

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra analytické chemie**



**VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ  
ESTERŮ RETINOLU V LIDSKÉM SÉRU S VYUŽITÍM  
MONOLITICKÉ KOLONY**

**Diplomová práce**

**Hradec Králové 2006**

**Lenka Krčmová**

Děkuji RNDr. Dagmar Solichové, PhD, Doc. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a Mgr. Luboru Urbánkovi za odborné vedení, cenné rady, pomoc a milý přístup při vypracování této diplomové práce. Dík patří i vedení Gerontologické a metabolické kliniky FNHK, které mi poskytlo laboratoře k experimentální části.

# **OBSAH**

<b>OBSAH .....</b>	<b>3</b>
<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....</b>	<b>7</b>
1.1. Úvod a cíl práce.....	8
<b>2. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>9</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
3.1. Vitamin A .....	13
3.1.1. Vitamin A.....	13
3.1.2. Historie.....	13
3.1.3. Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti .....	14
3.1.4. Biologický význam .....	15
3.1.5. Metabolismus.....	16
3.2. Možnosti stanovení vitamínu A a jeho esterů.....	19
3.2.1. Chromatografické metody .....	19
3.2.2. Další metody stanovení vitamínu A a jeho esterů.....	20
3.3. Vitamin A absorpční test.....	22
3.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	24
3.4.1. Rozdělení chromatografických metod .....	24
3.4.2. Princip HPLC.....	25
3.4.2.1. Stacionární fáze na bázi silikagelu .....	26
3.4.2.2. Monolitní stacionární fáze .....	27
3.4.2.3. Další druhy stacionárních fází.....	28
3.4.2.3.1. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého.....	28
3.4.2.3.2. Stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého a titaničitého .....	29
3.4.2.3.3. Stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu.....	29
3.4.3. Instrumentace HPLC.....	30
3.4.4. Charakteristiky HPLC procesu.....	30
3.5. Validace analytické metody .....	32
3.5.1. Test vhodnosti použité metody .....	32
3.5.1.1. Účinnost chromatografické kolony.....	33
3.5.1.2. Asymetrie chromatografických píků .....	33
3.5.1.3. Rozlišení chromatografických píků.....	33
3.5.1.4. Opakovatelnost .....	34
3.5.2. Vlastní validace analytické metody .....	34
3.5.2.1. Přesnost .....	34
3.5.2.2. Správnost metody.....	34
3.5.2.3. Linearita.....	35

3.5.2.4.	<i>Selektivita</i> .....	35
3.5.2.5.	<i>Robustnost</i> .....	36
3.5.2.6.	<i>Detekční a kvantitativní limit</i> .....	36
3.6.	Analýza biologického materiálu.....	37
3.7.	Preanalytická fáze.....	39
3.7.1.	<b>Faktory, které mohou ovlivnit preanalytické období</b> .....	40
3.7.2.	<b>Odběr vzorku</b> .....	41
3.7.2.1.	<i>Odběr venózní krve</i> .....	41
3.7.2.2.	<i>Odběrová nádobka</i> .....	41
3.7.2.3.	<i>Vyšetření z nesrážlivé krve a z plazmy</i> .....	42
3.7.3.	<b>Transport vzorku</b> .....	43
3.7.4.	<b>Uchovávání vzorku</b> .....	43
3.7.5.	<b>Prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze</b> .....	43
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>45</b>
4.1.	Přístrojové vybavení.....	46
4.2.	Chemikálie.....	46
4.3.	Standardy.....	46
4.4.	Příprava zásobních a pracovních roztoků.....	48
4.4.1.	<b>Zásobní roztoky</b> .....	48
4.4.2.	<b>Pracovní roztoky</b> .....	49
4.5.	Vývoj metody a optimalizace chromatografických podmínek.....	50
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>51</b>
5.1.	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek.....	52
5.1.1.	<b>Vlnová délka detektoru</b> .....	52
5.1.2.	<b>Složení mobilní fáze</b> .....	55
5.1.3.	<b>Příprava vzorku</b> .....	60
5.1.3.1.	<i>Vývoj extrakčního postupu</i> .....	60
5.1.3.2.	<i>Výsledný extrakční postup</i> .....	61
5.2.	Validace metody.....	62
5.2.1.	<b>Test způsobilosti systému</b> .....	62
5.2.1.1.	<i>Účinnost chromatografické kolony</i> .....	62
5.2.1.2.	<i>Asymetrie chromatografických píků (T)</i> .....	64

5.2.1.3.	<i>Rozlišení chromatografických píků (R)</i> .....	65
5.2.1.4.	<i>Opakovatelnost nástřiku</i> .....	66
<b>5.2.2.</b>	<b>Další validační parametry</b> .....	<b>66</b>
5.2.2.1.	<i>Linearita</i> .....	66
5.2.2.2.	<i>Správnost</i> .....	71
5.2.2.3.	<i>Přesnost</i> .....	73
5.2.2.4.	<i>Detekční a kvantifikační limit</i> .....	73
5.2.2.5.	<i>Robustnost</i> .....	74
5.2.2.6.	<i>Stabilita</i> .....	80
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>83</b>
6.1.	Vývoj a optimalizace metody.....	84
6.2.	Klinické využití metody .....	86
<b>7.</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>88</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>99</b>

# **1. ÚVOD A CÍL PRÁCE**

## 1.1. Úvod a cíl práce

Mezi analytickými metodami stanovení látek v biologickém materiálu se v posledních letech stále více prosazuje metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V biochemických laboratořích, které jsou nezbytnou součástí nemocničních zařízení, se této metody užívá nejen pro terapeutické monitorování lékových hladin, ale také pro stanovení dalších biologicky aktivních látek. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie slouží při analýze vitaminů, různých mediátorů, ale pomáhá odhalovat i metabolické pochody látek v organismu.

Cílem této práce bylo vypracovat, validovat a ověřit v klinické praxi HPLC metodu stanovení esterů retinolu v lidském séru s využitím monolitické kolony a diode-array detekce. Tato metoda bude prakticky použita pro stanovení esterů retinolu a jednotlivých vitaminů (A, E) při retinol absorpčním testu u onkologicky nemocných při testování poškození sliznice střeva během chemoterapeutické léčby.



## **2. SEZNAM ZKRATEK**

APCI – LC – MS	atmospheric pressure chemical ionization-liquid chromatography-mass spectrometry, chemická ionizace za atmosferického tlaku v tandemovém spojení s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií
$\beta$ C	$\beta$ -karoten
CE	capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza
CNS	centrální nervová soustava
CRBP	cell-retinol-binding-protein, bílkovina přenášející retinol v buňce
CT	computed tomography, počítačová tomografie
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	etylglykoltetraoctová kyselina
GC	gas chromatography, plynová chromatografie
GIT	gastrontestinální trakt
HDL	high-density-lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
HPLC	high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL 2	interleukin 2
IU	international unit, mezinárodní jednotka
IUPAC	international union of pure and applied chemistry
LC	liquid chromatography, kapalinová chromatografie
LOD	limit of detection, limit detekce
LOQ	limit of quantification, limit kvantifikace
LRAT	lecitinretinolacyltransferasa
MF	mobilní fáze
NAD	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný)
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NMR	nukleární magnetická rezonance
RAR	retinoid acid receptor, receptor pro kyselinu retinovou
RARE	retinoid acid response element, reakční elementy kyseliny retinové
RBP	retinol-binding-protein, protein přenášející retinol v krvi

RE	ester retinolu
RP – HPLC	reverse phase HPLC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RTG	rentgenové záření
RXR	receptor kyseliny retinové
UV	ultraviolet, ultrafialové spektrum

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

## 3.1. Vitamin A

### 3.1.1. Vitamin A

Vitamin A, původně nazývaný jako axeroftol, je podle svého účinku nejdéle známým vitamínem. Jeho izolaci v čisté formě a stanovení struktury molekuly umožnily až na počátku 20. století analytické metody. V 50. letech doporučila IUPAC pro vitamin název retinol.[1]

Pod názvem vitamin A jsou zahrnovány všechny látky živočišného původu mající biologickou aktivitu vitamínu A. Většinu aktivity v těle představuje retinol a jeho dva deriváty, retinal a kyselina retinová. Název retinoidy se obvykle užívá k označení jak přírodních tak i syntetických analogů.[2]

### 3.1.2. Historie

Základ k objevu vitamínu A (ale i ostatních vitamínů) položil v roce 1906 anglický fyziolog Sir Frederick Gowland Hopkins z University v Cambridge. Ten krmil potkany čistým škrobem, cukrem, tuky a bílkovinami a zjistil, že zvířata neprosívají a nerostou a to i přesto, že dostávají jednotlivé živiny ve stejném poměru, jako jsou přítomny v mléce. Teprve když jim denně přidal půl čajové lžičky opravdového mléka, začala zvířata růst a uzdravila se. Hopkins hypotetickou látku z mléka nazval přídatným (akcesorním) faktorem - bylo to ještě šest let před Funkovým návrhem názvu vitaminy. Z Hopkinsových pozorování vyšel Dr. E. V. McCollum a „umělou“ dietu doplňoval mléčným tukem (máslem) a přirozeným mléčným cukrem. Zjistil, že mísení obou je pro prospívání zvířat nezbytné. Správně poznal, že v obou jsou nezbytné přídatné látky a tak nazval faktor z másla „v tuku rozpustný A“ a faktor z mléčného cukru „ve vodě rozpustný B“.

Dr. McCollum se zdráhal přijmout Funkův název vitaminy (asi správně cílil, že je v podstatě mylný), ale v roce 1921 se ostatní vědci rozhodli ve Funkův prospěch.

V roce 1831 byl objeven v mrkvi oranžový karoten, ale teprve za 100 let (1930) se přišlo na to, že karoten je provitamin A a že z něj v těle vlastní vitamin A vzniká. Strukturu vitamínu popsal v roce 1931 P. Karrer.[3]

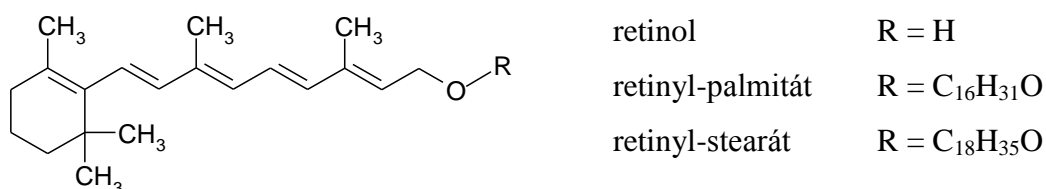
### 3.1.3. Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti

Vitamin A patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích. Po chemické stránce je to alkohol obsahující ve své molekule šestičlenný  $\beta$ -jononový kruh s bočním řetězcem složeným ze dvou izoprenoidních jednotek. Podle počtu dvojných vazeb v šestičlenném kruhu se rozlišuje vitamin A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub>. Postranní řetězec má 4 dvojně vazby, které mohou tvořit příslušné cis-trans izomery.[4]

Konjugace all-trans retinoidů s mastnými kyselinami poskytuje retinyl estery, které představují zásobu vitaminu A hlavě v játrech. All-trans retinoly jsou aldehydy, deriváty retinalu a karboxylové kyseliny, nazývané trans-retinové kyseliny. Pět konjugovaných dvojných vazeb poskytuje rozdílné izomerické formy. Kromě all-trans konfigurací se vyskytuje cis-konfigurace (9-cis, 11-cis a 9,13-dicis).

Všechny estery retinolu jsou prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné nebo částečně rozpustné v etanolu a mísitelné s organickými rozpouštědly.[5]

Vitamin A a jeho estery jsou velmi citlivé na působení oxidačních látek, vzduchu, kyselin, světla a tepla.[6] Proto se uchovávají pod inertní atmosférou, chráněné před světlem při teplotě -20 °C nebo lépe při -86 °C, některé estery je možné uchovávat při 2–8 °C. [7]



Obr. 1: Vzorec retinolu , retinyl-palmitátu a retinyl-stearátu

Každý retinoid má své farmakologické vlastnosti, které určují jeho užití v klinické dermatologii a onkologii, mnoho retinoidů je také syntetizováno uměle, jejich biologická aktivita je obvykle spojena s nežádoucími účinky jako toxicita a teratogenita.[6]

Ve farmaceutickém průmyslu se používá retinyl-acetát pro svou stálost a dostupnost v čisté formě. Byl použit i jako mezinárodní standard (1 IU=0,344  $\mu$ g retinyl-acetátu = 0,3  $\mu$ g retinolu).[1]

### 3.1.4. Biologický význam

Retinol a retinal jsou působením dehydrogenas nebo reduktas přítomných v mnoha tkáních a vyžadujících NAD či NADP navzájem přeměňovány. Ovšem jakmile vznikne kyselina retinová, nemůže již být přeměněna zpět. Kyselina retinová podporuje růst a diferenciaci buněk, nemůže však nahradit retinal v jeho roli při vidění a retinol v podpoře rozmnožovacího systému.[2]

Metabolická dráha retinoidů zahrnuje specifické jaderné receptory (RAR, RXR), které regulují genovou expresi. Tyto receptory nesou své ligandy k cílové DNA, kde dochází k „zapínání“ a „vypínání“ transkripce.[7, 8] V tomto ohledu se vitamin A chová podobně jako steroidní hormony. Této jeho roli asi může být připsána úloha vitamínu A při reprodukci.[2]

Retinal je složkou zrakového pigmentu rhodopsinu. Rhodopsin se vyskytuje v receptorových buňkách retiny, které jsou odpovědné za vidění ve slabém světle. 11-cis retinal se specificky váže na zrakový protein opsin, čímž dojde k vytvoření rhodopsinu. Na světle je rhodopsin štěpen na opsin a all-trans retinal. Při reakci dochází k otevření vápenatých kanálů a přenosu nervového impulzu do CNS.[2]

Vliv na imunitní systém: Retinoidy podporují diferenciaci myelocytárních prekurzorů, zvyšují expresi receptorů pro IL2 a inhibují uvolňování kyseliny arachidonové z mikrofágů.[7, 9]

Kyselina retinová se podílí na syntéze glykoproteinů. Předpokládá se, že retinyl-fosfát působí jako přenašeč oligosacharidů lipidními membránami buňky.[2]

Retinoidy stimulují růst a diferenciaci epitelálních buněk kůže, buněk dýchacího traktu, prsní žlázy, močového a gastrointestinálního traktu.[7]

Protirakovinné účinky: Mnohé z lidských nádorů odvozují svůj vznik z epitelálních tkání, které pro normální průběh buněčného dělení potřebují retinoidy. Některé epidemiologické studie prokázaly inverzní vztah mezi obsahem vitamínu A ve stravě a rizikem vzniku nádorů. Pokusy ukázaly, že podávání retinoidů snižuje účinky některých karcinogenů.

Retinol a zejména jeho provitamin  $\beta$ -karoten jsou považovány za přirozené faktory chránící buňky před škodlivým vlivem singletového molekulárního kyslíku.[2]

Vitamin A je spolu s vitaminem D jediný vitamin, jehož předávkování může způsobit hypervitaminózu.[10]

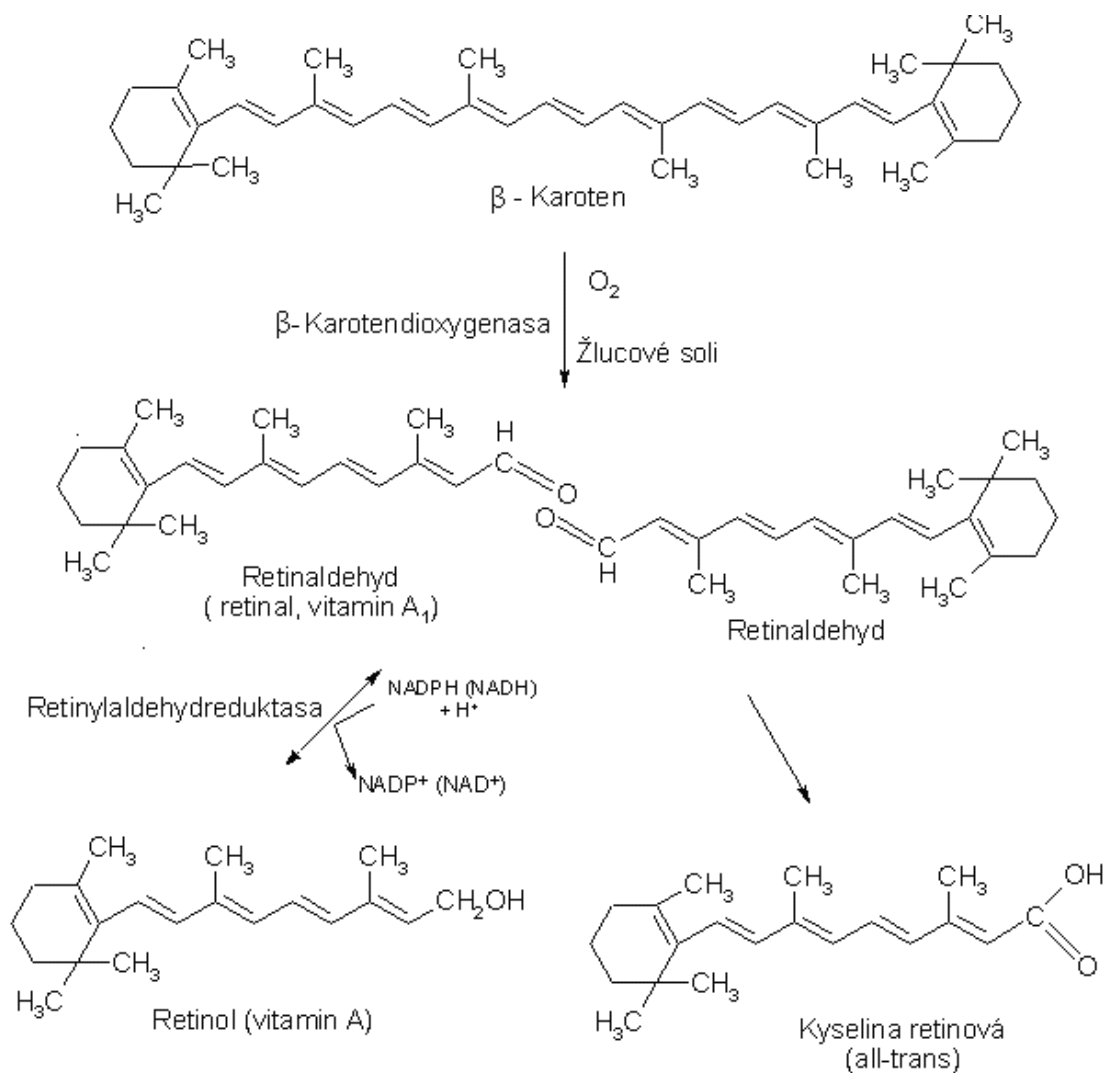
Chronická intoxikace se projevuje celkovou únavou, apatií, bolestmi hlavy, zvracením, nevolnostmi způsobenými zvýšeným nitrolebním tlakem, zvětšením jater, suchostí a svěděním kůže, zvýšenou krvácivostí, tvorbou ragád na sliznici dutiny ústní a bolestmi kloubů.[1]

