 250 a 1000 ng/ml, čímž byly získány roztoky IS ve slinách o výsledné koncentraci 1, 5 a 20 ng/ml. Ke vzorkům byly přidány 3 ml ethylacetátu a byly dále zpracovány stejně jako v části 2.5.1. Dále bylo do tří čistých zkumavek napipetováno 750  $\mu$ l slin, byly přidány 3 ml ethylacetátu a byla provedena extrakce stejně jako v části 2.5.1. Po extrakci bylo k odebrané organické fázi přidáno 20  $\mu$ l roztoku IS o koncentraci 50, 250 a 1000 ng/ml, vzorky byly dále zpracovány stejně jako v části 2.5.1. Všechny vzorky byly zpracovány v triplikátu. Pro jednotlivé trojice vzorků byly zprůměrovány plochy píků vnitřního standardu a byla spočítána výtěžnost (R) podle vztahu:

$$R [\%] = \frac{A_{před}}{A_{po}} \cdot 100$$

kde  $A_{před}$  je plocha píku IS přidaného před extrakcí,  $A_{po}$  plocha píku IS přidaného po extrakci.

Pro otestování účinků matrice byly použity plochy píků IS přidaného ke slinám po extrakci. Dále bylo do dvou čistých zkumavek napipetováno 750  $\mu$ l slin od jiných dobrovolníků než pro výtěžnost, byly přidány 3 ml ethylacetátu a provedena extrakce stejně jako v části 2.5.1. Po extrakci bylo k odebrané organické fázi přidáno 20  $\mu$ l roztoku IS o koncentraci 50 a 1000 ng/ml, a vzorky byly dále zpracovány stejně jako v části 2.5.1. Dále bylo do čistých zkumavek napipetováno 20  $\mu$ l roztoku IS o koncentraci 50, 250 a 1000 ng/ml (vzorky IS v čistém rozpouštědle), roztoky byly odpařeny pod proudem dusíku a dále zpracovány jako v části 2.5.1. Všechny vzorky byly zpracovány v triplicátu. Pro každou trojici vzorků byla zprůměrována plocha píků vnitřního standardu a byly spočítány matricové efekty podle vztahu:

$$\text{Matricové efekty [\%]} = \frac{A_{vz}}{A_{IS}} \cdot 100$$

kde  $A_{vz}$  je plocha píku IS ve slinách,  $A_{IS}$  plocha píku IS v čistém rozpouštědle.

### 2.5.6.3 Linearita

Linearita, mez detekce a stanovitelnosti byly určeny z dat získaných z kalibračních přímek. Mez detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány podle vztahů:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_a}{b}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_a}{b}$$

kde  $S_a$  je směrodatná odchylka interceptu,  $b$  průměrná směrnice.

### 2.5.7 Zpracování výsledků

K vyhodnocení záznamů a zpracování výsledků byly použity programy LabSolutions (Shimadzu, Kjóto, Japonsko), Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o., Praha, ČR) a MS Excel.

### 3 Výsledky a diskuze

Kortizol bývá běžně stanovován v séru, což má řadu nevýhod, mezi něž patří nutnost invazivního odběru krve a že hladina celkového kortizolu v séru závisí na množství vazebných proteinů a nemusí tedy odrážet biologický účinek kortizolu. Stanovení volného kortizolu je v rutinní praxi obtížné kvůli časově náročnému odstranění vázaného kortizolu. Odběr slin je neinvazivní a nemusí ho provádět vyškolený personál. Oproti jiným biologickým vzorkům (např. moči) odráží hladina kortizolu ve slinách biologicky účinnou formu [17-19]. Imunochemické metody používané pro stanovení kortizolu v séru nejsou pro analýzu ve slinách dostatečně citlivé, jelikož koncentrace kortizolu ve slinách je asi 100x nižší než koncentrace celkového kortizolu v séru (Tabulka 1). Pro stanovení kortizolu ve slinách je tak zapotřebí více citlivá a specifická metoda, jako je například HPLC-MS/MS [17-19].

K odběru slin jsme zvolili plivání do zkumavek. Tato metoda je levná a dostupná v porovnání s použitím různých odběrových zařízení a je při ní také menší riziko interferencí [20]. Aby se snížila viskozita slin, je nutné vzorek zmrazit a poté rozmrazit. Kortizol jsme extrahovali metodou LLE, která je jednodušší a finančně méně náročná než SPE [23]. Pro analýzu jsme používali 750  $\mu$ l vzorku slin, při tomto objemu byla metoda dostatečně citlivá, ve všech vzorcích slin byl kortizol kvantifikován.

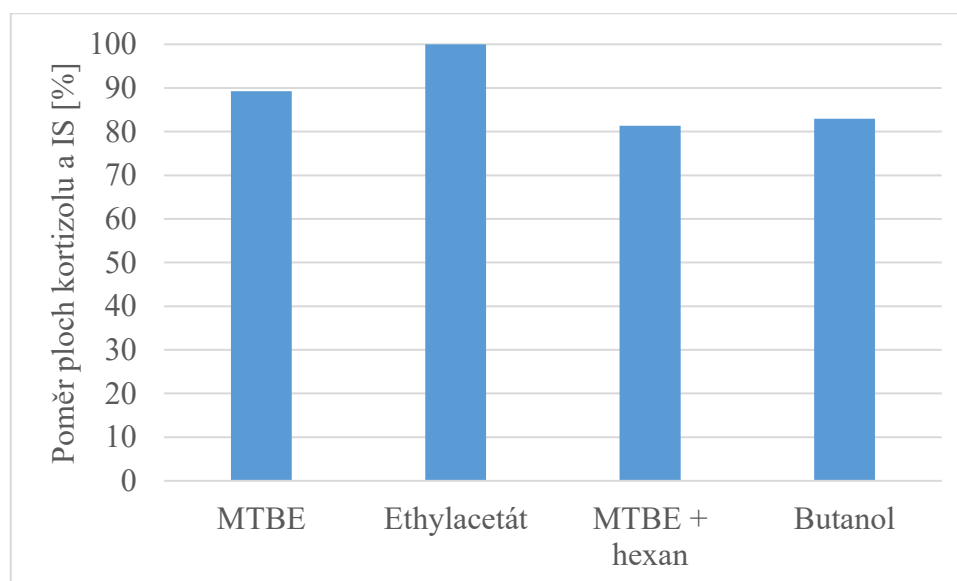
#### 3.1 Optimalizace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Jako mobilní fáze byla testována směs vody s methanolem nebo acetonitrilem v izokratických podmínkách (50 % organického rozpouštědla) a při použití gradientu. Pro optimalizaci složení mobilní fáze, při které by byly kortizol a vnitřní standard dostatečně separovány v co nejkratším čase a s co nejvyšší intenzitou signálu byly použity směsný roztok standardu kortizolu a IS (10 ng/ml) a vzorek slin. Při použití acetonitrilu jako mobilní fáze byla intenzita píků kortizolu a IS asi 10x nižší než v případě použití methanolu (Příloha 1 a 2) a kortizol v koncentracích běžných pro sliny nebyl detegován. Z tohoto důvodu byl jako organický modifikátor nadále používán jen methanol. Jako aditivum, které podporuje ionizaci kortizolu, jsme používali kyselinu mravenčí (0,1%) [23]. Vzhledem k nepolární povaze kortizolu byla pro jeho separaci zvolena kolona s vázanou reverzní fází (C18). Pro dosažení optimální separace v co nejkratším čase byly testovány jak izokratická (methanol/voda 1:1, v/v), tak gradientová eluce. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s mobilní fází a gradientovou elucí popsané v části 2.5.2. Dále byl optimalizován dávkovaný objem vzorku, tak aby byla získána co nejvyšší intenzita píků.