### **3.1.5. Metabolismus**

Trávení vitaminu A je spojeno se vstřebáváním tuků a s jeho následnou přeměnou v buňkách střevní stěny. Po aktivní absorpci vitaminu A dochází k vzestupu esterů. Po podání esterů retinolu dochází k hydrolyze na retinol, obojí v GITu na kartáčovém lemu střeva. Po vstřebání a navázání na CRBP typu II (cell-retinol-binding-protein) dochází k esterifikaci retinolu s mastnými kyselinami s dlouhými řetězci katalyzované lecitin-retinol-acyltransferásou. V malém procentu je retinol esterifikován pomocí acyl-CoAretinol-acyltransferasy.[11]

Vstřebané karotenoidy jsou oxidativně štěpeny  $\beta$ -karotendioxygenasou. Vznikají 2 molekuly retinalu (aldehydu). Ve střevní sliznici je redukován retinaldehydreduktásou a NADPH na retinol, který je také esterifikován. Estery retinolu jsou ze střeva transportovány v chylomikronech přes lymfatický systém do krevního oběhu. Zde se z nich stávají chylomikronremnanty, které jsou i s retinolem v nich obsaženém vychytávány játry. V játrech je vitamin A ukládán do zásoby jako ester v lipocytech (perisinusoidálních hvězdovitých buňkách) pravděpodobně jako lipoglykoproteinový komplex.[2]



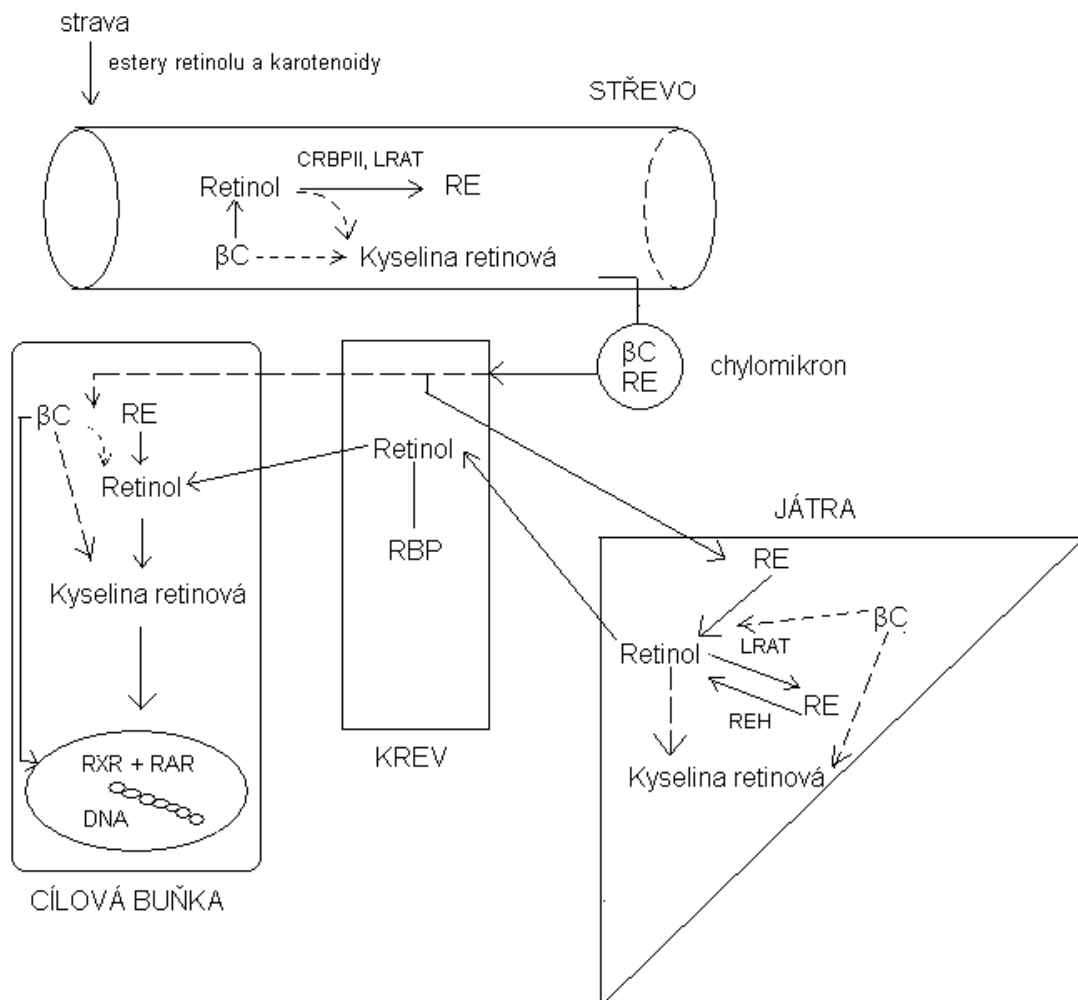


Obr. 2: Rozklad  $\beta$ -karotenu na retinol a kyselinu retinovou

Retinol může být mobilizován a transportován z jater ve formě konjugátu s bílkovinou retinol-binding-protein (RBP). Kyselina retinová je transportována v plazmě vázaná na albumin. Mimo játra je retinol v buňkách vázán na CRBP.[11, 12]

Toxicita vitamínu A se projeví po vyčerpání kapacity vazebných bílkovin, buňky jsou vystaveny působení nenavázaného retinolu.

Estery retinolu jsou často užívány k studiu metabolismu chylomikronů, chylomikronremnantů a lipoproteinů.[2, 13, 14, 15, 16]



Obr. 3: Metabolismus retinolu

## 3.2. Možnosti stanovení vitamínu A a jeho esterů

Pro stanovení vitamínu A a jeho esterů se v současnosti užívá především různých modifikací separačních postupů s využitím instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie po předchozí extrakci ze vzorku. K detekci se často užívají fluorescenční programovatelné detektory či univerzální UV detektory, uplatňují se také postupy s coulometrickou detekcí.[17]

### 3.2.1. Chromatografické metody

#### a) LC s elektrochemickou detekcí

Lai-Hao-Wang vyvinul tuto metodu pro stanovení 11-cis a all-trans retinové kyseliny, retinyl-acetátu a retinolu. Detekční cela obsahuje skleněnou uhlíkovou elektrodu a argentochloridovou referenční elektrodu. Jako mobilní fáze je užit 92% methanol a 8% acetátový pufr (pH 4,72). Doba analýzy jednoho vzorku je 12 minut.[18]

#### b) RP-HPLC s UV detekcí

M.G.M. De Ruyter stanovil estery retinolu metodou HPLC s reverzní fází a UV detekcí při 330 nm. Jako vnitřní standard byl užit retinyl-propionát. Metoda byla použita pro stanovení hlavně nepolárních esterů jako jsou retinyl-linoleát, retinyl-myristát, retinyl-laurát, retinyl-oleát atd. Jako mobilní fáze byl užit methanol. Doba analýzy jednoho vzorku byla 16 minut.[19]

#### c) RP-HPLC s automated microbore column switching a UV detekcí.

Metoda vyvinuta S. Hartmanem pro stanovení esterů retinolu v plazmě. Po deproteinaci etanolem se přidá vnitřní standard retinyl-propionát. Jako mobilní fáze byla užitá směs rozpouštědel acetonitril-methanol-etanol-2-propanol. Detekce esterů byla při 325 nm.[20]

Pozn.: „column switching“ je systém, který obsahuje kolonu s přepínacím ventilem. Nejprve dojde k naadsorbování analytické látky a vymytí balastů a po přepnutí ventilu se analyt vymyje na separační kolonu.

#### d) HPLC s normální fází

Metoda byla vyvinuta pro měření esterů retinolu v plazmě nebo séru např. při vitamin A absorpčním testu nebo při intoxikaci. Byl užit systém HPLC s gradientovou elucí. Mobilní fází tvořila směs dioxan/hexan s lineárním vzestupem procenta dioxanu. Jako vnitřní standard byl užit retinyl-acetát. Doba analýzy byla 10 minut.[21]

#### e) HPLC s APCI detekcí (APCI-LC-MC)

Metoda byla vytvořena pro kvantitativní analýzu all-trans retinolu a all-trans retinyl-palmitátu. Byl použit systém HPLC s reverzní fází a gradientovou elucí. Mobilní fáze byla směs methanol - voda - kyselina octová a směs metanol – metyltetrabutyleter-octová kyselina. Kyselina octová zde umožňuje protonaci retinoidů během APCI (ionizace za atmosférického tlaku). Jako vnitřní standard byl užit retinyl-acetát. Tato metoda má mez detekce 34 fmol/ $\mu$ l.[22]

#### f) GC

Stanovení retinoidů plynovou chromatografií je méně populární než HPLC z mnoha důvodů. Při zvyšující se teplotě se stává polyenová struktura retinoidů nestabilní a dochází k jejich rozkladu. Proto se užívá derivatizace, příkladem může být použití diazometanu k metylaci kyseliny retinové. Časté je spojení GC-MS.[7]

### 3.2.2. Další metody stanovení vitaminu A a jeho esterů

#### a) Fluorimetrické stanovení

Jedná se o metodu vyvinutou Orthem pro stanovení retinyl esterů v lipoproteinech (chylomikronech a chylomikronremnantech). Před analýzou se estery retinolu převádí na retinol. HDL lipoproteiny nelze touto metodou stanovit, protože zde vzniká nespecifická fluorescence. Tato metoda může být využita pro výzkum metabolismu lipoproteinů, kdy lipoproteiny mohou být izolovány ultracentrifugací nebo gelovou filtrací.[23]

#### b) Stanovení reakcí s chloridem antimonitým

Vitamin A je možné také stanovit po extrakci petroleterem, chromatografickém přečištění na sloupci a reakcí s chloridem antimonitým. Vzniká modré zbarvení.[6]

c) Stanovení pomocí radioaktivně značených retinoidů

Další metodou užívanou hlavně experimentálně je detekce radioaktivně značených retinoidů, zejména v metabolických studiích.[24, 25, 26, 27]

d) Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je moderní separační technika, která má nízký detekční limit a malou spotřebu vzorku, proto se stanovení retinoidů pomocí CE používá především u novorozenců a předčasně narozených dětí. CE také nabízí možnost kvantifikace vitamínu A jako retinol-RBP.[7]

e) Bioassay

System používá tzv. reakční elementy kyseliny retinové (RARE) kombinované s reportérovým genem. Dochází k produkci  $\beta$ -galaktosidasy a luciferasy. Ty se kvantifikují jako produkty, jejichž vznik závisí na přítomnosti retinoidů. Hlavní výhodou reportérového systému je možnost stanovení retinoidů in vivo i in vitro v buňkách nebo orgánech ve velmi malých koncentracích (fmol/l).[7]

### 3.3. Vitamin A absorpční test

Poškození sliznic gastrointestinálního traktu patří mezi nejčastější toxické projevy protinádorové chemoterapie a radioterapie. Podání těchto léčiv může být spojeno se změnami permeability střevní sliznice.

Klinicko-diagnostický proces v oblasti zažívacího ústrojí je založen na řadě specializovaných vyšetření, ke kterým patří zejména moderní zobrazovací metody (endoskopie, sonografie, RTG, CT, NMR) poskytující morfologický obraz orgánů. Nedílnou součástí diagnostiky však tvoří metody biochemické. Přínos biochemických testů pro klinicko-diagnostický proces je především v oblasti funkčních testů, screeningových programů a sledování dynamiky procesů v průběhu léčby, resp. dlouhodobého sledování nemocného.[28]

Změny permeability sliznice tenkého střeva lze zjistit retinol absorpčním testem.

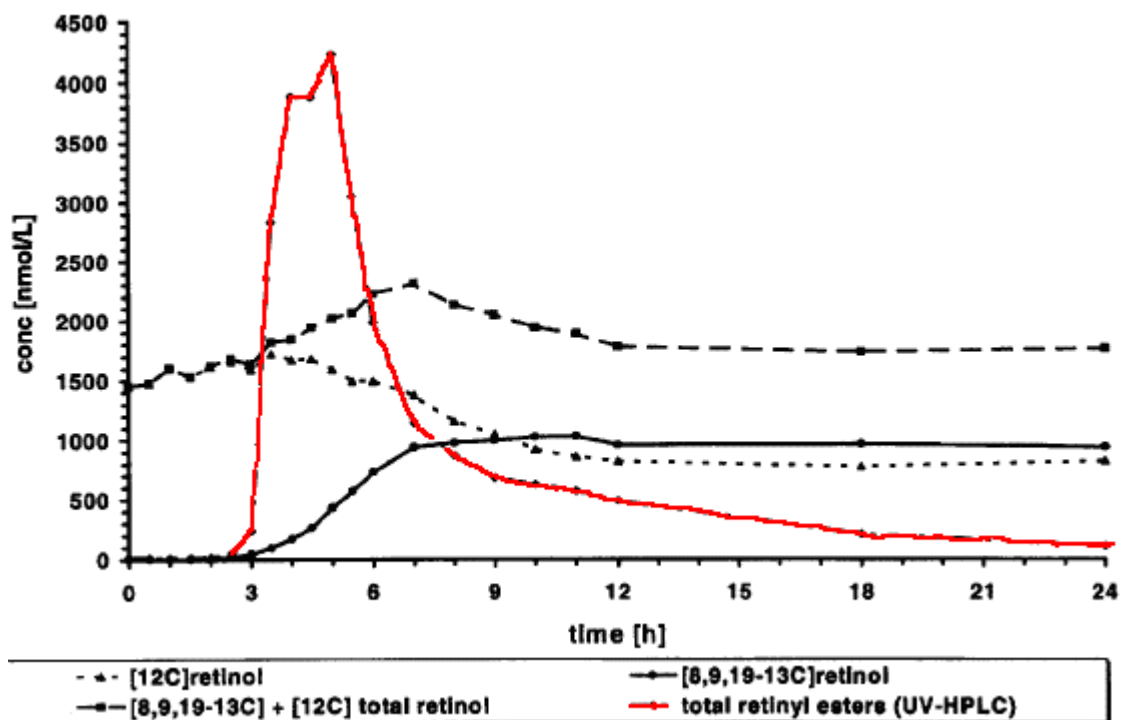
Provedení zátěžového testu:

Pacient přichází na vyšetření nalačno. Je mu odebrán vzorek krve (označen č.1) a pak je podána zátěž 360 000 IU vitamínu A a tekutina (čaj). Za pět hodin po podání je odebrán vzorek krve (označen č.2). Oba vzorky jsou zpracovány a analyzovány.

Referenční hodnoty pro vitamin A v séru jsou v rozmezí 1,8 - 2,3  $\mu\text{mol/l}$ . Klinicky se prosté stanovení sérové hladiny retinolu využívá jen zřídka. Normální hodnoty za pět hodin od podání zátěže jsou 7,2 - 24,6  $\mu\text{mol/l}$ . Patologický výsledek testu je při hodnotách menších než 7,2  $\mu\text{mol/l}$ . V tomto případě je jako retinol označován celkový retinol (i retinyl estery), protože estery retinolu jsou obvykle před analýzou při většině zpracovacích technik hydrolyzovány na retinol.[29, 30]

Jak již bylo řečeno v kapitole 3.1.5. Metabolismus, po aktivní absorpci vitamínu A dochází k vzestupu esterů. Po podání esterů retinolu dochází k hydrolyze na retinol, obojí v GITu na kartáčovém lemu střeva. Po vstřebání a navázání na CRBP typu II dochází k esterifikaci retinolu s mastnými kyselinami s dlouhými řetězci.[11]

Obr. 4 zobrazuje hladiny retinolu a retinyl esterů po podání 105  $\mu\text{mol/l}$  (8,9,19C) retinyl-palmitátu u zdravých dobrovolníků. Významně zde dochází k vzestupu esterů retinolu (v tomto případě zastoupených retinyl-palmitátem, retinyl-stearátem a retinyl-oleátem).[31]



Obr. 4: Grafické znázornění vzestupu esterů retinolu během prvních 24hodin po podání 105  $\mu\text{mol/l}$  retinyl-palmitátu

#### LA / MA

Pacientům je společně s retinol absorpčním testem prováděn LA / MA test. Mukositida (zánět v dutině ústní), která je způsobena zpravidla chemoterapií nebo zářením, může být dále komplikována herpetickou (virovou) infekcí a následnou bakteriální nebo plísňovou infekcí.[23]

Princip testu spočívá ve vypití roztoku xylózy, manitolu a laktulosa a 5-hodinovém sběru moče. Následně se vypočítají indexy xylóza / manitol, laktulosa / manitol a laktulosa / xylosa. U pacientů s mukositidou bylo pozorováno zvýšení indexu laktulosa / manitol a laktulosa / xylosa o řád ve srovnání s pacienty před léčbou.[28, 29, 32]

## 3.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie jako separační metoda je jedna z dominantních separačních technik rutinně využívaných ve všech typech analytických laboratořích.[34]

Hlavními výhodami HPLC jsou její schopnost separovat, identifikovat (využití standardů či vhodného detektoru) a kvantifikovat látky různého koncentračního rozmezí, polarity i těkavosti během jedné analýzy s vysokou citlivostí a možností automatizace.

### 3.4.1. Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze dělit dle několika hledisek:

1. princip separace – adsorpční
  - rozdělovací
  - iontovýměnná
  - gelová
  - afinitní
  - chirální
2. způsob vyvíjení - eluční
  - frontální
  - vytěšňovací
3. skupenství mobilní a stacionární fáze
  - kapalina-pevná látka
  - plyn-kapalina
  - plyn-pevná látka
4. technika
  - sloupcová (kolonová)
  - papírová
  - na tenké vrstvě



V adsorpční kapalinové chromatografii se dále používá rozdělení podle polarity fází. Při chromatografii na normálních fázích je stacionární fáze silně polární (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (hexan, chloroform). Polární látky jsou takto zadržovány na polárním povrchu stacionární fáze déle než látky nepolární.

Naopak chromatografie na reverzních fázích používá nepolární stacionární fázi (hydrofobní modifikace např. silikagelu jako je C<sub>18</sub> nebo C<sub>8</sub>) a mobilní fází je polární kapalina (směsi vody, acetonitrilu nebo/a methanolu). V tomto uspořádání kapalinové chromatografie dochází k silné retenci nepolárních látek.[34]

### 3.4.2. Princip HPLC

Chromatografický proces může být definován jako separační proces, při němž dochází k přenosu hmoty mezi stacionární a mobilní fází. Kapalinová chromatografie využívá k separaci složek směsi pevnou stacionární fázi (analytická kolona naplněná sorbentem) a kapalnou mobilní fázi (směs rozpouštědel příslušné polarity).

Na chromatografické koloně dochází k dělení směsi na jednotlivé složky. Míra rozdělení závisí na rozsahu interakcí jednotlivých složek se stacionární fází. Stacionární fáze je definována jako nepohyblivý materiál naplněný do chromatografické kolony. Interakce analytu s mobilní a stacionární fází může být ovlivňována změnami ve složení jak mobilní fáze tak použitím různých typů stacionárních fází.[34]

Interakce, které se uplatňují při chromatografickém procesu:

- dipól-indukovaný dipól
- dipól-dipól
- hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly)
- vodíková vazba
- elektrostatická interakce

Mobilní fáze je tvořena jedním nebo více rozpouštědly (jednosložková, vícesložková). Poměr a zastoupení mobilních fází můžeme během analýzy měnit podle toho, zda se jedná o eluci gradientovou či isokratickou. Gradientová eluce umožňuje zkrácení času analýzy, zlepšuje rozdělení složitějších směsí a zvyšuje citlivost analýzy.[34, 35]

Srdcem každé HPLC metody je kolona, která ovlivňuje výsledek z hlediska selektivity a účinnosti. HPLC kolony jsou konstruovány jako trubice (ocelové, skleněné, ze syntetických polymerů), které jsou naplněny mikročásticemi porózní látky, nejčastěji silikagelu.[36]

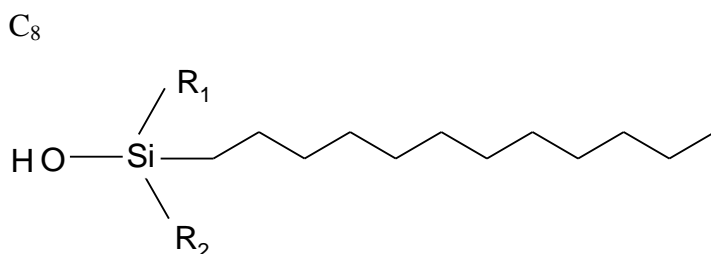
Stacionární fáze je tvořena fixním materiálem uvnitř kolony. Pro účinné dělení je rozhodující kvalita sorbetu, jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura.

### 3.4.2.1. Stacionární fáze na bázi silikagelu

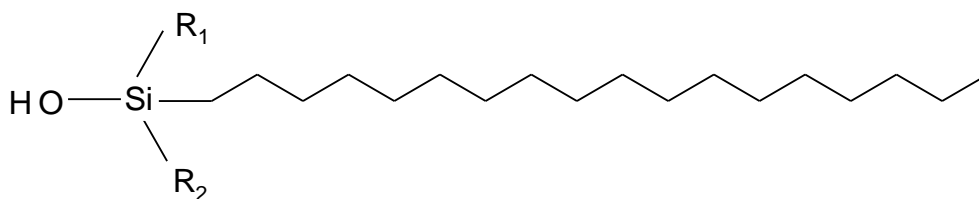
Vlastnosti silikagelu jsou předmětem studia už dlouhou dobu. Je to nejpoužívanější materiál pro přípravu stacionárních fází v kapalinové chromatografii.

Během vývoje chromatografie bylo využití normálních fází spíše potlačeno ve prospěch chromatografie na reverzních fázích, a to zejména kvůli širší využitelnosti a větší robustnosti reverzních fází.

Dnes jsou na trhu nejvíce zastoupeny stacionární fáze s postranním řetězcem C18 a C8. Technologie výroby analytických kolon se stále zlepšuje a vyvíjí, a tak jsou k dispozici sorbenty s fluorovaným alkylovým řetězcem, s fenylovou skupinou, které mají odlišnou selektivitu ve srovnání s C18 modifikovanými stacionárními fázemi. Kyano a amino modifikované stacionární fáze, které se využívají v normální chromatografii, nalézají své použití i v chromatografii reverzní.[34]



C<sub>18</sub>



Obr. 5: Stacionární fáze s postranním řetězcem C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub>

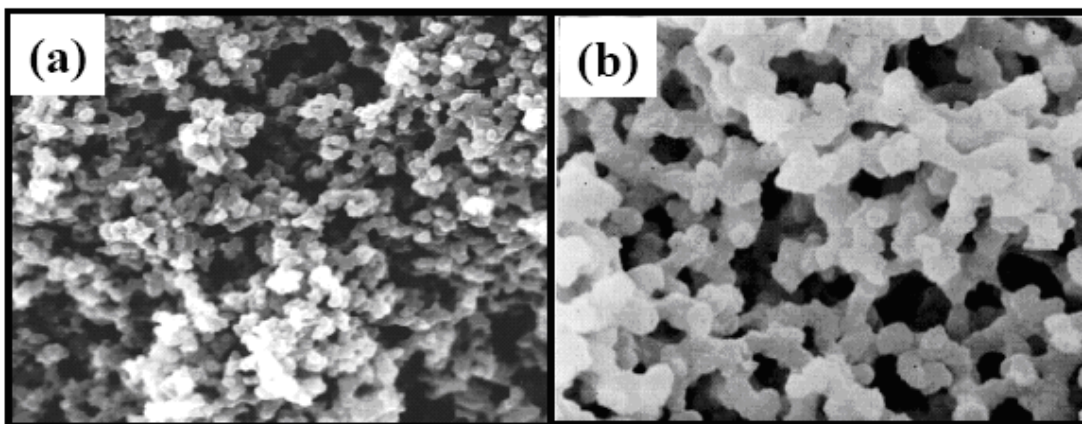
### 3.4.2.2. Monolitní stacionární fáze

Užití klasických HPLC kolon s částicemi 3 nebo 5  $\mu\text{m}$  je limitováno tlakem. Vysoký tlak může zničit kolonu i HPLC systém.[37] Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi silikagelu, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze protékat póry monolitu.

Kolona obsahuje dvojitou strukturu pórů, makropóry a mezopóry o velikosti 2  $\mu\text{m}$  a 13 nm. Tato dvojitá struktura pórů způsobuje, že stacionární fáze má porozitu větší než 80 %, což umožňuje provádět analýzu s mnohem menším zpětným tlakem než konvenční částicové kolony, které mají porozitu jen okolo 65 %. Průtok mobilní fáze až do 9 ml/min potom umožňuje dosažení mnohem rychlejší separace. Díky nízkým tlakovým nárokům lze několik monolitních kolon zapojit do série a zvýšit tím počet teoretických pater. Průtokový gradient umožňuje redukci reekvilibračního času kolony.[37, 38, 39]

Vnitřní povrch sorbetu může být chemicky modifikován stejně jako konvenční materiály.

Objev monolitních kolon je pravděpodobně nejdůležitější inovací v historii kapalinové chromatografie. Příspěvek těchto kolon ke zlepšení efektivity a rychlosti chromatografické separace se zdá být srovnatelný s rozvojem kapilárních kolon v plynové chromatografii. Jejich používání má výrazně pozitivní vliv na fungování a ekonomiku provozu.[40]



Obr. 6: Obrázky morfologie monolitů: a) polymerního a b) silikového monolitu

Dnes jsou již některé monolity komerčně dostupné např. Chromolith (silikagel s reverzní modifikovanou fází, Merck, Darmstadt, Německo).[34]



Obr. 7: Monolitické kolony 50 mm Chromolith SpeedROD, 100 mm Chromolith Performance), Merck , Darmstadt, Německo

### 3.4.2.3. Další druhy stacionárních fází

#### 3.4.2.3.1. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Porézní oxid zirkoničitý je kovový oxid, který může existovat v mnoha krystalických formách nebo ve formě amorfní. Jeho primární výhodou oproti konvenčnímu silikagelu je unikátní chromatografická selektivita kombinovaná s chemickou a teplotní stabilitou. Na rozdíl od silikagelu je zirkonium stabilní v celém rozmezí pH (1-14) a při teplotě až do 200° C. V porovnání s polymerními stacionárními fázemi se zirkonium nesráží nebo nezvětšuje objem působením organické složky

mobilní fáze či iontové síly vodné složky. Navíc je mechanicky stabilní a účinnost separace je velmi vysoká. Zirkoniové sorbenty tak dovolují rychlejší a selektivnější separaci s vysokými účinnostmi.

#### **3.4.2.3.2. Stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého a titaničitého**

Tyto stacionární fáze patří mezi anorganické materiály podobně jako oxid zirkoničitý. První z nich byl zkoumán oxid hlinitý jako materiál pro chromatografické kolony v normální chromatografii, protože je amfoterní a méně reaktivní než silikagel. Dnes se již ale v HPLC používá jen zřídka, přestože jeho vlastnosti pro separaci aminů byly vynikající.

Oxid titaničitý byl také testován jako stacionární fáze v normální chromatografii. Modifikace na reverzní materiál byla provedena pomocí C18 řetězce, ale komerčně dostupných sorbentů na bázi oxidu titaničitého je velmi málo.

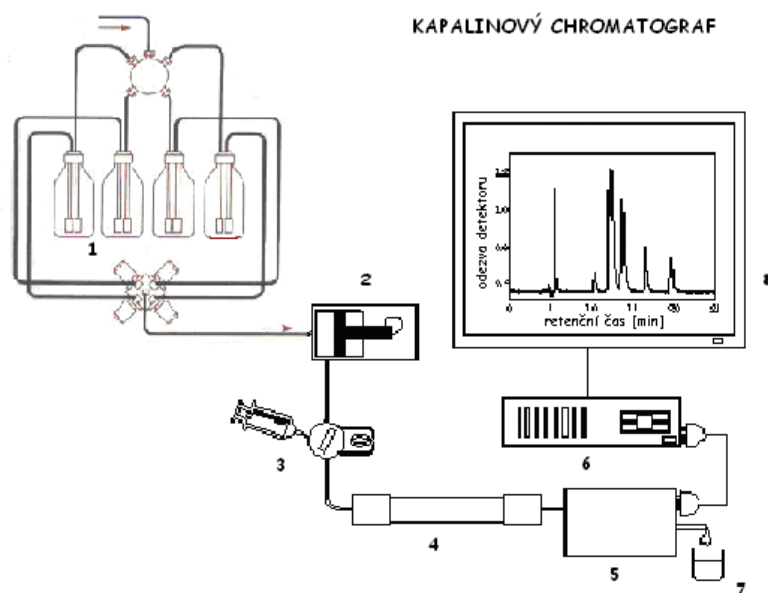
#### **3.4.2.3.3. Stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu**

Porézní grafitický karbon je další vysoce inertní materiál, který se skládá z grafitových proužků. Tento materiál je velmi robustní, stabilní v širokém rozmezí pH i teplot.

Selektivita retence je velmi odlišná od konvenčních kolon,  $\pi - \pi$  elektronové interakce a ionizované vazby mají mnohem větší vliv než hydrofobicita. Sterické a izomerní rozdíly mohou mít velký vliv, a proto se tyto fáze často používají pro rozlišení strukturálních izomerů a chirálních analytů.[34]

### 3.4.3. Instrumentace HPLC

HPLC sestava pro chromatografickou analýzu se obecně skládá z rezervoáru mobilní fáze, odplyňovacího zařízení, injektoru, chromatografické kolony (popř. předklony), detektoru a procesoru pro vyhodnocení dat.[34]



Obr. 8: Schematický obrázek HPLC systému. Zásobníky mobilní fáze + odplynění pomocí He, dnes častěji pomocí degasseru (1), pumpa (2), dávkovací kohout se smyčkou (3) dnes již nahrazen automatickými dávkovači (autosamplery), chromatografická kolona (4), bývá často doplněna předkolonou, detektor (5), počítač pro vyhodnocování dat (6), odpad (7) v tomto místě lze připojit sběrač frakcí a výsledný záznam-chromatogram (8).

### 3.4.4. Charakteristiky HPLC procesu

Při běžné chromatografii protéká mobilní fáze stálou rychlostí. Od vnesení určité látky na kolonu do okamžiku, kdy kolonu opustí a projeví se signálem detektoru, uplyne určitý čas závislý na sorbovatelnosti látky v daném chromatografickém systému a tedy na jejím druhu (kvalitě). Protože tento čas charakterizuje retenci, zadržování látky v koloně (a tím současně i snadnost její eluce z kolony), označuje se jako retenční nebo eluční čas  $t_R$ . K eluci látky je zapotřebí, aby kolonou protekl určitý objem mobilní

fáze. Také ten může látku charakterizovat jako tzv. retenční nebo eluční objem  $V_R$ . Proto lze eluci popisovat zcela rovnocenně jako časovou nebo objemovou závislost. Pokud detektorem protéká čistá mobilní fáze (eluent), registruje zapisovač základní linii rovnoběžnou s osou x. Průchod zóny eluované látky detektorem vyvolá nárůst a opětný pokles signálu detektoru a tomu odpovídající maximum na chromatogramu, označované jako „pík“.

Pokud by látka nebyla vůbec sorbovaná stacionární fází a postupovala kolonou stejně rychle jako sama mobilní fáze, potom se její retenční čas označuje jako „mrtvý čas“  $t_M$ . Poměr mrtvého retenčního času a retenčního času látky A se označuje jako retenční faktor R:

$$t_M / t_R = R$$

Může mít hodnotu 0 až 1.

Pro chromatografickou separaci je účelné, aby R nevybočovalo z rozsahu asi 0,2 až 0,8.

Průběh píku představuje koncentrační profil zóny. Proto je plocha vymezená pikem nad základní linií („plocha píku“) úměrná množství látky v zóně a je základním údajem pro kvantitativní analýzu. Měření plochy píku na chromatogramu se provádí jako součin jeho výšky a šířky v poloviční výšce. U ostrých úzkých píků je měření šířky nepřesné. Proto se jejich plocha nahrazuje snadno změřitelnou výškou.

Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje vždy relativně, tedy s použitím standardů. Při metodě vnějšího standardu je nezbytné dávkovat do kolony přesně definované množství vzorku. Plocha píku látky ve vzorku se srovnává s plochou píku standardu analyzovaného za zcela stejných podmínek. Pro sériová stanovení je účelné i pořízení kalibrační závislosti s použitím několika standardů. Výhodou metody je, že vzorek i standard jsou jedna a táž látka, nevýhodou je nezbytnost přesného dávkování, které může být dokonce hlavním zdrojem chyb.[41]

Mezi hlavní výhody metody vnitřního standardu patří eliminace možné chyby při přípravě vzorku a jeho dávkování na kolonu. Jedná se o látku mající podobné fyzikální a chemické vlastnosti jako analyt, která se eluuje v jiném místě než analyty. Pokud je analyzován biologický materiál, neměl by se vnitřní standard před jeho přidáním v materiálu vyskytovat. Koncentrace vnitřního standardu by se měla pohybovat ve stejném rozmezí jako analyt.

## 3.5. Validace analytické metody

Validace analytické metody je série experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je vhodná pro zamýšlené použití. Cílem validace je vyšetřit praktické hranice, ve kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit, aby při opakovaném použití v jedné nebo dalších laboratořích dávala metoda stále stejně spolehlivé výsledky.