Stejně jako ve většině jiných prací [25-27], i zde byla použita ionizace elektrosprejem a detekce iontů trojitým kvadrupólem pracujícím v MRM módu. Při optimalizaci podmínek hmotnostní spektrometrie byla testována ionizace v pozitivním i negativním módu analýzou roztoku kortizolu a deuterovaného kortizolu v acetonitrilu v režimu SCAN. Při použití negativního módu byl některými autory dosažen lepší poměr signálu k šumu [23, 63], my jsme v negativním módu analytický signál nezaznamenali, a proto jsme nadále pracovali v pozitivním módu. Softwarem byly optimalizovány MRM přechody, které byly dále používány k analýze kortizolu a vnitřního standardu (Tabulka 3, kapitola 2.5.2). Většina získaných přechodů se shoduje s přechody použitými jinými autory [25, 29]. V některých pracích byl ale využit jiný vedlejší MRM přechod [24, 74]. Softwarem byla pro každý přechod také optimalizována kolizní energie a usměřovací napětí na obou kvadrupólech, optimalizované hodnoty jsou uvedeny v kapitole 2.5.2 v Tabulce 3.

### 3.2 Výběr vhodného extrakčního činidla

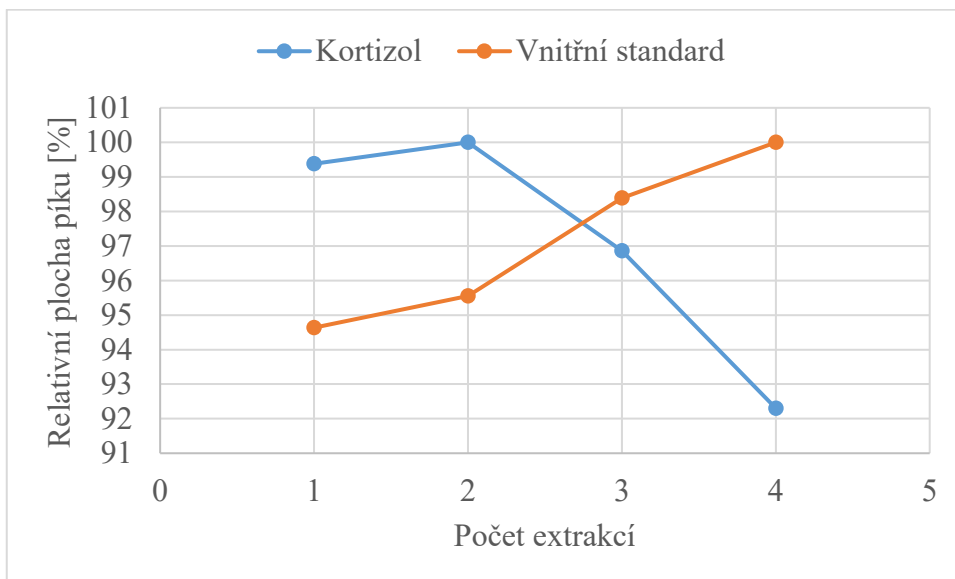
Běžně používanými činidly pro extrakci kortizolu ze slin jsou MTBE [25], směs MTBE a hexanu [29], směs ethylacetátu a butanolu [74] a dichlormethan [63]. My jsme pro testování nejvhodnějšího extrakčního činidla zvolili MTBE, směs MTBE a hexanu (8:2, v/v), ethylacetát, směs ethylacetátu a butanolu (1:1, v/v) a butanol. V Grafu 1 je znázorněn poměr ploch pík kortizolu a vnitřního standardu při extrakci různými činidly, nejlepší výsledky bylo dosaženo při extrakci ethylacetátem. Směs ethylacetátu a butanolu poskytovala nereprodukovatelné výsledky.



Graf 1. Porovnání extrakčních činidel; MTBE, methyl-*terc*-butylether

### 3.3 Optimalizace počtu extrakcí

Bylo zjišťováno, zda vícenásobná extrakce povede k zvýšení signálu pro kortizol a vnitřní standard. V Grafu 2 je zobrazena závislost relativní plochy píku kortizolu a vnitřního standardu na počtu extrakcí. Při použití vícenásobné extrakce nedošlo k významnému zvýšení signálu pro kortizol a IS, a proto byla nadále používána pouze jednonásobná extrakce.



Graf 2. Závislost relativní plochy píku kortizolu a vnitřního standardu na počtu extrakcí

### 3.4 Analytické parametry metody

#### 3.4.1 Přesnost metody

V Tabulce 5 jsou uvedeny variační koeficienty přesnosti stanovení kortizolu ve vzorcích slin s různou koncentrací kortizolu. Přesnost metody byla určena v rámci jednoho dne a mezi dvěma dny. Pro určení přesnosti mezi dny byla pro každý den spočítána průměrná koncentrace kortizolu, a z těchto hodnot byly vypočítány hodnoty uvedené v Tabulce 5.



Tabulka 5. Přesnost stanovení kortizolu

AVG [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV [%]
<b>V jednom dni</b>		
0,87	0,059	6,8
2,11	0,065	3,1
5,99	0,239	4,0
27,66	0,945	3,4
<b>Ve dvou dnech</b>		
0,81	0,053	6,5
1,93	0,187	9,7
6,10	0,112	1,8
25,20	2,463	9,8

AVG, průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient

### 3.4.2 Výtěžnost metody a účinky matrice

K určení výtěžnosti a účinku matrice je nejčastěji používán přídavek kortizolu do vzorku slin [29, 63]. Nelze ale jednoduše získat vzorek slin bez přítomnosti kortizolu, proto jsme k určení účinku matrice a výtěžnosti použili přídavek vnitřního standardu (deuterovaný kortizol), který se ve slinách nevyskytuje a chová se při stanovení stejně jako kortizol. Účinky matrice byly určeny stejným způsobem jako v jedné z publikovaných prací [28]. V Tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty výtěžnosti a účinky matrice pro různé koncentrace kortizolu ve vzorku, účinky matrice byly určeny pro dva různé vzorky slin (od různých dobrovolníků).

Tabulka 6. Výtěžnost metody a účinky matrice při stanovení kortizolu

Koncentrace [ng/ml]	Výtěžnost [%]	Účinky matrice (vzorek 1) [%]	Účinky matrice (vzorek 2) [%]
1	98,4	96,4	98,8
5	101,3	103,7	-
20	94,4	109,1	99,9

### 3.4.3 Linearita

V Tabulce 7 jsou uvedena data 5 kalibračních křivek pro stanovení kortizolu. V příloze 3 a 4 jsou chromatografické záznamy kalibračních standardů kortizolu ve vodě a vzorku slin. Hodnoty meze detekce a stanovitelnosti jsou v porovnání s jinými autory zabývajícími se stanovením kortizolu ve slinách metodou HPLC-MS/MS většinou horší (kapitola 1.5.2, Tabulka 2).