Validace analytické metody je samostatný proces. Obecně je postup vývoje metod takový, že se nejprve definují požadavky na zkušební metodu. Vyvine se metoda, najdou se optimální podmínky a třetím bodem postupu je validace, tj. pomocí experimentálních dat se prokáže, že je metoda vhodná pro daný účel, že splňuje na začátku definované požadavky. Musí být uvedena kritéria, která musí být splněna, aby bylo možné určitý analytický systém spolehlivě použít. Vytvořit tato kritéria je dalším cílem validačního procesu. Při každém dalším použití nově vyvinuté metody se už validace neopakuje, jen se testují právě tato kritéria. Když splňují požadavky, předpokládá se, že platí i dříve provedená validace a výsledky lze považovat za spolehlivé. Tato kritéria se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému.[42]

### 3.5.1. Test vhodnosti použité metody

Tzv. „System suitability test“ je číselné prokázání toho, že navržený analytický postup byl zvolen správně. U chromatografických metod se doporučuje provést alespoň některé z těchto testů:

1. dělicí účinnost systému (počet teoretických pater pro kolonovou chromatografii)
2. asymetrie píků
3. rozlišení píků
4. opakovatelnost analýzy
5. čistota píků (peak purity test) nebo identita



### 3.5.1.1. Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony je dána počtem teoretických pater  $N$  a výškovým ekvivalentem teoretického patra  $H$ . V inflexních bodech chromatografického píku se vedou tečny až protnou základní linii; tím na ní vznikne úsečka  $W$ . Z vrcholu píku se spustí kolmice na základní linii. Průsečík označuje retenční čas  $t_R$ .

Počet pater  $N$ :

$$N = 5,545 \cdot (t_R / W_{0,05})^2$$

$W_{0,05}$  ...šířka píku v polovině výšky

Požadavek na účinnost kolony:  $N > 900$ .

Jestliže známe celkovou délku kolony  $L$ , můžeme vypočítat i výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ :

$$H = L / N$$

Výškový ekvivalent teoretického patra má rozměr délky. Na základě hodnot  $H$  je možno účinnost chromatografických kolon porovnávat.

### 3.5.1.2. Asymetrie chromatografických píků

Tato veličina určuje symetričnost chromatografického píku. Ve vzdálenosti 5 % výšky píku se vede rovnoběžka se základní linií. Úsečka  $W_{0,01}$ , která vznikne protnutím ramen píku je rozdělena kolmicí spuštěnou z vrcholu na dvě části: menší část se označí  $f$ .

Asymetrie  $T$  se vypočte:

$$T = W_{0,01} / 2f$$

Pro asymetrický pík je  $T=1$  a tato hodnota se zvětšuje s rostoucí asymetrií.

Požadavek je  $T < 2,0$  pro HPLC.[43]

### 3.5.1.3. Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení je funkcí účinnosti kolony  $N$  a zajišťuje, že látky eluující se blízko sebe jsou od sebe odděleny. U píku hlavní látky a píku nejbližší nečistoty se odměří úseky

na základní linii ( $W_i$  resp.  $W_j$ ) a retenční časy ( $t_{Ri}$  resp.  $t_{Rj}$ ) a podle vzorce se vypočítá rozlišení  $R_{ij}$ .

$$R_{ij} = 2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj}) / (W_i + W_j)$$

$t_R$  = retenční čas látek (min)

$W$  = šířka píku na základně (min)

Požadavek na rozlišení chromatografických píků  $R_{ij} > 1,5$

#### **3.5.1.4. Opakovatelnost**

Opakovatelnost je ověření přesnosti metody za stejných podmínek, během krátké časové doby, ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem.

Měla by být určována na třech koncentračních hladinách pokrývajících specifikované rozmezí, tedy minimálně devět měření (tři nástřiky při jednotlivých koncentracích). Druhou možností je ověření přesnosti na úrovni 100 % zkoušené koncentrace šesti opakovanými měřeními.

Požadavek pro opakovatelnost  $RSD < 1 \%$ .

### **3.5.2. Vlastní validace analytické metody**

#### **3.5.2.1. Přesnost**

Přesnost analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi sérií měření mnohonásobného dávkování homogenního vzorku upraveného předepsaným postupem za předepsaných podmínek. Přesnost by měla být určována na třech úrovních: opakovatelnost, intermediární přesnost a reprodukovatelnost. Míra přesnosti je vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (% RSD).

Požadavek na přesnost pro biologický materiál  $RSD = 5 \% - 10 \%$

#### **3.5.2.2. Správnost metody**

Tento test charakterizuje těsnost shody mezi výsledkem analýzy  $C_i$  a přijatou referenční hodnotou  $C_0$ . Touto referenční hodnotou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je zaručena.

V případě, že se stanovovaná látka nachází v matrici, která může při měření interferovat, testuje se správnost metody pomocí standardního přídatku účinné látky a to buď k samotné matrici nebo k analyzovanému přípravku, pak je její známá koncentrace  $C_0$  a koncentrace stanovená u testovaného vzorku je  $C_i$ .

Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti (R), která se vypočítá podle vzorce:

$$R (\%) = 100 \cdot C_i / C_0$$

Požadavek pro směrodatnou odchylku pro biologický materiál je  $RSD < 10 \%$ . [44]

### 3.5.2.3. Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tento test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky v rozmezí  $\pm 50 \%$  očekávané koncentrace. Připraví se pět vzorků standardní látky v uvedeném koncentračním rozmezí a každý se analyzuje třikrát.

Důležitou charakteristikou linearitě přímky je korelační koeficient. Korelační koeficient je definován tak, že nabývá pouze hodnoty v rozmezí  $(-1 \leq R \leq 1)$ . Hodnoty blízké 1 signalizují požadovanou silnou lineární závislost. [44]

### 3.5.2.4. Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody kvantitativně stanovit analyt v přítomnosti možných vedlejších látek. Spolehlivost stanovení analyzované látky nesmí být ovlivněna přítomností látek vedlejších (nečistot, rozkladných produktů nebo v případě léčiv látek pomocných). Testuje se tak, že se připraví jeden roztok standardu analyzované látky s přídatkem asi  $5 \%$  látek vedlejších. Třikrát se nastříkne do chromatografu, změří se plocha signálu analyzované látky, vypočítá se průměrná hodnota  $A_1$  a selektivita  $S_L$  se vypočte podle vzorce:

$$S_L (\%) = 100 \cdot [A_0 - A_1] / A_0$$

Požadavek  $S_L > 99\%$  [44]

### 3.5.2.5. Robustnost

Analytická metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek. K tomuto testu se připraví jeden vzorek standardu analyzované látky, nastříkne se do chromatografického systému a změří se odpovídající plochy píku. Před každým nástřikem se změní pracovní podmínky. Proměnné si zvolí analytik tak, aby zahrnovaly ty faktory, které podle jeho přesvědčení mohou ovlivnit průběh analýzy. Spodní a horní úrovně těchto změn se navolí tak, aby představovaly reálně možné odchylky dolů a nahoru od optimálních hodnot parametrů při uvažované analýze.

### 3.5.2.6. Detekční a kvantitativní limit

LOD (Limit of Detection) - detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovaná kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. Definuje se jako pětinásobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu – šumu. LOQ (Limit of Quantification) - kvantifikační limit je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Definuje se jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu.

Směrodatnou odchylku šumu lze odhadnout při měření placebo ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří největší kladná ( $r^+$ ) a záporná amplituda šumu ( $r^-$ ). Z tohoto rozpětí šumu je možno odhadnout jeho směrodatnou odchylku vydělením pěti.

$$S_n = (r^+ + r^-) / 5$$

Detekční a kvantitativní limit se vypočtou podle vzorců:

$$\text{LOD} = 3 \cdot S_n \cdot K / b_1 \qquad \text{LOQ} = 10 \cdot S_n \cdot K / b_1$$

Kde  $K$  (plocha píku / výška píku) je poměr charakteristický pro stanovovanou látku a  $b_1$  (plocha píku / koncentrace analytu) je poměr daný směrnici regresní rovnice.[44]

### 3.6. Analýza biologického materiálu

Jako biologický materiál označujeme celou velkou skupinu vzorků, které mají společné to, že jsou získány z lidského těla nebo mají jiný živočišný původ. Analyty v těchto vzorcích mohou být buď endogenní (např. glukóza, aminokyseliny) nebo exogenní (např. léky a jejich metabolity). Tyto biologické vzorky mají velmi složitou matici, můžeme analyzovat např. krev, sérum, ostatní tělní tekutiny, moč nebo se analyzují různé typy tkání. Stabilita analytů v biologických vzorcích je ovlivňována celou řadou faktorů a jejich působení podstatně ovlivňuje výsledky analýzy.

Vzorky biologického materiálu rozdělujeme na 2 kategorie:

1. extracelulární tekutiny
2. celé tkáně nebo buňky obsahující intracelulární tekutiny

Přehled různých biologických matic je uveden v Tab.1.

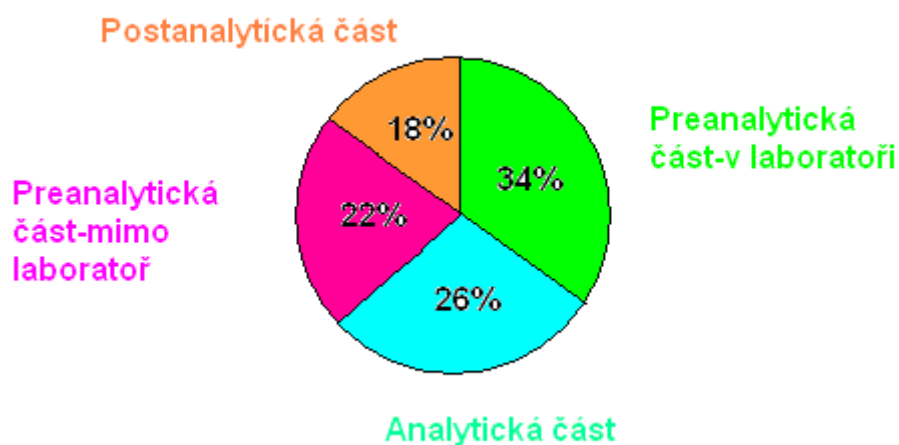
Tab.1: Biologické matrice.[45]

	Název	Popis
1.	<b>Krev</b>	tekutina cirkulující v arteriích a vénách, tvořena plazmou a pevnými součástmi
2.	<b>Krevní buňky</b>	zahrnují erythrocyty, leukocyty a retikulocyty
3.	<b>Plazma</b>	žlutá tekutina, přibližně tvoří polovinu krve, získána po centrifugaci krve po přidání antikoagulancií
4.	<b>Sérum</b>	světle žlutá tekutina podobné kompozice jako plazma, ale bez koagulačních proteinů
5.	<b>Pupečnicková krev</b>	krev získaná při porodu plodu z pupečníku
6.	<b>Krev z okultního krvácení</b>	krev nacházející se pouze v minimálním množství hlavně ve stolici
7.	<b>Moč</b>	žlutozelená tekutina vylučovaná ledvinami, obsahující hlavně vodu, soli a metabolity
8.	<b>Amniotická tekutina</b>	tekutina, ve které je uložen plod
9.	<b>Cerebrospinální tekutina</b>	ultrafiltrát plazmy získaný po lumbální punkci
10.	<b>Lymfa</b>	nažloutlá tekutina , která vzniká ze tkání
11.	<b>Sliny</b>	viskózní čirá sekrece ústních žláz
12.	<b>Synoviální tekutina</b>	čirá viskózní tekutina, která je získána z kloubů
13.	<b>Slzy</b>	čirá tekutina ze slzných kanálků
14.	<b>Pot</b>	tekutina s vysokým obsahem solí, exkret potních žláz
15.	<b>Žluč</b>	žlutohnědá tekutina tvořená játry, uložena ve žlučníku a vylučována do tenkého střeva
16.	<b>Stolice</b>	hnědá masa, zbytky z trávicího procesu
17.	<b>Biopsie</b>	malé vzorky tkání zpracované speciálními technikami
18.	<b>Kameny</b>	tvořeny v různých dutinách těla, pevné konzistence

### 3.7. Preanalytická fáze

Čas vlastní analýzy tvoří jen menší část z doby, která musí uběhnout od ordinace laboratorního vyšetření až po okamžik, kdy ošetřující lékař dostane jeho výsledek. Laboratorní vyšetření kromě analýzy zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr, zaslání odebraného materiálu do laboratoře a přípravné práce, event. skladování před provedením analýzy v laboratoři - tedy období preanalytické. Konečnou podobu včetně přenosu k ordinujícímu lékaři dostává výsledek v období postanalytickém.

Preanalytické období je z hlediska možného ovlivnění výsledku zdaleka nejdůležitější. Uvádí se, že nerespektování preanalytických vlivů způsobuje chybný výsledek nebo jeho nesprávné hodnocení daleko častěji než analytická chyba.



Obr. 9: Jednotlivé fáze laboratorního vyšetření podle časové náročnosti

### 3.7.1. Faktory, které mohou ovlivnit preanalytické období

V preanalytickém období mohou výsledek ovlivnit následující faktory:

- osoba pacienta
- odběr vzorku
- transport vzorku
- uchovávání vzorku před analýzou
- příprava vzorku ke zpracování

dále můžeme faktory ovlivňující preanalytické období dělit:

1. faktory ovlivnitelné (můžeme jejich působení ovlivnit)
2. faktory neovlivnitelné (nelze jejich působení ovlivnit)

ad 1.

- věk
- pohlaví
- rasa, etnická a sociální skupina obyvatel
- cyklické změny (př. diurnální rytmus)
- gravidita
- současně probíhající jiná nemoc
- biologický poločas stanovované látky

ad 2

- fyzická aktivita
- psychický stres
- vliv potravy, alkoholu a tekutin
- kouření
- léky
- operace



## **3.7.2. Odběr vzorku**

### **3.7.2.1. Odběr venózní krve**

Obvykle se odebírá krev venózní a to z loketní žíly. Svou úlohu má i poloha pacienta při odběru a určitou dobu před ním. Vstoje dochází k přesunu tekutiny z intravazálního prostoru do intersticia a koncentrace vysokomolekulárních látek včetně hematokritu může stoupnout až o 10 až 15 %, doporučuje se tedy odběr vleže.

Dezinfekce kůže může rovněž ovlivnit výsledek: použije-li se alkoholický roztok k dezinfekci kůže před odběrem krve na stanovení koncentrace alkoholu, můžeme naměřit falešně pozitivní výsledek. Setká-li se kapka krve s př. Ajatinem, může dojít k hemolýze.

Stažení paže při venózním odběru a tzv. „cvičení“ paží by mělo být co nejkratší. V opačném případě dochází k přesunu tekutiny z cévního řečiště do intersticia a k již popsanému zvýšení koncentrace vysokomolekulárních látek v odebrané krvi až o 10%.

### **3.7.2.2. Odběrová nádobka**

Vždy by měla platit zásada: nejprve popsat nádobku jménem pacienta a ještě před vlastním odběrem jméno znovu zkontrolovat, tím zcela vyloučíme možnost záměny. Ideální je identifikace pacienta pomocí čárového kódu.

Nejvhodnější jsou odběrové nádobky na jedno použití. Jsou však většinou z plastické hmoty, ve které se krev pomalu a nedostatečně sráží a častěji dochází k hemolýze. Výrobce proto opatřuje stěny odběrových zkumavek vrstvou kaolinu, což urychlí srážení. Kapiláry z plastické hmoty se hodí k odběru krve na vyšetření krevních plynů jen v případě, že je analýza provedena bezprostředně po odběru. Plastická hmota je totiž propustná pro plyny. Skleněné nádobky dovolí lepší sražení krve, mají však dvě nevýhody, první je častější prasknutí při odstředování. Před opakovaným použitím je nutné nádobku dekontaminovat a umýt zbytky užitých činidel, což představuje druhou nevýhodu.

### 3.7.2.3. Vyšetření z nesrážlivé krve a z plazmy

Na tomto místě je nutné uvést, že plazma a sérum se od sebe liší více než jen nepřítomností koagulačních faktorů, zejména fibrinogenu v séru. Během koagulace se totiž z rozpadlých trombocytů uvolňují některé jejich složky, které pak jeví v séru vyšší koncentraci. Sérum bývá také častěji hemolytické, v tomto případě se do séra dostávají látky obsažené v cytoplasmě erytrocytů. Tak má sérum vyšší aktivitu kyselé fosfatázy, ale i koncentraci draslíku.

První zásadou je dodržet předepsaný poměr mezi objemem roztoku antikoagulantu a přidané krve, nebo při užití odparku protisrážlivého činidla přidat předepsaný objem krve do odběrové nádoby. Vždy přidáváme krev do odběrové nádoby s antikoagulačním přípravkem, nikdy naopak. Krev musíme v nádobce dokonale promíchat, aby se odparek rozpustil, a to opakovaným převrácením odběrové nádoby. Antikoagulační přípravek dále ovlivňuje složení odebrané krve. Všechny antikoagulanty včetně heparinu vážou ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a tedy snižují jejich koncentraci, totéž platí i pro ionty  $\text{Mg}^{2+}$ . Pro stanovení  $\text{Ca}^{2+}$  je nutné používat heparin titrovaný těmito ionty. Může dojít k inhibici enzymů.

Tab. 2: Nejčastěji používaná antikoagulancia

Antikoagulant	Koncentrace ( na ml plazmy)	Analýza
lithium heparin	10 – 20 jednotek	biochemie
sodium fluoride	1 –2 mg 6 –10 mg	glukóza (inhibuje glykolýzu) všeobecné užití
potassium oxalate	3 mg	glukóza
sodium citrate	3 mg	elektron spin resonance
EDTA	2 mg	hematologie, stabilizace snadno oxidovatelných vzorků
EGTA	2 mg	hematologie, stabilizace snadno oxidovatelných vzorků

### 3.7.3. Transport vzorku

Krev při transportu chráníme před extrémní teplotou (v teple dochází k inaktivaci enzymů a rychleji klesá koncentrace glukózy, mráz může způsobit hemolýzu). Transport musí být dostatečně rychlý, aby mohlo být včas odděleno sérum od erytrocytů. Na delší vzdálenosti raději posíláme sérum než plnou krev, v opačném případě hrozí mechanická hemolýza.

### 3.7.4. Uchovávání vzorku

Při delším stání odebrané krve dochází k vyčerpání energetických zdrojů erytrocytů (glukózy), ty pak nemohou udržet základní metabolické děje. Dochází k úniku  $K^+$  z erytrocytů a naměříme hyperkalémii aniž dojde k hemolýze. Únik kalia z buněk se urychlí, uskladníme-li odebranou krev v chladničce, neboť udržování  $K^+$  v buňce je enzymový děj, který s poklesem teploty ustává.

Většina vyšetření se provádí z krevního séra. Není-li provedeno stanovení ihned, obvykle stačí uchovávat sérum v chladničce při  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  v dobře uzavřené zkumavce, aby nedošlo k zahuštění vzorku odpařením vody. Většina analytů včetně enzymů je stabilní řadu dní. Při delším skladování se sérum uchovává zmrazené (při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , event. při  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), výjimečně se upravuje mrazovou sublimací (lyofilizací). Tento způsob konzervace se však užívá spíše u kontrolních sér. Chemická konzervační činidla se ke stabilizaci sér užívají vzácně a je nutné je předem ověřit, zda neruší při požadované analýze.

### 3.7.5. Prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze

Patří sem odstředění krve a oddělení séra či plazmy, deproteinace vzorku před analýzou, zahuštění vzorku, vzácněji též další postupy např. promývání erytrocytů apod. Při odstředování, je-li příliš razantní, hrozí nebezpečí hemolýzy. Při deproteinaci, obvykle chemické, je zapotřebí zvolit vhodné činidlo opět podle charakteru stanovované látky a pracovního postupu.[10]

**Doporučení pro uchovávání biologického materiálu pro stanovení vitamínu A dle preanalytické příručky [46]:**

**1.Plazma** látková koncentrace vitamínu A c ( $\mu\text{mol/l}$ )

Primární vzorek: krev

Odběrový systém: sklo nebo plast s protisrážlivou úpravou

Pokyny k odběru: zabránit hemolýze, chránit před světlem

Stabilita: + 20 °C až + 25 °C 2 dny, + 4 °C až +8 °C 1 týden, -20 °C 1 rok

**2.Sérum** látková koncentrace vitamínu A c ( $\mu\text{mol/l}$ )

Primární vzorek: krev

Odběrový systém: sklo nebo plast bez úpravy

Pokyny k odběru: zabránit hemolýze, chránit před světlem

Stabilita: + 20 °C až + 25 °C 2 dny, + 4 až + 8 °C 1 týden, -20 °C 1 rok

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1. Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf:  
HPLC sestava od firmy PERKIN ELMER (Norwalk, USA)  
diode array detektor LC 235C  
monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt Německo)  
software Turbochrom verze 4.1 PERKIN ELMER
- Laboratorní třepačka LT-1 (Česká republika)
- Chlazená centrifuga HERAEUS 400 R ( Hanau, Německo)
- Elektrický vibrační strojek VIBRO Em 580 ( Česká republika)
- Analytické váhy A + D company 202 M (Hradec Králové, Česká republika)
- AD Koncentrátor Ependorf, MEDESA (Polička, Česká republika)

## 4.2. Chemikálie

- n-hexan p.a., MERCK (Darmstadt, Německo)
- methanol - research grade, MERCK (Darmstadt, Německo)
- ethanol denaturovaný 5 % methanolu, PENTA (Praha, Česká republika)
- toluen p.a., PENTA (Chrudim, Česká republika)
- 2-propanol gradient HPLC grade, SCHARLAUCHEMIE a.s. (Sentmenat, Španělsko)
- redestilovaná destilovaná voda, GORO (Praha, Česká republika)

## 4.3. Standardy

- D,L - $\alpha$ -tocopherol, FLUKA, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)
- Kyselina retinová, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)
- Retinyl-acetát, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)
- Retinyl-propionát, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)

- All-trans retinol, FLUKA, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)
- Retinyl-palmitát, FLUKA, SIGMA ALDRICH (Praha, Česká republika)
- Retinyl-stearát byl syntetizován na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové

**Postup pro syntézu esterů retinolu [47]:**

Retinyl-stearát ( $C_{38}H_{64}O_2$ ; Mol. hmotnost: 552,91)

K 0,3437 g (1,2 mmol) retinolu bylo v argonové atmosféře přidáno 0,3 ml pyridinu a 0,4241 g stearyl-chloridu (1,4 mmol). Směs byla krátce zahřáta na 50 – 60 °C a potom míchána 2 hodiny ve tmě. Po ochlazení byla směs rozpuštěna v n-hexanu (50 ml). Vzniklý roztok byl promyt nejprve 50 ml roztoku NaOH (0,1 mol/l) v 50% ethanolu, potom 50 ml roztoku HCl (0,1 mol/l), 50 ml roztoku NaOH (0,03 mol/l) v 50% ethanolu a nakonec 50 ml vody. Po oddestilování hexanu byl zbytek čištěn sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém.

## 4.4. Příprava zásobních a pracovních roztoků

### 4.4.1. Zásobní roztoky

- Zásobní roztok retinyl-palmitátu  $c = 2\ 000\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 10,49 mg retinyl-palmitátu v hexanu a doplněn do 10 ml.
- Zásobní roztok retinyl-stearátu  $c = 2\ 000\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 11,06 mg retinyl-stearátu v hexanu a doplněn do 10 ml.
- Zásobní roztok  $\alpha$ -tokoferolu  $c = 2\ 000\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 8,62 mg v methanolu a doplněn do 10 ml.
- Zásobní roztok retinolu  $c = 500\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 7,16 mg retinolu v methanolu a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok retinyl-propionátu  $c = 500\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 8,56 mg retinyl-propionátu v methanolu a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok retinyl-acetátu  $c = 500\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 8,21 mg retinyl-acetátu v methanolu a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok kyseliny retinové  $c = 500\ \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 7,51 mg kyseliny retinové v methanolu a doplněn do 50 ml.
- Zásobní roztok retinolu  $c = 4\ \mu\text{mol/l}$  pro opakovatelnost byl připraven rozpuštěním 0,57 mg retinolu v 50 ml methanolu.
- Zásobní roztok  $\alpha$ -tokoferolu  $c = 40\ \mu\text{mol/l}$  pro opakovatelnost byl připraven rozpuštěním 8,61 mg  $\alpha$ -tokoferolu v 50 ml methanolu.
- Zásobní roztok retinyl-palmitátu  $c = 40\ \mu\text{mol/l}$  pro opakovatelnost byl připraven rozpuštěním 10,48 mg retinyl-palmitátu v 50 ml hexanu.
- Zásobní roztok retinyl-stearátu  $c = 16\ \mu\text{mol/l}$  pro opakovatelnost byl připraven rozpuštěním 4,42 mg retinyl-stearátu v 50 ml hexanu.
- Zásobní roztok retinolu  $c = 4\ \mu\text{mol/l}$  pro opakovatelnost byl připraven rozpuštěním 0,57 mg retinolu v 50 ml methanolu.
- Zásobní roztok retinolu  $c = 8\ \mu\text{mol/l}$  pro robustnost byl připraven rozpuštěním 1,15 mg retinolu v 50 ml methanolu.
- Zásobní roztok  $\alpha$ -tokoferolu  $c = 55\ \mu\text{mol/l}$  pro robustnost byl připraven rozpuštěním 11,8 mg retinolu v 50 ml methanolu.



- Zásobní roztok retinyl-palmitátu  $c = 50 \mu\text{mol/l}$  pro robustnost byl připraven rozpuštěním 13,12 mg retinyl-palmitátu v 50 ml hexanu.
- Zásobní roztok retinyl-stearátu  $c = 50 \mu\text{mol/l}$  pro robustnost byl připraven rozpuštěním 13,8 mg retinyl-stearátu v 50 ml hexanu.

#### 4.4.2. Pracovní roztoky

- Pracovní roztoky pro kalibraci retinolu byly připraveny zředěním zásobního roztoku retinolu  $c = 500 \mu\text{mol/l}$  methanolem na koncentrace  $c = 0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 0,25 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 0,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 1 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 2,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 5 \mu\text{mol/l}$  a  $c = 10 \mu\text{mol/l}$ .
- Pracovní roztoky pro kalibraci  $\alpha$ -tokoferolu byly připraveny zředěním zásobního roztoku  $\alpha$ -tokoferolu  $c = 2\ 000 \mu\text{mol/l}$  methanolem na koncentrace  $c = 0,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 2,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 10 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 25 \mu\text{mol/l}$  a  $c = 50 \mu\text{mol/l}$ .
- Pracovní roztoky pro kalibraci retinyl-palmitátu byly připraveny zředěním zásobního roztoku retinyl-palmitátu  $c = 2\ 000 \mu\text{mol/l}$  methanolem na koncentrace  $c = 0,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 1 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 2,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 10 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 20 \mu\text{mol/l}$  a  $c = 40 \mu\text{mol/l}$ .
- Pracovní roztoky pro kalibraci retinyl-stearátu byly připraveny zředěním zásobního roztoku retinyl-stearátu  $c = 2\ 000 \mu\text{mol/l}$  methanolem na koncentrace  $c = 0,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 1 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 2,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 5 \mu\text{mol/l}$ ,  $c = 10 \mu\text{mol/l}$  a  $c = 20 \mu\text{mol/l}$ .
- Pracovní roztok pro opakovatelnost byl připraven smícháním zásobních roztoků pro opakovatelnost jednotlivých látek v poměru 1 : 1 : 1 : 1.
- Pracovní roztok pro robustnost byl připraven smícháním zásobních roztoků pro robustnost jednotlivých látek v poměru 1 : 1 : 1 : 1.

## 4.5. Vývoj metody a optimalizace chromatografických podmínek

Nejdříve bylo nutné najít optimální chromatografické podmínky. Při hledání vhodné vlnové délky pro detekci jednotlivých látek byla proměřena UV spektra stanovovaných látek a následně byla zvolena vlnová délka, při níž mají látky maximální odezvu detektoru.

Jako stacionární fáze byla použita monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm s náplní tvořenou silikagelovou monolitní stacionární fází vzhledem k tomu, že vyvíjená metoda bude sloužit pro klinické hodnocení a měla by splnit požadavek rychlé a jednoduché analýzy z důvodu velkého množství biologických vzorků.

Důležitým krokem při vývoji metody byla volba vhodné mobilní fáze a optimalizace jejího průtoku.

### Příprava vzorku

Vzorek pro analýzu byl připraven metodou liquid-liquid extrakce z krevního séra.

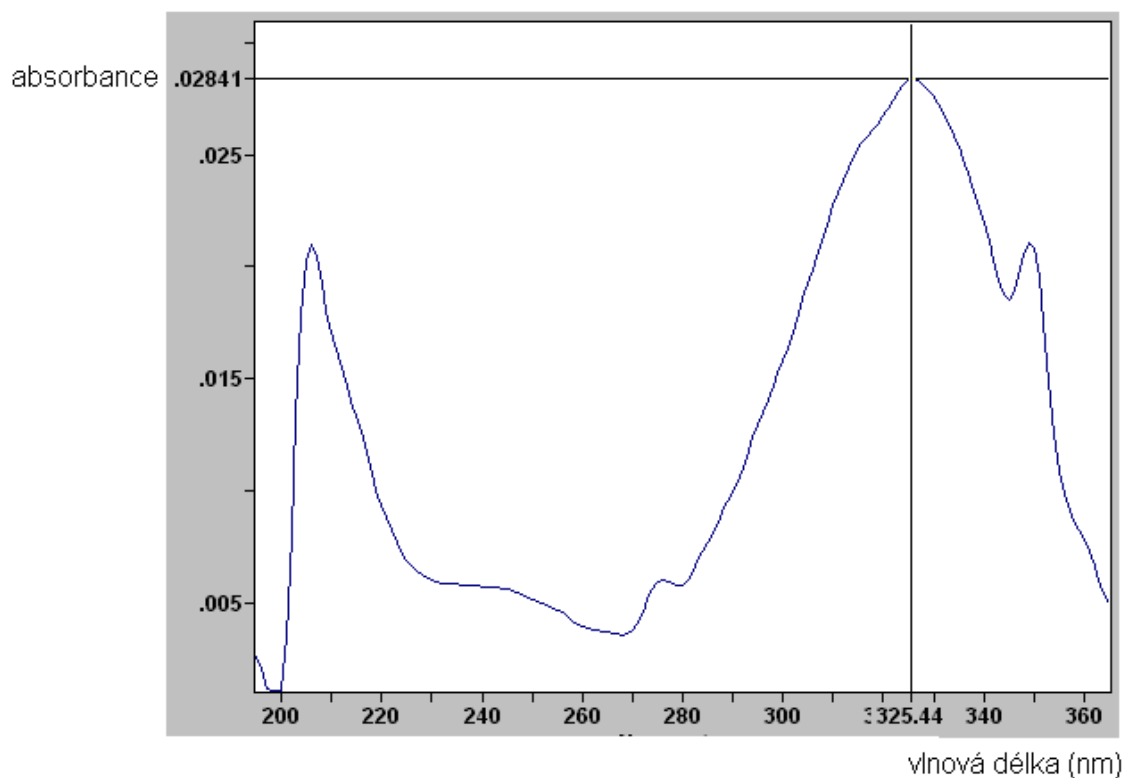
## **5.VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 5.1. Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

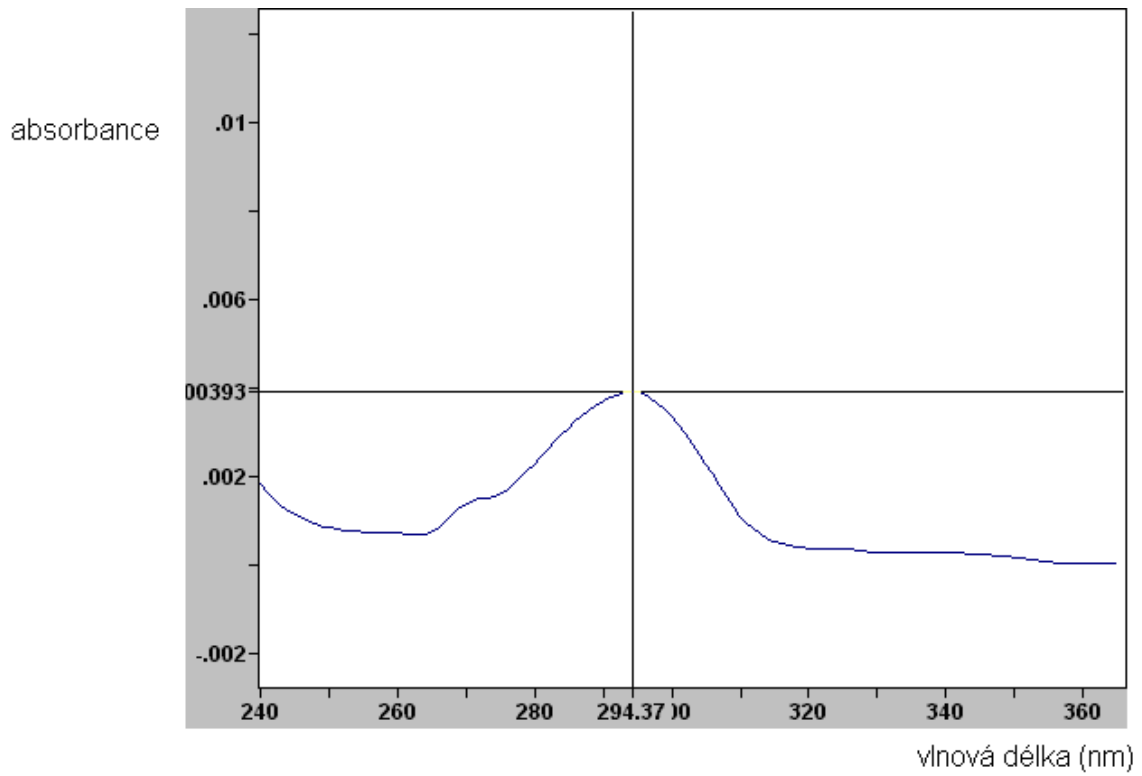
Cílem bylo nalézt optimální podmínky pro analýzu tzn. takové, za kterých bude možné provést separaci, identifikaci a kvantifikaci sledovaných látek a poté validaci vyvinuté metody.