Tabulka 7. Data pěti kalibračních křivek pro stanovení kortizolu ve slinách

<b>S<sub>a</sub> [ng/ml]</b>	<b>b</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD [ng/ml]</b>	<b>LOQ [ng/ml]</b>
0,0134	0,4527	0,9996	0,10	0,29

S<sub>a</sub>, směrodatná odchylka interceptu; b, průměrná směrnice; R<sup>2</sup>; průměrná hodnota korelačních koeficientů; LOD, mez detekce; LOQ, mez stanovitelnosti

### 3.5 Stanovení kortizolu ve vzorcích slin

Od dobrovolníků bylo získáno 38 vzorků slin, vzorky byly analyzovány postupem uvedeným v části 2.5.1. V Tabulce 8 jsou uvedeny výsledky stanovení kortizolu ve vzorcích slin dobrovolných dárců. Charakteristika jednotlivých vzorků a jim odpovídající koncentrace kortizolu jsou uvedeny v příloze 6. V příloze 5 je chromatogram reálného vzorku slin. t-Testem byly testovány rozdíly v koncentraci kortizolu u mužů a žen, z výsledků vyplívá, že koncentrace kortizolu se u mužů a žen významně neliší ( $p = 0,592$ ). Dále byla zjišťována závislost hladin kortizolu na věku dobrovolných dárců. Závislost hladiny kortizolu ve vzorcích slin na věku dobrovolných dárců nebyla statisticky významná ( $R = 0,173$ ,  $p = 0,298$ ), což je v souladu s některými literárními údaji [24, 64], ale ve dvou studiích byla nalezena vyšší hladina kortizolu v noci (23:00 [65], 24:00 [75]) u osob nad 70 let [65] a nad 50 let [75], tyto výsledky ale nelze s našimi výsledky přímo srovnávat, protože jsme nestandardizovali dobu odběru vzorků.

Tabulka 8. Hladiny kortizolu ve vzorcích slin dobrovolných dárců

<b>Vzorky</b>	<b>IQR [ng/ml]</b>	<b>Medián [ng/ml]</b>
Všechny	1,21	0,98
Muži	0,87	0,98
Ženy	1,41	1,00

IQR, mezikvartilový rozptyl

### 3.6 Vliv fyzické zátěže na hladinu kortizolu ve slinách

Pro testování vlivu fyzické zátěže na hladinu kortizolu ve slinách, bylo 6 dobrovolníků vystaveno fyzické zátěži (jízda na rotopedu po dobu 30 minut). Způsob odběru slin a zpracování vzorku slin jsou uvedeny v experimentální části. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 9. U tří dobrovolníků výsledky ukazují nárůst hladiny kortizolu po zátěži a její opětovný pokles 1 h po zátěži, což odpovídá výsledkům jiných studií [72, 73]. U dalších tří dobrovolníků nebyla během zátěže zaznamenána znatelná změna hladiny kortizolu. Důvody mohou být různé, různá trénovanost jedinců, účinek stresu a jiné. Je zapotřebí zátěž standardizovat a přesně definovat. Navíc soubor počtu dobrovolníků je velmi malý, a proto nelze dělat žádné závěry. Autoři, kteří se zabývali vlivem fyzické zátěže na hladinu kortizolu ve slinách, definovali zátěž z předem stanovené výkonnosti, vyjádřenou hodnotou  $VO_{2max}$  (maximální spotřeba kyslíku) [72, 73].

Tabulka 9. Vliv fyzické zátěže na hladinu kortizolu

Dobrovolník #	Koncentrace kortizolu [ng/ml]		
	Před zátěží	Hned po zátěži	1 h po zátěži
1	0,86	2,92	1,29
2	1,42	0,89	1,40
3	0,92	1,26	0,94
4	1,92	1,00	0,53
5	2,44	2,33	1,24
6	0,84	1,42	1,15

## 4 Závěr

Cílem této práce bylo zavést a validovat metodu pro stanovení hladin kortizolu ve vzorcích slin technikou HPLC-MS/MS. Kortizol společně s deuterovaným kortizolem (vnitřní standard) byly ze vzorku slin extrahovány ethylacetátem. Kortizol a vnitřní standard byly separovány na koloně s vázanou reverzní fází (C18) gradientovou elucí s mobilní fází voda/methanol obsahující 0,1 % kyselinu mravenčí. Kortizol a vnitřní standard byly ionizovány elektrosprejem a ionty analyzovány trojitým kvadrupólem v módu MRM. Použitelnost metody v klinické praxi byla ověřena stanovením hladin kortizolu ve vzorcích slin 38 dobrovolných dárců. Výsledky naznačují, že metoda je vhodná pro stanovení koncentrace kortizolu ve vzorcích slin lidí a naměřené koncentrace jsou porovnatelné s koncentracemi uváděnými jinými autory. Metodu jsme také použili pro monitorování hladin kortizolu během fyzické zátěže, což je hlavní aplikační oblast námi vyvinuté metody. Odběr vzorku slin je neinvazivní a lze ho opakovat několikrát v krátkém časovém období, což je u vzorků krve jen těžko proveditelné. Námi prezentovaná metoda má potenciál monitorovat fyzickou, ale i psychickou zátěž analýzou kortizolu ve vzorcích slin, které lze od sledované osoby získat opakovaně a neinvazivním způsobem odběru.

## 5 Použitá literatura

1. GREENSPAN, F. S., BAXTER, J. D. *Základní a klinická endokrinologie*, Praha: H & H 2003. ISBN 80-86022-56-0.
2. JAMESON, J. L., DE GROOT, L. J. *Endocrinology: Adult and Pediatric*, Elsevier 2016. ISBN 978-0-323-18907-1.
3. SCHIFFER, L., BARNARD, L., BARANOWSKI, E. S., GILLIGAN, L. C., TAYLOR, A. E., ARLT, W., SHACKLETON, C. H. L., STORBECK, K. H. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2019, 194.
4. TIMMERMANS, S., SOUFFRIAU, J., LIBERT, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in immunology*, 2019.
5. ROSE, A. J., HERZIG, S. Metabolic control through glucocorticoid hormones: an update. *Molecular and cellular endocrinology*, 2013, 380(1 – 2), s. 65 – 78.
6. DE GUIA, R. M., Stress, glucocorticoid signaling pathway, and metabolic disorders. *Diabetes & metabolic syndrome*, 2020, 14(5), s. 1273 – 1280.
7. KUO, T., MCQUEEN, A., CHEN, T. C., WANG, J. C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Advances in experimental medicine and biology*, 2015, 872, s. 99 – 126.
8. PECKETT, A. J., WRIGHT, D. C., RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*, 2011, 60(11), s. 1500 – 1510.
9. BASCHANT, U., TUCKERMANN, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2010, 120(2 – 3), s. 69 – 75.
10. BARBOT, M., ZILIO, M., SCARONI, C. Cushing's syndrome: Overview of clinical presentation, diagnostic tools and complications. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 2020, 34(2).
11. ARNALDI, G., MANCINI, T., TIRABASSI, G., TREMENTINO, L., BOSCARO, M. Advances in the epidemiology, pathogenesis, and management of Cushing's syndrome complications. *Journal of endocrinological investigation*, 2012, 35(4), s. 434 – 448.
12. LACROIX, A., FEELDERS, R. A., STRATAKIS, C. A., NIEMAN, L. K. Cushing's syndrome. *Lancet*, 2015, 386(9996), s. 913 – 927.