### 5.1.1. Vlnová délka detektoru

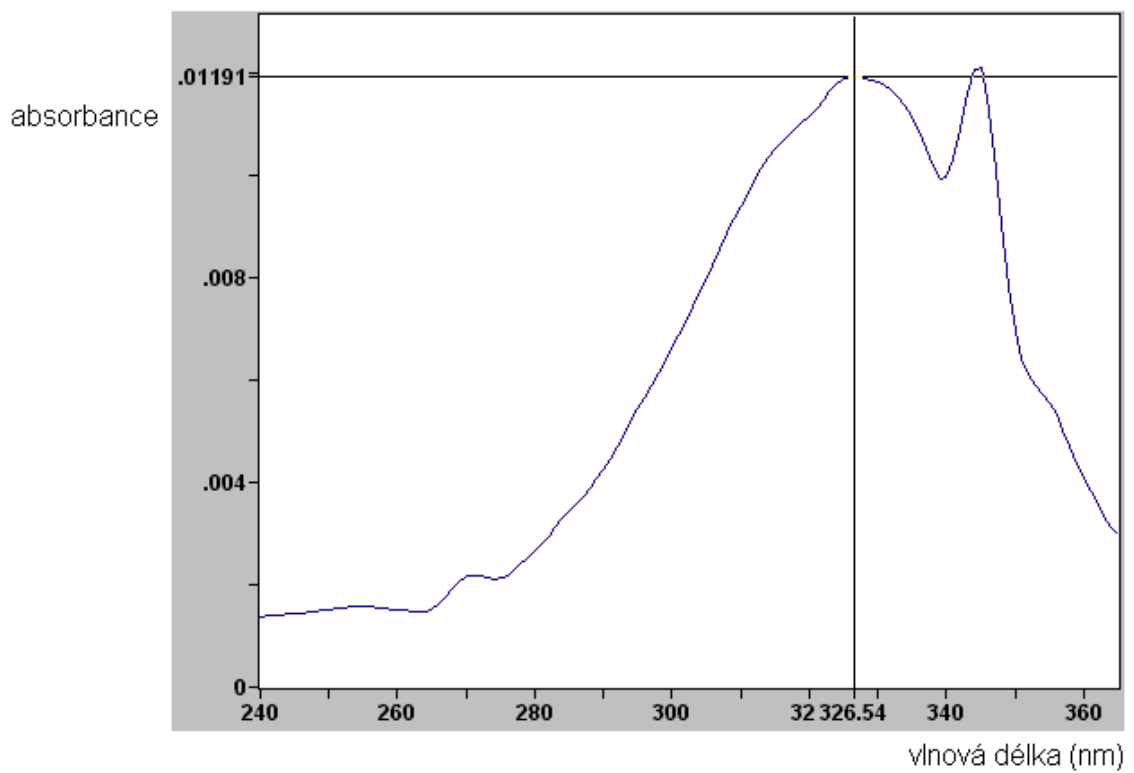
Pro stanovení optimální vlnové délky byla změřena UV spektra v roztocích standardů. V úvahu byly brány také výsledky rešerše.[19, 20, 48, 49, 50]



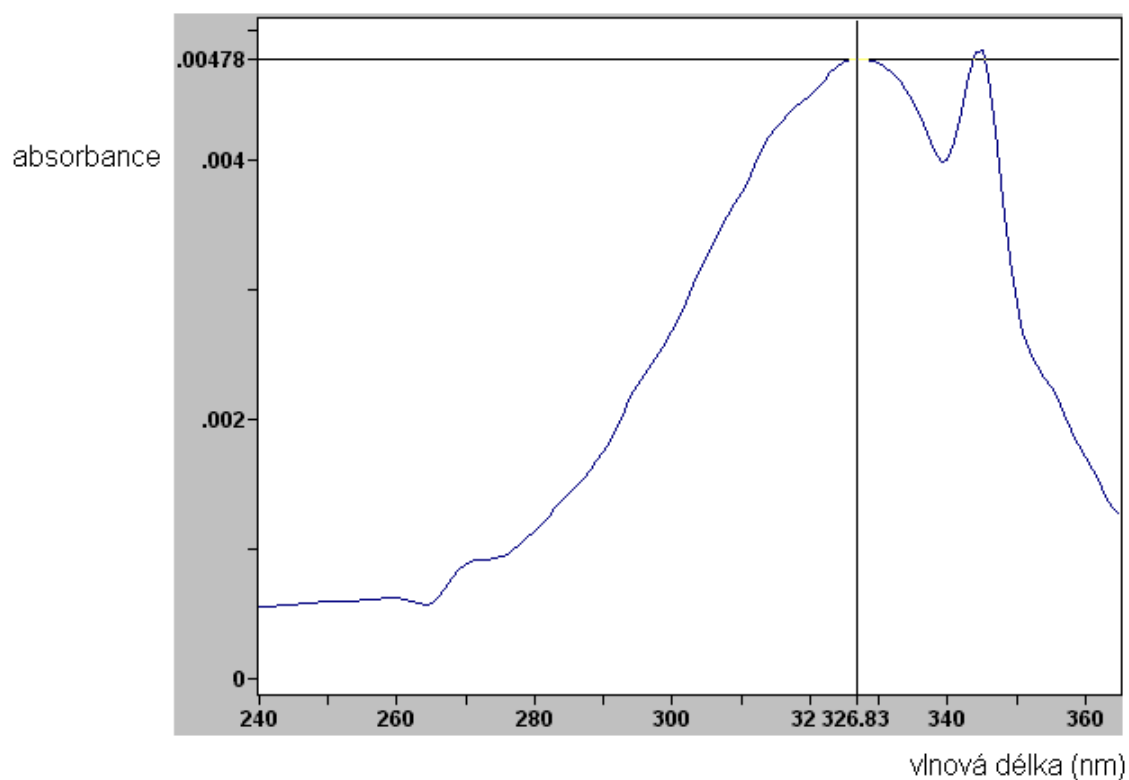
Obr.10: UV spektrum retinolu v methanolu



*Obr.11:* UV spektrum  $\alpha$ -tokoferolu v methanolu



*Obr.12:* UV spektrum retinyl-palmitátu v methanolu



*Obr.13:* UV spektrum retinyl-stearátu v methanolu

Na základě výsledků měření UV spekter analyzovaných látek a výsledků rešerše. Byly zvoleny tři optimální vlnové délky:

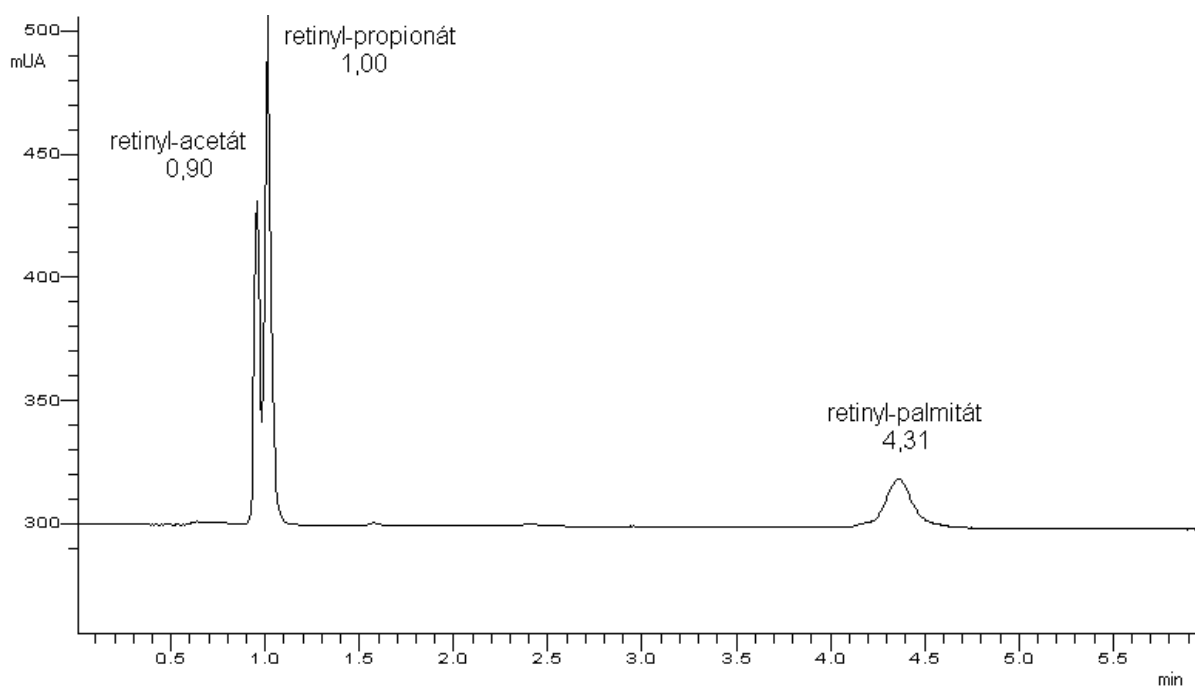
retinol	325 nm
$\alpha$ -tokoferol	295 nm
retinyl-palmitát	330 nm
retinyl-stearát	330 nm

Absorpční maxima jednotlivých látek, která byla změřena v methanolu, lze rovněž aplikovat u mobilních fází použitých ve vyvinuté metodě.

### 5.1.2. Složení mobilní fáze

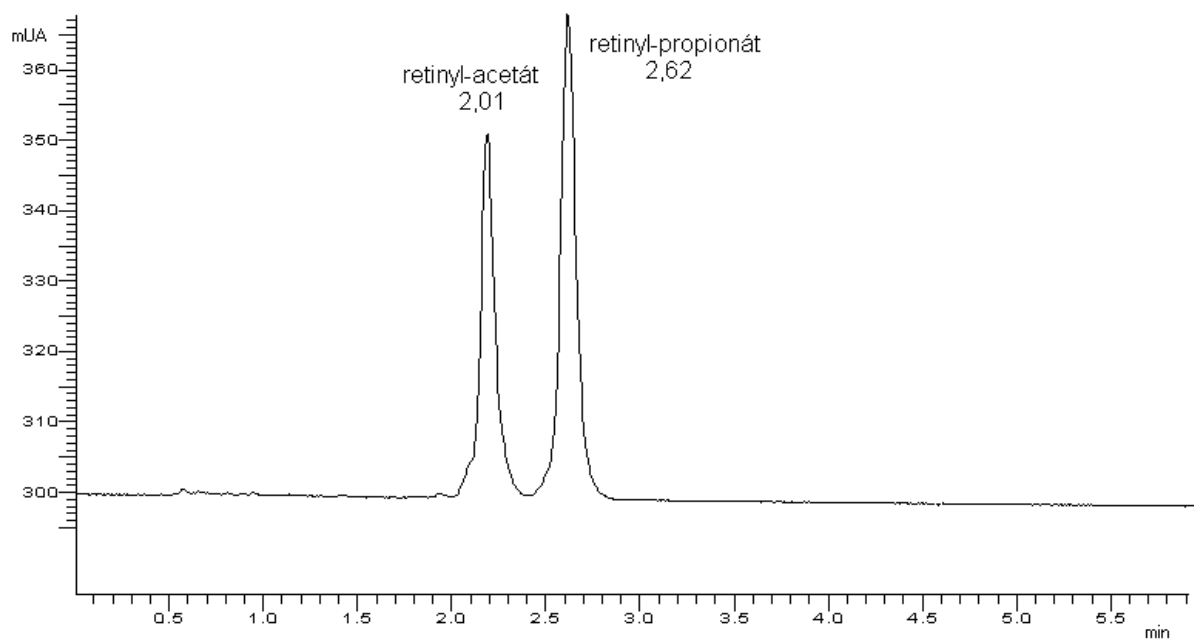
Při hledání optimálního složení mobilní fáze bylo využito poznatků z rešerše. [18, 19, 20, 21, 22, 23]

1. V první fázi vývoje metody jsem hledala podmínky pro stanovení retinyl-acetátu, retinyl-propionátu a retinyl-palmitátu. Dle výsledků rešerše jsem zvolila mobilní fázi methanol a průtok 2,5 ml/min. Retinyl-acetát a retinyl-propionát tvořili v čase 0,90 - 1,0 min dvojpík a retinyl-palmitát se eluoval v čase 4,31 min.



*Obr.14:* Chromatogram směsi retinyl-acetát, retinyl-propionát a retinyl-palmitát při mobilní fázi methanol a průtoku 2,5 ml/min.

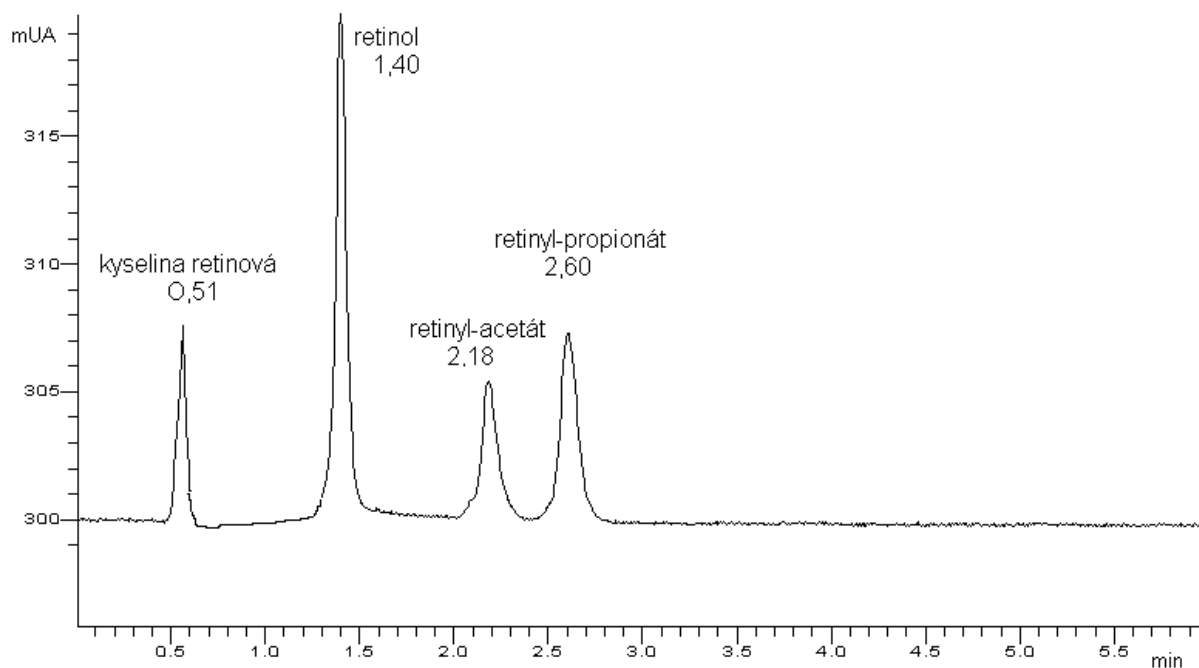
Dále jsem se soustředila na rozdělení píků retinyl-acetátu a retinyl-propionátu. Lepšího oddělení lze dosáhnout v mobilní fázi methanol : voda (95 : 5). K úplnému oddělení dochází v mobilní fázi methanol : voda (90 : 10). Retenční čas retinyl-palmitátu se však v této mobilní fázi posune více než na 8 minut, což je pro požadavek krátké doby analýzy nepřijatelné.



*Obr.15:* Chromatogram směsi retinyl-acetát, retinyl-propionát a retinyl-palmitát při mobilní fázi methanol : voda (90 : 10) a průtoku 2,5 ml/min.



2. V druhé fázi byly přidány další dvě látky kyselina retinová a retinol. Tyto dvě látky tvoří v mobilní fázi methanol dvojpík v čase 0,6 min. Dvojpík lze oddělit mobilní fází methanol : voda (90 : 10). V této mobilní fázi jsou všechny látky odděleny.

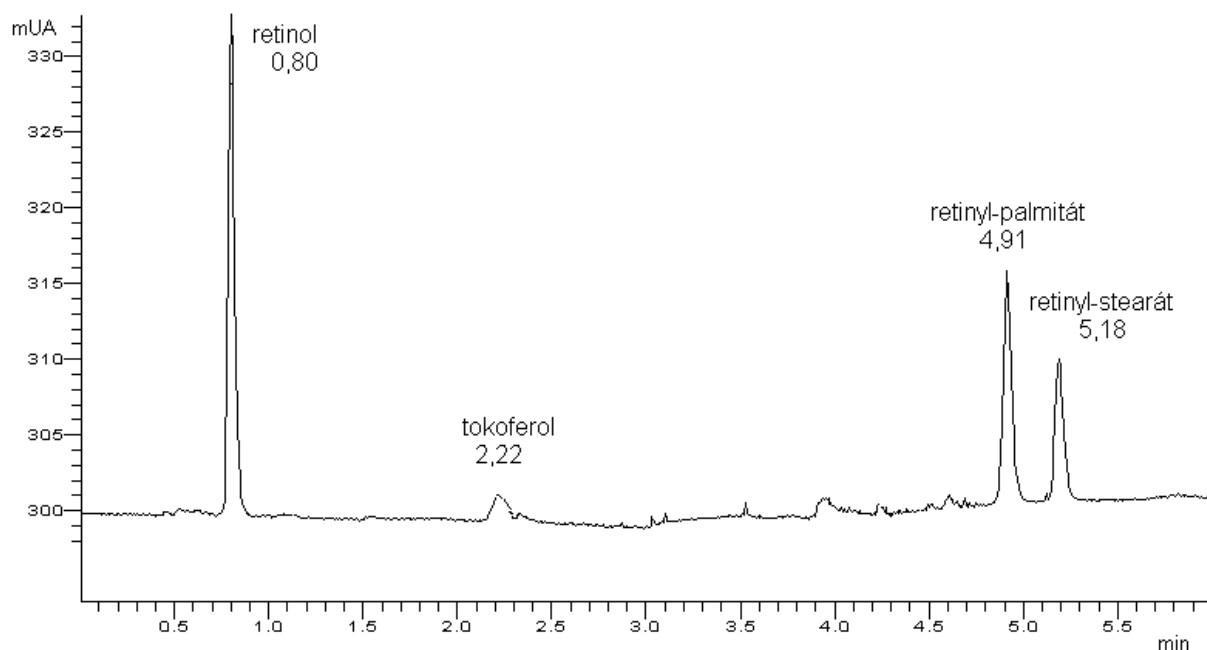


Obr.16: Chromatogram směsi kyseliny retinové, retinol, retinyl-acetát, retinyl-propionát a retinyl-palmitát při mobilní fázi methanol : voda (90 : 10) a průtoku 2,5 ml/min

3. V poslední fázi jsem se rozhodla do směsi analyzovaných látek přidat  $\alpha$ -tokoferol, bylo nutné také nastavit v místě eluce  $\alpha$ -tokoferolu přepnutí vlnové délky detektoru na 295 nm. Již nám byl také dodán standard retinyl-stearátu, který byl syntetizován na Katedře farmaceutické chemie a kontroly chemických léčiv. Pro zkrácení doby analýzy jsem zvolila průtok 3 ml/min. Kyselina retinová se v této mobilní fázi (methanol : voda, 90 : 10) eluuje v čase 0,40 min, retinol v 1,18 min, retinyl-acetát v čase 1,86 min, retinyl-propionát 2,20 min a  $\alpha$ -tokoferol v 3,5 min. Kvůli rozdílné polaritě jednotlivých analytů a zkrácení doby analýzy jsem zvolila gradientovou eluci. Při analýze lidského séra jsem zjistila, že retinyl-acetát není pro analýzu lidského séra významný a v lidském séru nebyl zaznamenán. Z tohoto důvodu jsem na jeho analýzu při dalších