13. MARTIN-GRACE, J., DINEEN, R., SHERLOCK, M., THOMPSON, C. J. Adrenal insufficiency: Physiology, clinical presentation and diagnostic challenges. *Clinica chimica acta*, 2020, 505, s. 78 – 91.
14. HUSEBYE, E. S., PEARCE, S. H., KRONE, N. P., KÄMPE, O. Adrenal insufficiency. *Lancet*, 2021, 397(10274), s. 13 – 19.
15. RAFF, H., SHARMA, S. T., NIEMAN, L. K. Physiological basis for the etiology, diagnosis, and treatment of adrenal disorders: Cushing's syndrome, adrenal insufficiency, and congenital adrenal hyperplasia. *Comprehensive Physiology*, 2014, 4(2), s. 739 – 769.
16. AHN, S. W., KIM, T. Y., LEE, S., JEONG, J. Y., SHIM, H., HAN, Y. M., CHOI, K. E., SHIN, S. J., YOON, H. E. Adrenal insufficiency presenting as hypercalcemia and acute kidney injury. *International medical case reports journal*, 2016, 9, s. 223 – 226.
17. CASALS, G., HANZU, F. A. Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry? *Annals of laboratory medicine*, 2020, 40(4), s. 285 – 296.
18. EL-FARHAN, N., REES, D. A., EVANS, C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva - are our assays good enough? *Annals of clinical biochemistry*, 2017, 54(3), s. 308 – 322.
19. TURPEINEN, U., HÄMÄLÄINEN, E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 2013, 27(6), s. 795 – 801.
20. BELLAGAMBI, F. G., LOMONACO, T., SALVO, P., VIVALDI, F., HANGOUET, M., GHIMENTI, S., BIAGINI, D., DI FRANCESCO, F., FUOCO, R., ERRACHID, A. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *Trends in analytical chemistry*, 2020, 124.
21. GREFF, M. J. E., LEVINE, J. M., ABUZGAIA, A. M., ELZAGALLAAI, A. A., RIEDER M. J., VAN UUM S. H. M. Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. *Clinical biochemistry*, 2019, 63, s. 1 – 9.
22. HODES, A., MEYER, J., LODISH, M. B., STRATAKIS, C. A., ZILBERMINT, M. Mini-review of hair cortisol concentration for evaluation of Cushing syndrome. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 2018, 13(5), s. 225 – 231.
23. HAWLEY, J. M., KEEVIL, B. G. Endogenous glucocorticoid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in routine clinical laboratories. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2016, 162, s. 27 – 40.
24. BAKUSIC, J., DE NYS, S., CRETA, M. Study of temporal variability of salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS using a new atmospheric pressure ionization source. *Scientific reports*, 2019, 9(1).

25. CHEN, B., LYU, H., XU, X., WANG, CH. Simultaneous quantification of cortisol and cortisone in serums and saliva from depressive patients by supported liquid extraction coupled to HPLC–MS/MSs. *Acta chromatographica*, 2020, 32(4), s 296 – 275.
26. MAGDA, B., DOBI, Z., MESZAROS, K., SZABO, E., MARTA, Z., IMRE, T., SZABO, P. T. 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 biochemical and biomedical analysis*, 2017, 140, s. 223 – 231.
27. MÉSZÁROS, K., KARVALY, G., MÁRTA, Z., MAGDA, B., TÓKE, J., SZÜCS, N., TÓTH, M., RÁCZ, K., PATÓCS, A. Diagnostic performance of a newly developed salivary cortisol and cortisone measurement using an LC-MS/MS method with simple and rapid sample preparation. *Journal of endocrinological investigation*, 2018, 41(3), s. 315 – 323.
28. MONTSKÓ, G., TARJÁNYI, Z., MEZŐSI, E., KOVÁCS, G. L. A validated method for measurement of serum total, serum free, and salivary cortisol, using high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution ESI-TOF mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014, 406(9 – 10), s. 2333 – 2341.
29. ALVI, S. N., HAMMAMI, M. M. A Simple Ultrapformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Measurement of Cortisol Level in Human Saliva. *International journal of analytical chemistry*, 2019.
30. WOODS, A. G., DARIE, C. C. *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, Springer 2019. ISBN 978-3-030-15950-4.
31. KOSICKA, K., SIEMIĄTKOWSKA, A., SZPERA-GOŹDZIEWICZ, A., KRZYŚCIN, M., BRĘBOROWICZ, G., GŁÓWKA, F. High-performance liquid chromatography methods for the analysis of endogenous cortisol and cortisone in human urine: comparison of mass spectrometry and fluorescence detection. *Annals of clinical biochemistry*, 2019, 56(1), s. 82 – 89.
32. CHEN, L. Q., KANG, X. J., SUN, J., DENG, J. J., GU, Z. Z., LU, Z. H. Application of nanofiber-packed SPE for determination of salivary-free cortisol using fluorescence precolumn derivatization and HPLC detection. *Journal of separation science*, 2010, 33(15), s. 2369 – 2375.
33. GŁÓWKA, F. K., KOSICKA, K., KARAŻNIEWICZ-ŁADA, M. HPLC method for determination of fluorescence derivatives of cortisol, cortisone and their tetrahydro- and allo-tetrahydro-metabolites in biological fluids. *Journal of chromatography B*, 2010, 878(3 – 4), s. 283 – 289.

34. GAO, W., XIE, Q., JIN, J., QIAO, T., WANG, H., CHEN, L., DENG, H., LU, Z. HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clinical biochemistry*, 2010, 43(7 – 8), s. 677 – 682.
35. ZHENG, L., LUO, X., ZHU, L., XIE, W., LIU, S., CHENG, Z. Simultaneous determination of cortisol, cortisone, 6 $\beta$ -hydroxycortisol and 6 $\beta$ -hydroxycortisone by HPLC. *Journal of chromatographic science*, 2015, 53(4), s. 451 – 455.
36. SARACINO, M. A., IACONO, C., SOMAINI, L., GERRA, G., GHEDINI, N., RAGGI, M. A. Multi-matrix assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined MEPS-HPLC procedure. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2014, 88, s. 643 – 648.
37. KOYAMA, Y., HOMMA, K., MURATA, M., SHIBATA, H., ITOH, H., HASEGAWA, T. Free cortisol/cortisone ratio in pooled urine was increased after rapid-ACTH stimulation test under dexamethasone suppression. *Endocrine journal*, 2011, 58(12), s. 1099 – 1103.
38. WOOD, L., DUCROQ, D. H., FRASER, H. L., GILLINGWATER, S., EVANS, C., PICKETT, A. J., REES, D. W., JOHN, R., TURKES, A. Measurement of urinary free cortisol by tandem mass spectrometry and comparison with results obtained by gas chromatography-mass spectrometry and two commercial immunoassays. *Annals of clinical biochemistry*, 2008, 45, s. 380 – 388.
39. CUZZOLA, A., PETRI, A., MAZZINI, F., SALVADORI, P. Application of hyphenated mass spectrometry techniques for the analysis of urinary free glucocorticoids. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2009, 23(18), s. 2975 – 2982.
40. KAWAGUCHI, M., TAKATSU, A. 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*, 2009, 25(8), s. 989 – 992.
41. OLEDZKA, I., PLENIS, A., KONIECZNA, L., KOWALSKI, P., BACZEK, T. Micellar electrokinetic chromatography for the determination of cortisol in urine samples in view of biomedical studies. *Electrophoresis*, 2010, 31(14), s. 2356 – 2364.
42. NAIDEN, S. V., KARTSOVA, L. A., EMEL'YANOV, G. A. A new fluorinated polymer as a modifier for liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of analytical chemistry*, 2015, 70(6), s. 752 – 756.
43. FLOR, S., LUCANGIOLI, S., CONTIN, M., TRIPODI, V. Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2010, 31(19), s. 3305 – 3313.



44. KARTSOVA, L. A., BESSONOVA, E. A. Determination of steroids in biological samples by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of analytical chemistry*, 2007, 62(1), s. 68 – 75.
45. YE, F. G., YANG, T. Z., HUANG, Y., LI, S. T., ZHAO, S. L. Homogeneous immunoassay of cortisol based on microchip electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytical methods*, 2013, 5(20), s. 5657 – 5661.
46. KAUSHIK, A., VASUDEV, A., ARYA, S. K., PASHA, S. K., BHANSALI, S. Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application. *Biosensor & bioelectronics*, 2014, 53, s. 499 – 512.
47. APILUX, A., RENGPIPAT, S., SUWANJANG, W., CHAILAPAKUL, O. Development of competitive lateral flow immunoassay coupled with silver enhancement for simple and sensitive salivary cortisol detection. *EXCLI journal*, 2018, 17, s. 1198 – 1209.
48. SAFARIAN, S. M., KUSOV, P. A., KOSOLOBOV, S. S., BORZENKOVA, O. V., KHAKIMOV, A. V., KOTELEVTSSEV, Y. V., DRACHEV, V. P. Surface-specific washing-free immunosensor for time-resolved cortisol monitoring. *Talanta*, 2021, 225.
49. ZEA, M., BELLAGAMBI, F. G., BEN HALIMA, H., ZINE, N., JAFFREZIC-RENAULT, N., VILLA, R., GABRIEL, G., ERRACHID, A. Electrochemical sensors for cortisol detections: Almost there. *Trac-trends in analytical chemistry*, 2020, 132.
50. KÄMÄRÄINEN, S., MÄKI, M., TOLONEN, T., PALLESCHI, G., VIRTANEN, V., MICHELI, L., SESAY, A. M. Disposable electrochemical immunosensor for cortisol determination in human saliva. *Talanta*, 2018, 188, s. 50 – 57.
51. GIACOMELLO, G., SCHOLTEN, A., PARR, M. K. Current methods for stress marker detection in saliva. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2020, 191.
52. VILLA, J. E. L., GARCIA, I., JIMENEZ DE ABERASTURI, D., PAVLOV, V., SOTOMAYOR, M. D. P. T., LIZ-MARZÁN, L. M. SERS-based immunoassay for monitoring cortisol-related disorders. *Biosensors & bioelectronics*, 2020, 165.
53. MOORE, T. J., SHARMA, B. Direct Surface Enhanced Raman Spectroscopic Detection of Cortisol at Physiological Concentrations. *Analytical chemistry*, 2020, 92(2), s. 2052 – 2057.
54. DALIRIRAD, S. STECKL, A. J. Aptamer-based lateral flow assay for point of care cortisol detection in sweat. *Sensors and actuators B-chemical*, 2019, 283, s. 79 – 86.
55. PUSOMJIT, P., TEENGAM, P., THEPSUPARUNGSIKUL, N., SANONGKIET, S., CHAILAPAKUL, O. Impedimetric determination of cortisol using screen-printed electrode with aptamer-modified magnetic beads. *Microchimica acta*, 2021, 188(2).

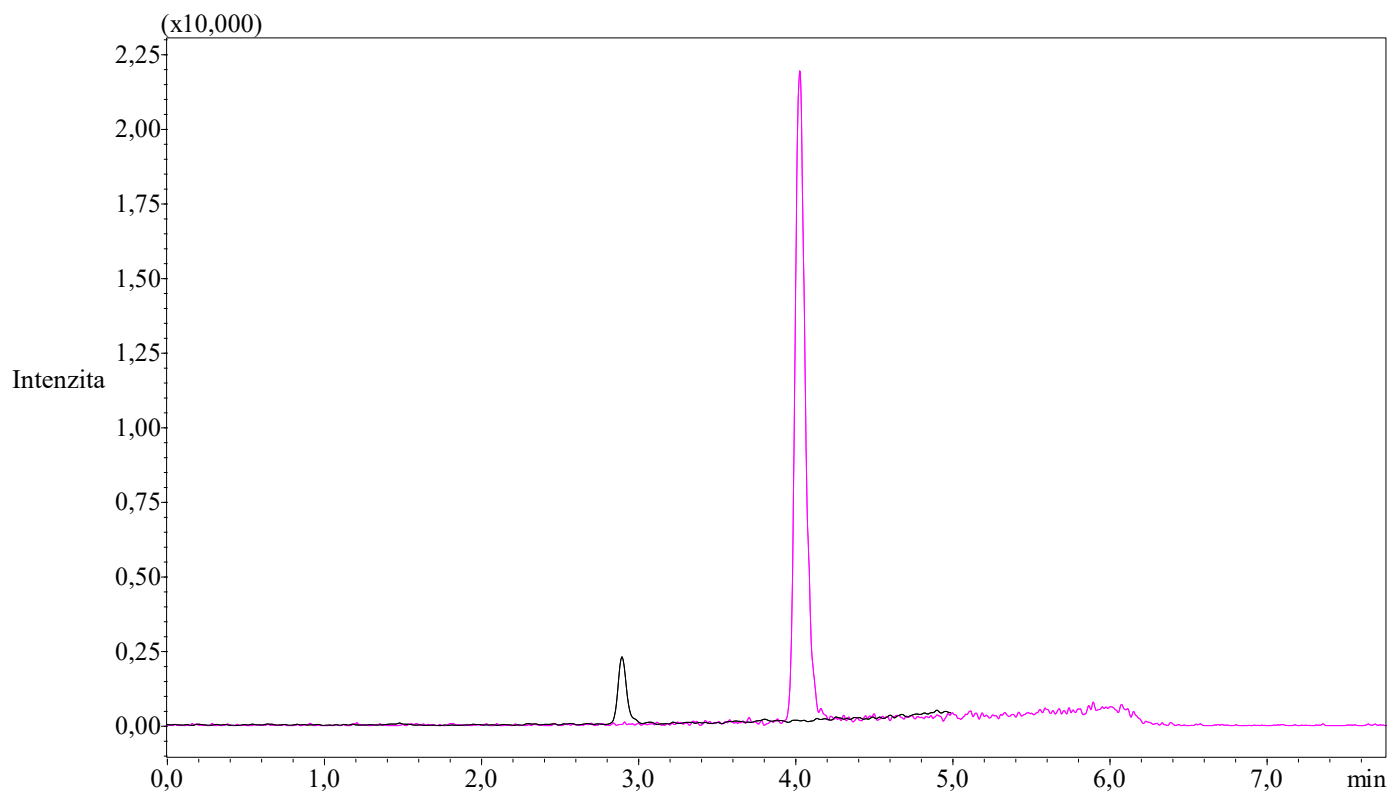
56. MANICKAM, P. PASHA, S. K. SNIPES, S. A. BHANSALI, S. A. Reusable Electrochemical Biosensor for Monitoring of Small Molecules (Cortisol) Using Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of electrochemical society*, 2017, 164(2), s. 54 – 59.
57. SUDA, N., SUNAYAMA, H., KITAYAMA, Y., KAMON, Y., TAKEUCHI, T. Oriented, molecularly imprinted cavities with dual binding sites for highly sensitive and selective recognition of cortisol. *Royal Society open science*, 2017, 4(8).
58. INDER, W. J., DIMESKI, G., RUSSELL, A. Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clinical endocrinology*, 2012, 77(5), s. 645 – 651.
59. PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 2016, 70(1), s. 11 – 25.
60. KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*, Grada Publishing 2020. ISBN 978-80-271-1431-3.
61. STRAHLER, J., SKOLUDA, N., KAPPERT, M. B., NATER, U. M. Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 2017, 83, s. 657 – 677.
62. PEDRO, J., BELO, S., GUERREIRO, V., FERREIRA, M. J., SALAZAR, D., COSTA, C., ESTEVES, C., PEREIRA, J., FREITAS, P., CARVALHO, D. Cushing's syndrome: Consequences of late diagnosis after bariatric surgery. *Clinical case reports*, 2020, 8(3), s. 559 – 562.
63. MEZZULLO, M., FANELLI, F., FAZZINI, A., GAMBINERI, A., VICENNATI, V., DI DALMAZI, G., PELUSI, C., MAZZA, R., PAGOTTO, U., PASQUALI, R. Validation of an LC-MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2016, 163, s. 103 – 112.
64. PONZETTO, F., SETTANNI, F., PARASILITI-CAPRINO, M., RUMBOLO, F., NONNATO, A., RICCIARDO, M., AMANTE, E., PRIOLO, G., VITALI, S., ANFOSSI, L., ARVAT, E., GHIGO, E., GIORDANO, R., MENGOZZI, G. Reference ranges of late-night salivary cortisol and cortisone measured by LC-MS/MS and accuracy for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Journal of endocrinological investigation*, 2020, 43(12), s. 1797 – 1806.
65. BÄCKLUND, N., BRATTSAND, G., ISRAELSSON, M., RAGNARSSON, O., BURMAN, P., EDÉN ENGSTRÖM, B., HØYBYE, C., BERINDER, K., WAHLBERG, J., OLSSON, T., DAHLQVIST, P. Reference intervals of salivary cortisol and cortisone and their diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. *European journal of endocrinology*, 2020, 182(6), s. 569 – 582.