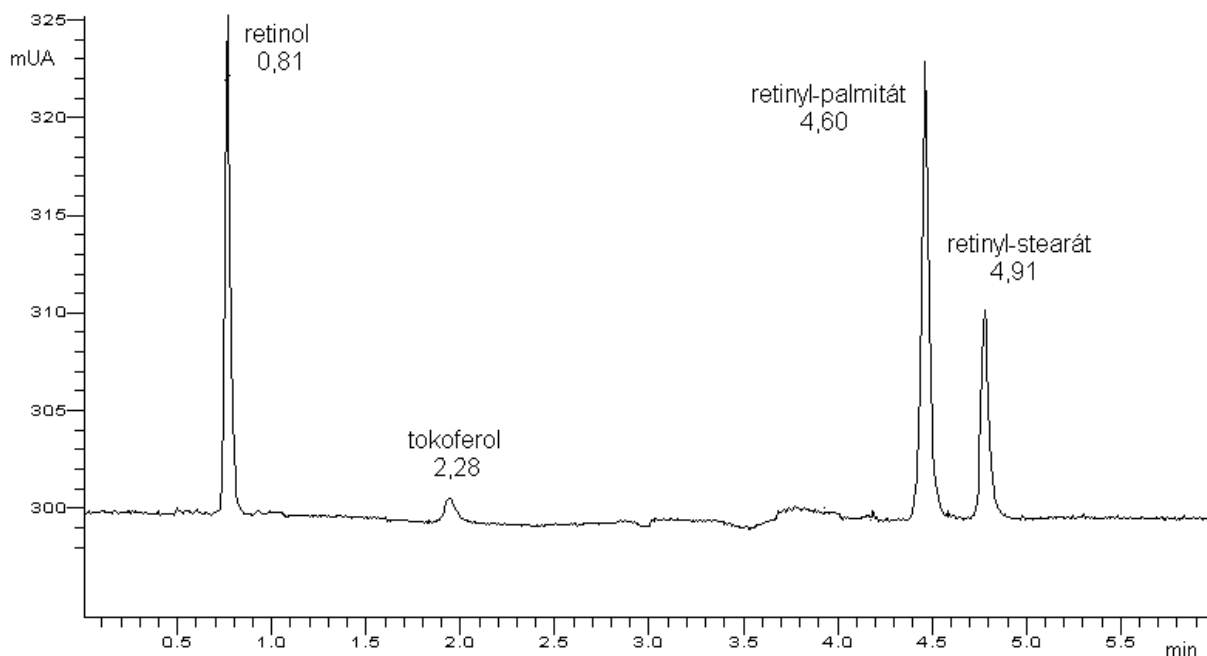
pokusech přestala brát zřetel. A proto jsem jako mobilní fázi č.1 zvolila methanol : voda (95 : 5) a průtok 3 ml/min, což vede ke zkrácení času analýzy, a látky jsou zcela odděleny.

4. Dále jsem se soustředila na hledání mobilní fáze č.2, pokusila jsem se o směs rozpouštědel methanol : acetonitril : 2-propanol (30 : 10 : 70). Retenční čas píku retinyl-palmitátu se zkrátil, ale došlo také k výraznému nárůstu tlaku v systému. Tlak se snížil při poměru methanol : propanol : acetonitril (50 : 45 : 5). Píky retinyl-palmitátu a retinyl-stearátu jsou při této mobilní fázi odděleny a eluují se do 5,5 minuty od začátku analýzy.



*Obr.17:* Chromatogram směsi retinol,  $\alpha$ -tokoferol retinyl-palmitát, retinyl-stearát při gradientové eluci. Mobilní fáze č.1 methanol : voda, 95 : 5 (2,1 min) a mobilní fázi č. 2 methanol : propanol : acetonitril, 50 : 45 : 5 (3,9 min) a průtoku 3 ml/min

5. Ke zkrácení doby analýzy a rozdělení látek nastává při mobilní fázi č.2 methanol : propanol (50 : 50) a také dochází k poklesu tlaku. Jako nej-optimálnější jsem proto zvolila poměr methanol : propanol (60 : 40).



*Obr. 18:* Chromatogram směsi retinol,  $\alpha$ -tokoferol, retinyl-palmitát, retinyl-stearát při gradientové eluci. Mobilní fáze č.1 methanol : voda, 95 : 5 (2,1 minut ) a mobilní fázi č. 2 methanol : propanol, 60 : 40 (2,8 minuty) a průtoku 3 ml/min

6. Pro zkrácení času reekvilibrace kolony jsem v čase analýzy 4,5 minuty zvolila opět mobilní fázi č. 1 (po dobu 1,5 minuty). Metodou lze stanovit také kyselinu retinovou, ale pro tuto látku nebyla zatím provedena validace. I když mezi výsledné analyty nebyl zahrnut retinyl-acetát a retinyl-propionát, byla nalezena vhodná mobilní fáze pro jejich oddělení (methanol : voda, 90 : 10). Tuto mobilní fázi lze v případě potřeby zaměnit za mobilní fázi methanol : voda (95 : 5) a metodu znova validovat. Dochází tak sice k mírnému prodloužení analýzy, ale získá se tak možnost stanovit dvě další látky.

## Souhrn nalezených chromatografických podmínek

<b>Mobilní fáze:</b>	gradientová eluce 1.mobilní fáze: methanol - voda (95 : 5) 2,1 min 2.mobilní fáze: methanol - propanol (60:40) 2,8 min 3. mobilní fáze: methanol – voda (95 : 5) 1,5 min
<b>Průtok (ml/min):</b>	3 ml/min
<b>Vlnová délka <math>\lambda</math> (nm):</b>	325 nm 0-1,8 min, 295 nm 1,8-3,2 min, 330 nm 3,2-6 min
<b>Dávkovaný objem:</b>	20 $\mu$ l
<b>Režim:</b>	gradientový
<b>Doba analýzy:</b>	6 min

### 5.1.3. Příprava vzorku

#### 5.1.3.1. Vývoj extrakčního postupu

Nejdříve byla pro extrakci stanovovaných látek testována metoda pro extrakci vitamínu A a E z lidského séra, již zavedená v laboratoři Gerontologické a metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

##### Pracovní postup:

K 0,5 ml séra bylo přidáno 2,5 ml extrakčního činidla n-hexanu, následně bylo sérum deproteinováno přidávkem 0,5 ml lihu denaturovaného 5 % methanolu (5min). Po deproteinaci séra byl vzorek protřepán 5 min a dále centrifugován 10 min při 1 600 x g a 0 °C. Z horní organické fáze bylo odebráno 2,0 ml supernatantu a odpařeno pomocí koncentrátoru.

Odparek byl rozpuštěn v 400  $\mu$ l methanolu a analyzován pomocí HPLC systému.

Tento postup extrakce se ukázal být nevhodný pro estery retinolu – nízká návratnost, proto jsem testovala další možnosti extrakčního činidla.

Zvolila jsem směs rozpouštědel hexan a toluen. Jako nejoptimálnější se ukázal být poměr hexan : toluen 8 : 2. Následně jsem upravila pracovní postup a pro zvýšení výtěžnosti jsem použila dvojitou extrakci. Dalším problémem byla příprava vzorku před analýzou (rozpuštěním odparku v methanolu). Tento postup ukázal, že estery z odparku se v methanolu nedostatečně rozpouští, proto jsem odparek nejdříve

rozpustila v 100  $\mu$ l hexanu a následně v 300  $\mu$ l methanolu. Následovaly další menší úpravy postupu, jako je třepání před a po deproteinaci a deproteinace za snížené teploty (4 °C). Touto změnou extrakčního postupu se výtěžnost esterů retinolu zvýšila z 58 % na 98 %.

### **5.1.3.2. Výsledný extrakční postup**

K 0,5 ml séra bylo přidáno 2,5 ml extrakční směsi hexan : toluen (8 : 2). Po protřepání (5 min na třepačce) bylo sérum deproteinováno přidavkem 0,5 ml lihu denaturovaného 5 % methanolu (5 min při 4 °C). Po deproteinaci séra byl vzorek opět protřepán (5 min) a dále centrifugován 10 minut při 1600 x g a teplotě 0 °C. Z horní organické fáze bylo následně odebráno 2,0 ml supernatantu. Tento postup byl proveden opakovaně. Oba podíly organické fáze po dvojité extrakci byly spojeny a společně odpařeny pomocí koncentrátoru.

Odparek byl rozpuštěn v 100  $\mu$ l hexanu a 300  $\mu$ l methanolu a analyzován pomocí HPLC systému.

## 5.2. Validace metody

Testované validační parametry :

### 1. Test způsobilosti systému:

Účinnost chromatografické kolony

Asymetrie chromatografických píků

Rozlišení chromatografických píků

Opakovatelnost analýzy

### 2. Další validační parametry:

Linearita

Správnost

Přesnost

Robustnost

Stabilita

Detekční a kvantitativní limit

### 5.2.1. Test způsobilosti systému

#### 5.2.1.1. Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony (počet teoretických pater - N) byla vypočítána podle vzorce:

$$N = 5,545 \cdot (t_R / W_{0,05})^2$$

$t_R$  = retenční čas (min)

$W_{0,05}$  = šířka píku v polovině výšky (min)

Tab.3: Účinnost chromatografické kolony

Látka	$t_R$ (min)	$W_{0,05}$ (min)	N
retinol	0,678	0,026	3771
$\alpha$ -tokoferol	2,151	0,104	2372
retinyl-palmitát	4,765	0,046	60814
retinyl-stearát	4,481	0,039	73202

Požadavek  $N > 900$

Z Tab. 3 vyplývá, že požadavek na počet teoretických pater ( $N > 900$ ) je splněn.

Jestliže známe celkovou délku kolony (L), můžeme vypočítat i výškový ekvivalent teoretického patra H:

$$H = L / N$$

Výškový ekvivalent teoretického patra má rozměr délky. Na základě hodnot H je možno účinnost chromatografických kolon porovnávat.

Tab.4: Výškový ekvivalent teoretického patra

Látka	H ( $\mu\text{m}$ )
retinol	26,52
$\alpha$ -tokoferol	42,15
retinyl-palmitát	1,64
retinyl-stearát	1,37

### 5.2.1.2. Asymetrie chromatografických píků (T)

Asymetrie chromatografických píků byla vypočítána dle vzorce:

$$T = W_{0,01} / 2f$$

$W_{0,01}$  = šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku

F = menší část úsečky, která vznikne protnutím úsečky  $W_{0,01}$ , kolmicí spuštěnou z vrcholu píku.

Tab.5: Asymetrie chromatografických píků

Látka	$W_{0,01}$ (mm)	F (mm)	Asymetrie (T)
retinol	1,75	1,00	0,87
$\alpha$ -tokoferol	7,00	3,00	1,16
retinyl-palmitát	4,25	2,00	1,06
retinyl-stearát	5,00	2,00	1,25

Požadavek  $T < 2,0$

Požadavek na asymetrii chromatografických píků  $T < 2,0$  je splněn. Píky jsou symetrické.



### 5.2.1.3. Rozlišení chromatografických píků (R)

Rozlišení chromatografických píků bylo vypočteno dle vzorce:

$$R_{ij} = 2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj}) / (W_i + W_j)$$

$t_R$  = retenční čas látek (min)

$W$  = šířka píku na základně (min)

Tab.6: Rozlišení chromatografických píků

Látka	W (min)	$t_R$ (min)
retinol	0,0789	0,678
$\alpha$ -tokoferol	0,2894	2,151
retinyl-palmitát	0,2820	4,480
retinyl-stearát	0,2050	4,760

Vypočítané hodnoty  $R_{ij}$ :

$$R_{ij} (\text{retinol} : \alpha\text{-tokoferol}) = 7,456$$

$$R_{ij} (\alpha\text{-tokoferol} : \text{retinyl-palmitát}) = 8,639$$

$$R_{ij} (\text{retinyl-palmitát} : \text{retinyl-stearát}) = 3,380$$

Požadavek  $R_{ij} > 1,5$

Píky jednotlivých látek jsou od sebe dostatečně vzdáleny. Požadavek na rozlišení chromatografických píků je splněn.

#### 5.2.1.4. Opakovatelnost nástřiku

Tab.7: Opakovatelnost nástřiku

Látka	Plocha píku (průměr)	Směrodatná odchylka	RSD (%)
retinol	15467,21	146,7	0,95
$\alpha$ -tokoferol	13923,22	136,4	0,98
retinyl-palmitát	54296,93	537,9	0,99
retinyl-stearát	20508,79	201,3	0,99

n = 6

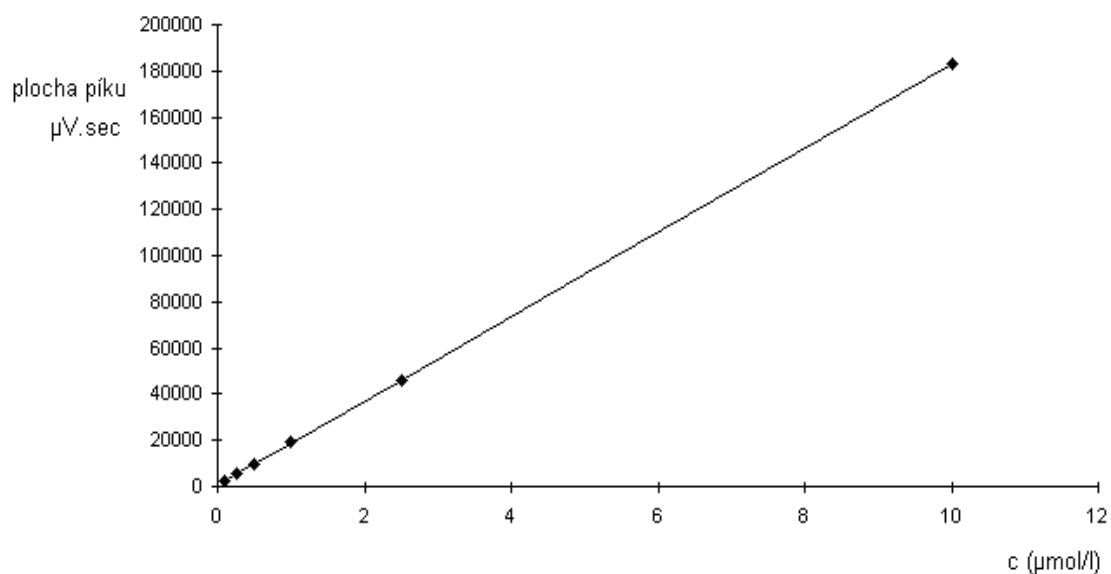
Požadavek RSD < 1 %

Relativní směrodatná odchylka (RSD) je u všech analyzovaných látek menší než 1 %.

#### 5.2.2. Další validační parametry

##### 5.2.2.1. Linearita

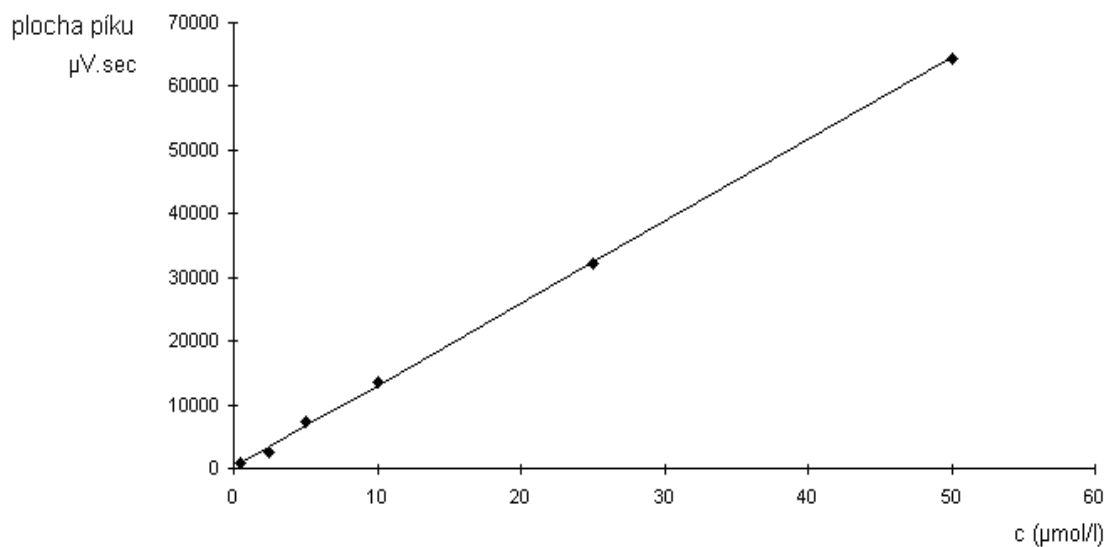
Linearita metody byla testována v rozsahu koncentrací  $c = 0,1 - 10 \mu\text{mol/l}$  pro retinol,  $0,5 - 50 \mu\text{mol/l}$  pro  $\alpha$ -tokoferol,  $0,5 - 40 \mu\text{mol/l}$  pro retinyl-palmitát,  $0,5 - 20 \mu\text{mol/l}$  pro retinyl-stearát. Kalibrační body byly vypočteny ze 3 měření.