66. SNIĘCINSKA-COOPER, A. M., SHAH, A. J., DIMITRIOU, D., ILES, R. K., BUTLER, S. A., BAYFORD, R. Determination of urinary cortisol, cortisone and 6-sulfatoxymelatonin using dilute and shoot ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 2015, 978 – 979, s. 18 – 23.
67. KANNANKERIL, J., CARROLL, T., FINDLING, J. W., JAVORSKY, B., GUNSOLUS, I. L., PHILLIPS, J., RAFF, H. Prospective Evaluation of Late-Night Salivary Cortisol and Cortisone by EIA and LC-MS/MS in Suspected Cushing Syndrome. *Journal of the Endocrine Society*, 2020, 4(10).
68. ARANDA, G., CAREAGA, M., HANZU, F. A., PATRASCIOIU, I., RÍOS, P., MORA, M., MORALES-ROMERO, B., JIMÉNEZ, W., HALPERIN, I., CASALS, G. Accuracy of immunoassay and mass spectrometry urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Pituitary*, 2016, 19(5), s. 496 – 502.
69. PRETORIUS, C. J., GALLIGAN, J. P., MCWHINNEY, B. C., BRISCOE, S. E., UNGERER, J. P. Free cortisol method comparison: ultrafiltration, equilibrium dialysis, tracer dilution, tandem mass spectrometry and calculated free cortisol. *Clinica chimica acta*, 2011, 412(10 – 11), s. 1043 – 1047.
70. PASHA, S. K., KAUSHIK, A., VASUDEV, A., SNIPES, S. A., BHANSALI, S. Electrochemical Immunosensing of Saliva Cortisol. *Journal of the electrochemical society*, 2014, 161(2), s. B3077 – B3082.
71. HINDMARSH, P. C., HONOUR, J. W. Would Cortisol Measurements Be a Better Gauge of Hydrocortisone Replacement Therapy? Congenital Adrenal Hyperplasia as an Exemplar. *International journal of endocrinology*, 2020.
72. HOUGH, J. P., PAPACOSTA, E., WRAITH, E., GLEESON, M. Plasma and salivary steroid hormone responses of men to high-intensity cycling and resistance exercise. *Journal of strength and conditioning research*, 2011, 25(1), s. 23 – 31.
73. POWELL, J., DILEO, T., ROBERGE, R., COCA, A., KIM, J. H. Salivary and serum cortisol levels during recovery from intense exercise and prolonged, moderate exercise. *Biology of sport*, 2015, 32(2), s. 91 – 95.
74. CAO, Z. T., WEMM, S. E., HAN, L., SPINK, D. C., WULFERT, E. Noninvasive determination of human cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019, 411(6), s. 1203 – 1210.

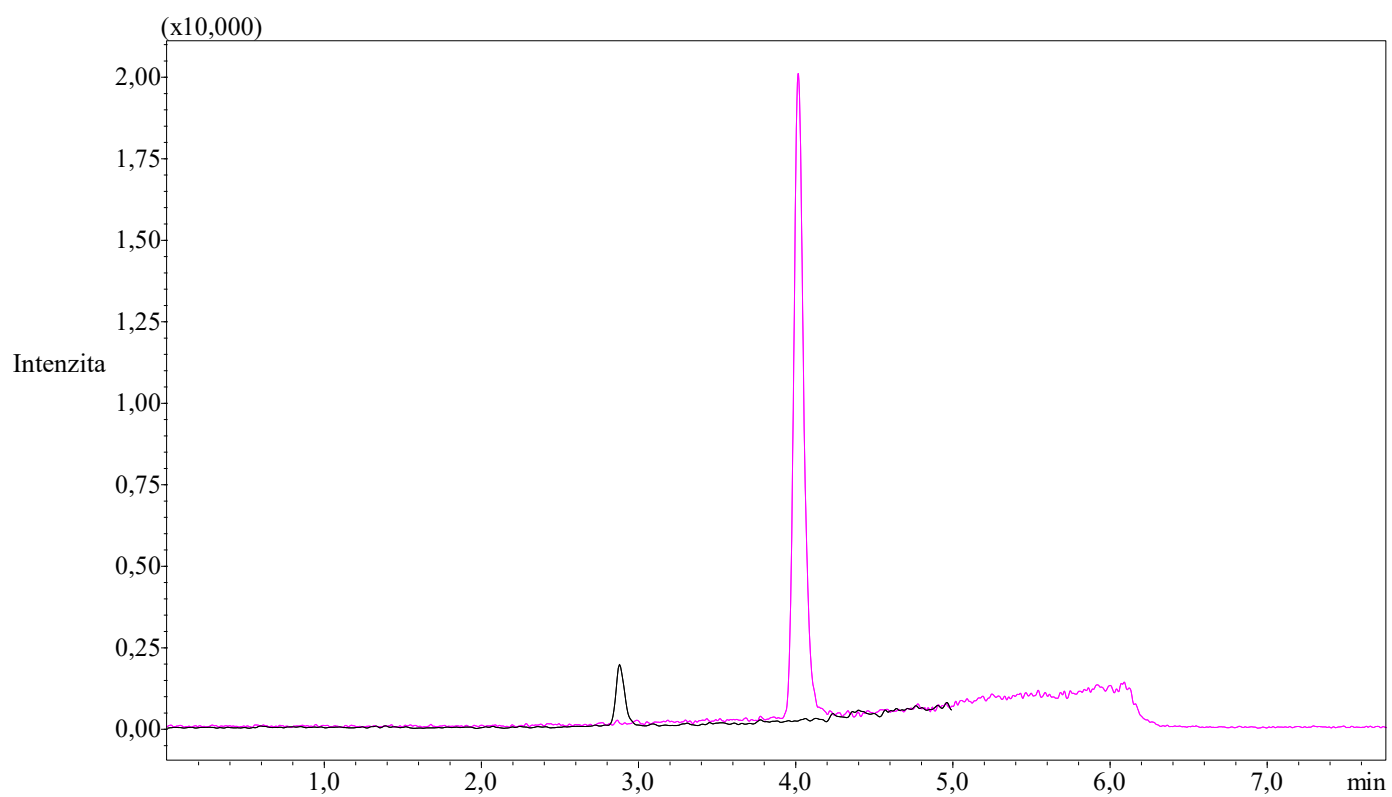
75. COELLI, S., FARIAS, C. B., SOARES, A. A., CRESCENTE, G. M., HIRAKATA, V. N., SOUZA, L. B., CZEPIELEWSKI, M. A., CAMARGO, J. L., SILVEIRO, S. P. Influence of age, gender and body mass index on late-night salivary cortisol in healthy adults. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 2017, 55(12), s. 1954 – 1961.

## 6 Přílohy

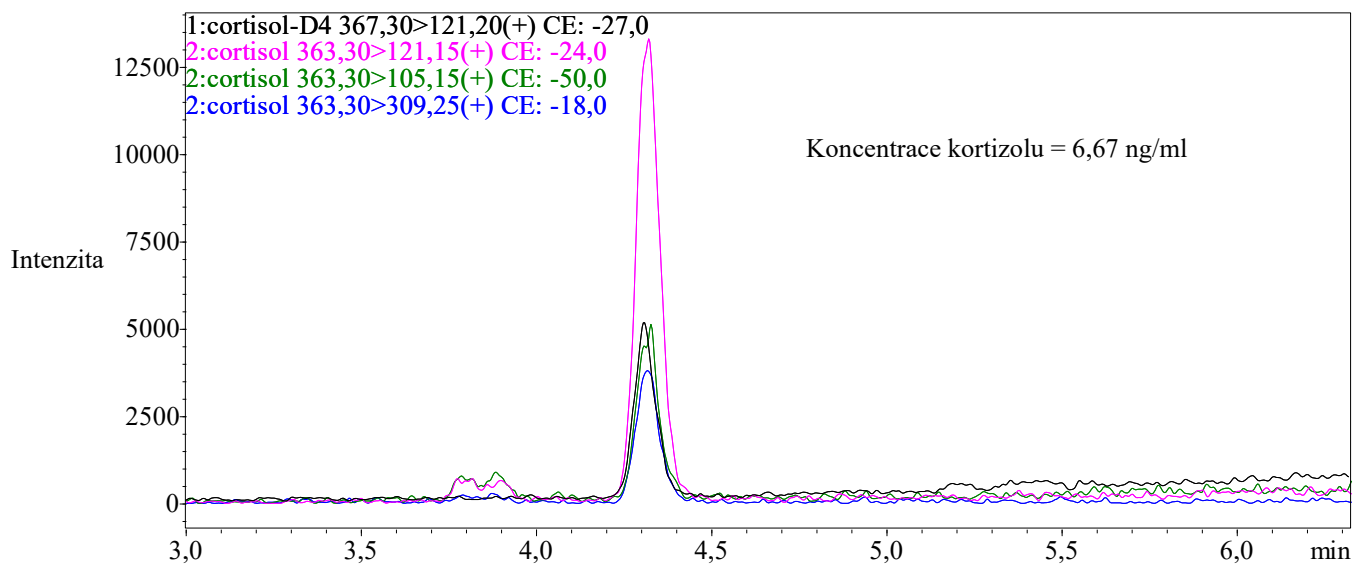
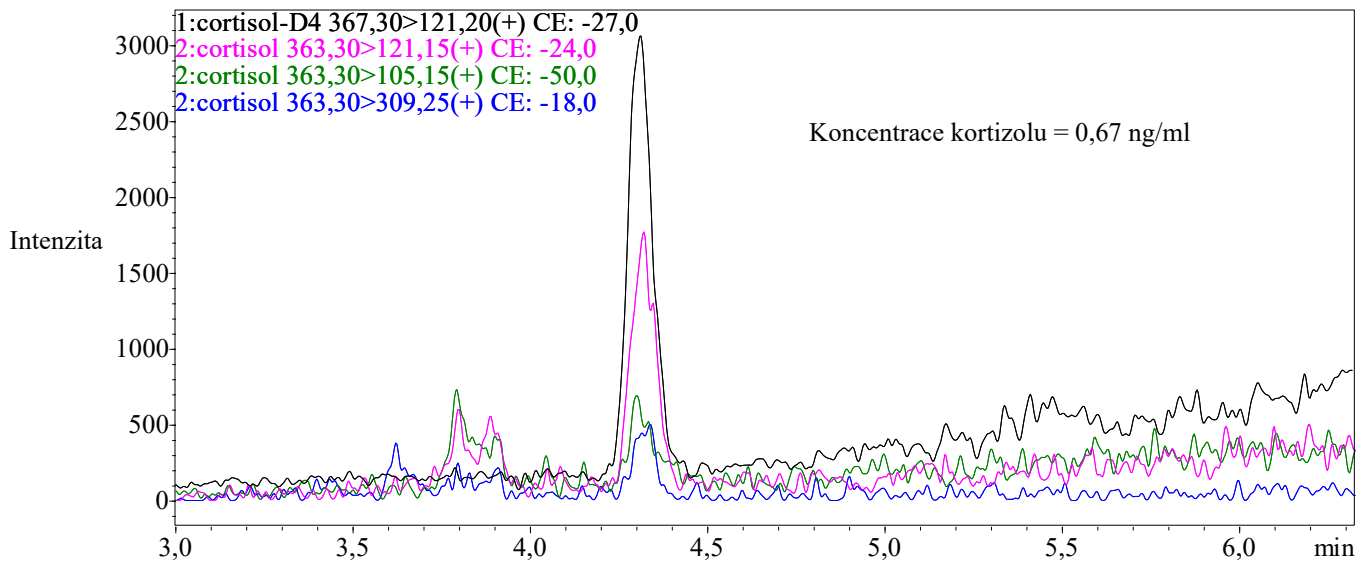
Příloha 1. Chromatografický záznam standardu kortizolu při použití směsi voda/methanol a voda/ acetonitril jako mobilní fáze .....	54
Příloha 2. Chromatografický záznam IS při použití směsi voda/methanol a voda/acetonitril jako mobilní fáze .....	54
Příloha 3. Chromatografický záznam měření kalibračního roztoku kortizolu připraveného ve slinách .....	55
Příloha 4. Chromatografický záznam měření kalibračního roztoku kortizolu připraveného ve vodě.....	56
Příloha 5. Chromatografický záznam měření reálného vzorku slin.....	57
Příloha 6. Charakteristika souboru dobrovolných dárců slin.....	58



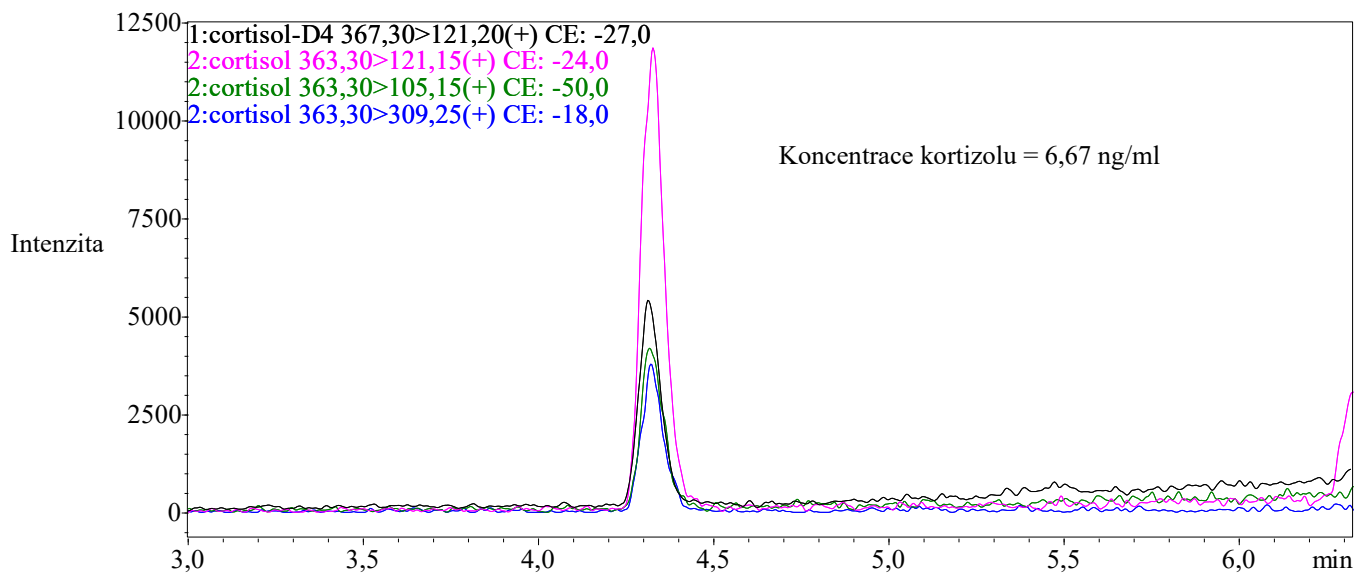
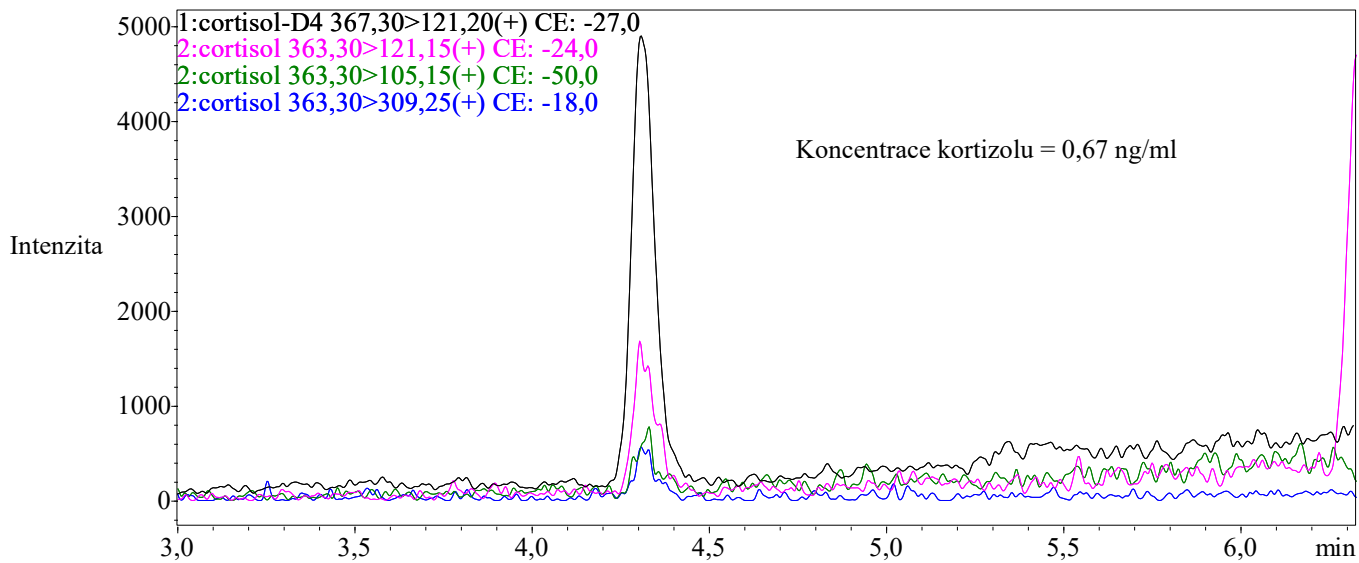
Příloha 1. Chromatografický záznam stanovení kortizolu v roztoku směšného standardu při použití směsi voda/methanol (růžově) a voda/ acetonitril (černě) jako mobilní fáze



Příloha 2. Chromatografický záznam stanovení IS v roztoku směšného standardu při použití směsi voda/methanol (růžově) a voda/acetonitril (černě) jako mobilní fáze

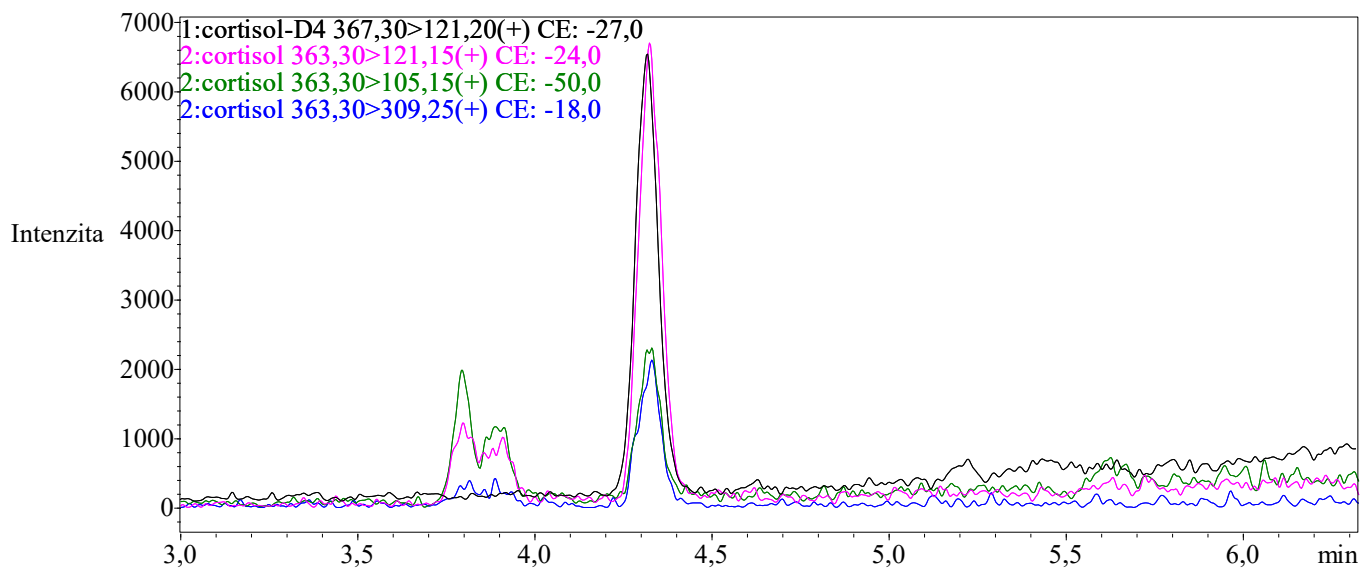


Příloha 3. Chromatografický záznam stanovení kortizolu v kalibračním roztoku kortizolu o dvou různých koncentracích připraveném ve slinách, měření bylo provedeno za optimalizovaných podmínek uvedených v části 2.5.2



Příloha 4. Chromatografický záznam stanovení kortizolu v kalibračním roztoku kortizolu o dvou různých koncentracích připraveném ve vodě, měření bylo provedeno za optimalizovaných podmínek uvedených v části 2.5.2





Příloha 5. Chromatografický záznam stanovení kortizolu ve vzorku slin, měření bylo provedeno za optimalizovaných podmínek uvedených v části 2.5.2

Příloha 6. Charakteristika souboru dobrovolných dárců slin

<b>Vzorek</b>	<b>Pohlaví</b>	<b>Věk</b>	<b>Koncentrace kortizolu [ng/ml]</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Pohlaví</b>	<b>Věk</b>	<b>Koncentrace kortizolu [ng/ml]</b>
1.	žena	53	2,97	20.	žena	73	0,77
2.	muž	62	1,23	21.	žena	37	0,53
3.	žena	55	7,45	22.	žena	68	0,63
4.	žena	26	1,97	23.	žena	15	0,67
5.	muž	22	0,77	24.	muž	71	0,76
6.	muž	48	0,49	25.	muž	71	2,75
7.	muž	17	0,78	26.	žena	76	2,33
8.	muž	48	2,18	27.	muž	61	3,49
9.	muž	22	1,71	28.	muž	66	0,77
10.	žena	20	1,09	29.	žena	61	0,57
11.	žena	61	0,49	30.	muž	62	1,03
12.	muž	62	0,69	31.	muž	35	1,15
13.	muž	71	4,36	32.	žena	31	0,91
14.	žena	63	1,92	33.	muž	55	0,73
15.	muž	70	1,18	34.	žena	29	0,84
16.	muž	25	1,40	35.	žena	24	2,44
17.	žena	69	0,68	36.	žena	28	1,92
18.	žena	30	1,25	37.	muž	25	0,92
19.	muž	36	0,69	38.	muž	28	0,86