Obr.19: Kalibrační přímka retinolu

Tab.8: Regresní parametry retinolu

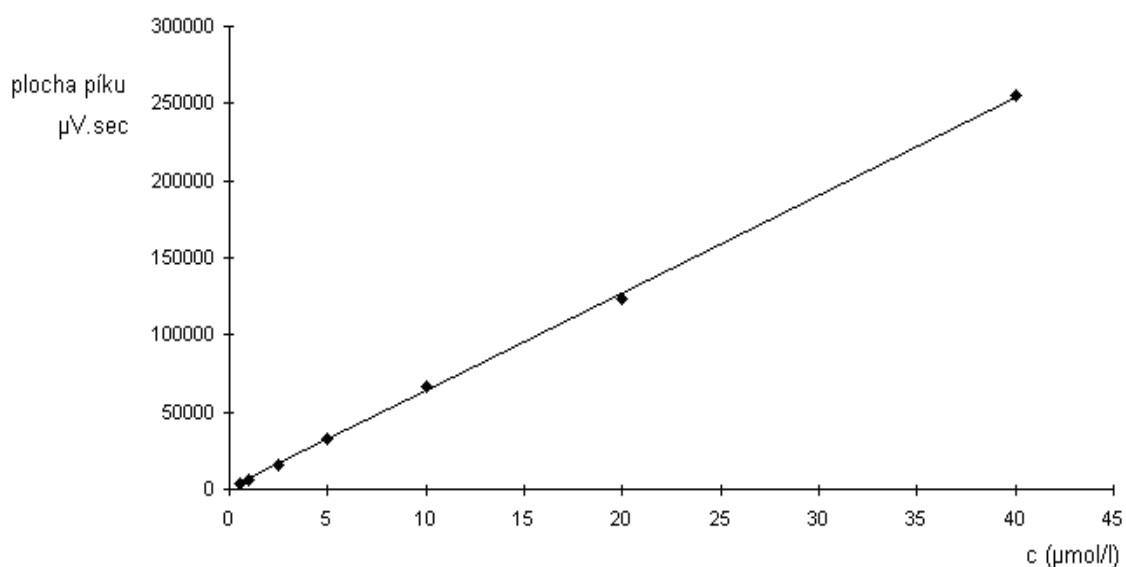
Regresní funkce : $y = kx + q$	
počet: bodů $n = 6$	počet stupňů volnosti: $\nu = 4$
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 18224 \pm 20$
absolutní člen	$q = 706 \pm 86$
koeficient korelace	$R = 0,999998$
reziduální odchylka	$S_{\text{rez}} = 174$
hodnota F-statistiky	$F = 8,04E+5$
Závislost $y$ na $x$	byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .
Ze souboru byl vyloučen odlehlý bod $x = 5$ ; $y = 95066.32$ .	



Obr.20: Kalibrační přímka  $\alpha$ -tokoferolu

Tab.9: Regresní parametry  $\alpha$ -tokoferolu

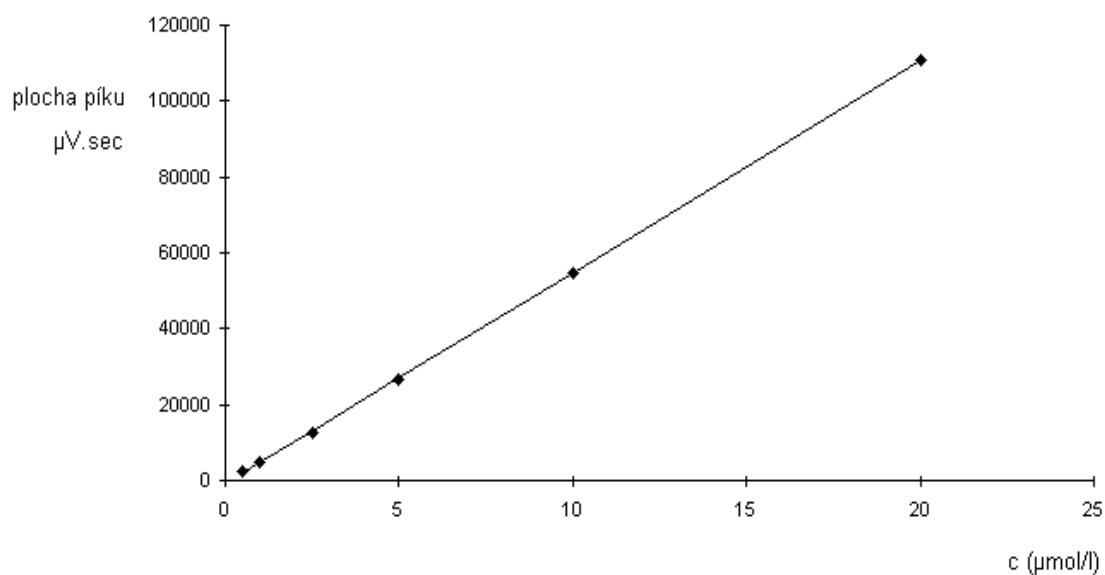
Regresní funkce : $y = kx + q$	
počet: bodů $n = 6$	počet stupňů volnosti: $\nu = 4$
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 1277,2 \pm 8,0$
absolutní člen	$q = 5,6E+2 \pm 1,9E+2$
koeficient korelace	$R = 0,999922$
reziduální odchylka	$s_{\text{rez}} = 339$
hodnota F-statistiky	$F = 2,57E+4$
Závislost $y$ na $x$ byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .	



Obr.21: Kalibrační přímka retinyl-palmitátu

Tab.10: Regresní parametry retinyl-palmitátu

Regresní funkce : $y = kx + q$	
počet: bodů $n = 7$	počet stupňů volnosti: $\nu = 5$
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 6337 \pm 63$
absolutní člen	$q = 6E+2 \pm 1,1E+3$
koeficient korelace	$R = 0,99975$
reziduální odchylka	$s_{\text{rez}} = 2,21E+3$
hodnota F-statistiky	$F = 1,02E+4$
Závislost $y$ na $x$	byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .



Obr.22: Kalibrační přímka retinyl-stearátu

Tab.11: Regresní parametry retinyl-stearátu

Regresní funkce : $y = kx + q$	
počet: bodů $n = 6$	počet stupňů volnosti: $\nu = 4$
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 5582 \pm 29$
absolutní člen	$q = -9,4E+2 \pm 2,7E+2$
koeficient korelace	$R = 0,999946$
reziduální odchylka	$s_{\text{rez}} = 482$
hodnota F-statistiky	$F = 3,73E+4$
Závislost $y$ na $x$	byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

Korelační koeficienty jednotlivých látek jsou  $> 0,999$ . Závislost odezvy detektoru na koncentraci látek je lineární.

### 5.2.2.2. Správnost

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku ke vzorku séra. Byly připraveny tři koncentrační úrovně. Každou koncentraci představovaly tři vzorky. Vypočtená koncentrace jednotlivých koncentračních úrovní (level 1-3) látek v séru (tj. součet koncentrace látky obsažené v séru a koncentrace přidaného standardu) viz. Tab 12.

Tab.12: Správnost - koncentrační úrovně

Koncentrační úroveň	Retinol (μmol/l)	α-tokoferol (μmol/l)	Retinyl-palmitát (μmol/l)	Retinyl-stearát (μmol/l)
level 1	0,98	14,40	10,14	5,59
level 2	1,48	19,40	15,14	8,09
level 3	1,98	24,40	20,14	10,59

n = 3

Výtěžnost  $R_i$  byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i = 100 \cdot c_i / c_0$$

$c_0$ .....je koncentrace vypočtená (součet koncentrace látky obsažené v séru a koncentrace přidaného standardu)

$c_i$ .....koncentrace stanovená HPLC metodou

Tab.13: Správnost - level 1

Látka	$c_0$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$c_i$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$R_i$ (%)
retinol	0,98	0,82	83,7
$\alpha$ -tokoferol	14,40	13,87	96,3
retinyl-palmitát	10,00	9,70	97,0
retinyl-stearát	5,00	4,50	90,0

n = 3

Tab.14: Správnost - level 2

Látka	$c_0$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$c_i$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$R_i$ (%)
retinol	0,50	0,48	96,0
$\alpha$ -tokoferol	5,00	4,50	90,0
retinyl-palmitát	15,00	15,60	104,0
retinyl-stearát	7,50	11,06	88,5

n = 3

Tab.15: Správnost - level 3

Látka	$c_0$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$c_i$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$R_i$ (%)
retinol	1,00	0,96	96,0
$\alpha$ -tokoferol	5,00	4,39	87,8
retinyl-palmitát	20,00	19,26	96,3
retinyl-stearát	10,00	10,06	100,6

n = 3

Požadavek RSD < 10 %



### 5.2.2.3. Přesnost

Směsné sérum bylo rozpipetováno do 10 zábrusových zkumavek po 0,5 ml. Každý vzorek byl zpracován samostatně dle uvedeného postupu. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab.16.

Tab.16: Přesnost

Látka	Plocha píku (průměr)	Směrodatná odchylka	RSD (%)	Retenční čas (průměr)	Směrodatná odchylka	RSD (%)
retinol	15821,25	836,70	5,3	0,68	0,01	0,7
$\alpha$ -tokoferol	13899,25	929,10	6,7	2,18	0,04	1,9
retinyl-palmitát	56057,99	4539,40	8,1	4,48	0,01	0,3
retinyl-stearát	19783,51	1117,60	5,7	4,76	0,01	0,3

n = 10

Požadavek RSD < 10 %

Relativní směrodatná odchylka je u jednotlivých látek do 10 %. Požadavek je splněn.

### 5.2.2.4. Detekční a kvantifikační limit

LOD (Limit of Detection) – detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky za definovaných experimentálních podmínek nestanovovaná kvantitativně. Definiuje se jako pětinašobek odezvy slepého pokusu – šumu.

LOQ (Limit of Quantification) – kvantifikační limit je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Definiuje se jako desetinásobek šumu.

Tab.17: Detekční a kvantitativní limit

Látka	Šum ( $\mu\text{mol/l}$ )	LOD ( $\mu\text{mol/l}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol/l}$ )
retinol	$8,7 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-2}$	$8,0 \cdot 10^{-2}$
$\alpha$ -tokoferol	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$5,0 \cdot 10^{-1}$	1,1
retinyl-palmitát	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$9,4 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$
retinyl-stearát	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$

Detekční a kvantitativní limit jednotlivých analytů vyhovuje jejich reálné koncentraci v lidském séru.

### 5.2.2.5. Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů

Tab.18: Robustnost – standardní parametry

Látka	Retenční čas (min)	Plocha píků	Koncentrace ( $\mu\text{mol/l}$ )
retinol	0,791	38201,91	2,04
$\alpha$ -tokoferol	2,175	17263,00	13,08
retinyl-palmitát	4,421	73593,00	11,52
retinyl-stearát	4,801	63441,06	4,80

**Testované parametry:**

1. Vliv složení mobilní fáze na retenční čas a plochu píku analyzované látky
2. Vliv změny průtoku mobilní fáze na retenční čas látek
3. Vliv teploty na retenční čas analyzované látky

**❖ Vliv složení mobilní fáze na retenční čas a plochu píku analyzované látky**

Optimální složení mobilní fáze: 1. methanol : voda 95 : 5

2. methanol : 2-propanol 60 : 40

Vliv složení mobilní fáze byl testován při změně obou mobilních fází  $\pm 3\%$ .

methanol: voda (97 : 3, 96 : 4, 93 : 7, 94 : 6)

methanol: 2-propanol (62 : 38, 61 : 39, 58 : 42, 9 : 41)

Zkratky použité v Tab. 19 – 24:

$A_i$  = plocha píku

$A_R$  = relativní plocha píku (%) vztažená na plochu píku (100 %) při optimálním složení mobilní fáze, průtoku a teplotě

$t_i$  = retenční čas látky, (min)

$t_R$  = relativní retenční čas látky (%) vztažený na retenční čas (100 %) při optimálním složení mobilní fáze, průtoku a teplotě

Tab.19: Vliv změny složení mobilní fáze pro retinol

Poměr MF MeOH:voda, MeOH:propanol	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$A_i$	$A_R$ (%)
97:3, 62:38	0,720	91,0	20770,80	103,7
96:4, 61:39	0,743	93,9	20757,50	103,6
93:7, 58:42	0,909	114,9	19863,73	99,2
94:6, 59:41	0,859	108,6	19891,69	99,3

Tab.20: Vliv změny složení mobilní fáze pro  $\alpha$ -tokoferol

Poměr MF MeOH:voda, MeOH:propanol	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$A_i$	$A_R(\%)$
97:3, 62:38	1,589	73,0	2266,19	39,2
96:4, 61:39	1,736	79,8	5662,53	98,1
93:7, 58:42	Nelze detekovat	Nelze detekovat	Nelze detekovat	Nelze detekovat
94:6, 59:41	2,763	127,0	4834,36	83,7

Tab.21: Vliv změny složení mobilní fáze pro retinyl-palmitát

Poměr MF MeOH:voda, MeOH:propanol	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$A_i$	$A_R(\%)$
97:3, 62:38	4,088	90,4	78398,88	99,8
96:4, 61:39	4,300	95,1	78541,28	100,0
93:7, 58:42	4,678	103,5	78311,82	99,7
94:6, 59:41	4,588	101,5	78818,77	100,4

Tab.22: Vliv změny složení mobilní fáze pro retinyl-stearát

Poměr MF MeOH:voda, MeOH:propanol	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$A_i$	$A_R(\%)$
97:3, 62:38	4,426	92,0	30280,39	99,3
96:4, 61:39	4,604	95,0	30847,95	101,2
93:7, 58:42	4,921	102,5	30646,43	100,5
94:6, 59:41	4,843	100,8	30332,31	99,5

n = 3

❖ **Vliv změny průtoku mobilní fáze na retenční čas látek**

Standardní průtok používaný pro tuto metodu je 3 ml/min. Hodnoty retenčních časů (min) látek jsou:

retinol	0,791
$\alpha$ -tokoferol	2,175
retinyl-palmitát	4,421
retinyl-stearát	4,801

Průtok byl měněn o  $\pm 7\%$ .

Hodnoty  $t_i$  (min) a  $t_R$  (%) byly vypočítány obdobně jako při testování vlivu složení mobilní fáze na retenční čas a plochu píku analyzované látky.

Tab.23: Vliv změny průtoku mobilní fáze

Průtok (ml/min)	Retinol		$\alpha$ -tokoferol		Retinyl-palmitát		Retinyl-stearát	
	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)
2,95	0,814	102,9	2,266	104,2	4,525	100,8	4,813	100,3
2,90	0,824	104,1	2,255	103,6	4,547	100,8	4,849	101,0
2,80	0,854	108,0	2,403	110,5	4,666	103,2	4,965	103,4
3,05	0,783	99,9	2,123	97,6	4,441	98,2	4,717	98,3
3,10	0,764	96,5	2,047	94,1	4,384	97,0	4,658	97,0
3,15	0,758	95,8	2,115	97,2	4,359	96,4	4,626	96,4
3,20	0,741	93,7	2,003	92,1	4,302	95,2	4,568	95,1

n = 3

❖ **Vliv teploty na retenční čas analyzované látky**

Retenční čas analytů (min.) při teplotě 25 °C:

retinol	0,795
$\alpha$ -tokoferol	2,201
retinyl-palmitát	4,504
retinyl-stearát	4,785

Hodnoty  $t_R$  (%) byly vypočítány jako v předchozích popsanych testovaných parametrech.

Tab 24: Vliv teploty na retenční čas analyzované látky

Teplota (°C)	Retinol		$\alpha$ -tokoferol		Retinyl-palmitát		Retinyl-stearát	
	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)	$t_i$ (min)	$t_R$ (%)
30	0,792	99,6	2,178	98,9	4,477	99,4	4,745	99,2
35	0,766	96,3	1,967	89,4	4,344	96,4	4,593	102,0
40	0,744	93,6	1,791	81,4	4,214	93,6	4,450	93,0
45	0,724	91,0	1,644	74,7	4,088	90,8	4,324	90,4
50	0,702	88,4	1,561	68,2	3,967	88,1	4,214	88,0

n = 2

Metoda je ve zvolených parametrech robustní.

### 5.2.2.6. Stabilita

Stabilita byla testována na směsi standardních roztoků látek v methanolu při uchovávání za daných podmínek.

1. při laboratorní teplotě 22 °C
2. v lednici při 4 °C
3. v mrazničce při -25 °C

Koncentrace látek byla vyjádřena plochou píku.

Směrodatná odchylka plochy píku  $S_R$  (%) byla vypočtena dle vzorce:

$$S_R = 100 \cdot (A_i - A_0) / A_0$$

Tab.25: Plocha píků v čase t = 0

Látka	Plocha píku -25 °C	Plocha píku 4 °C	Plocha píku 22 °C
retinol	20454,05	22344,22	21620,25
$\alpha$ -tokoferol	5296,38	5576,71	5411,59
retinyl-palmitát	76407,68	80106,28	80201,07
retinyl-stearát	28276,80	31006,12	30428,34

Tab.26: Stabilita - retinol

t (hod)	- 25 °C	$S_R$ (%)	4 °C	$S_R$ (%)	22 °C	$S_R$ (%)
0	20454,05	0,00	22344,22	0,00	21620,25	0,00
24	20495,00	0,20	22377,74	0,15	22917,47	6,00
48	20486,78	0,16	22455,90	0,50	22701,26	5,00
72	20507,20	0,26	22525,21	0,81	25511,89	18,00
týden	20525,60	0,35	22657,04	1,40	27980,93	29,42



Tab.27: Stabilita -  $\alpha$ -tokoferol

t (hod)	- 25 °C	S <sub>R</sub> (%)	4 °C	S <sub>R</sub> (%)	22 °C	S <sub>R</sub> (%)
0	5296,38	0,00	5576,71	0,00	5411,59	0,00
24	5301,67	0,10	5582,23	0,10	5536,06	2,30
48	5308,56	0,23	5585,08	0,15	5687,58	5,10
72	5314,92	0,35	5594,56	0,32	5866,12	8,40
týden	5329,22	0,62	5581,73	0,90	6499,31	20,10

Tab.28: Stabilita - retinyl-palmitát

t (hod)	- 25 °C	S <sub>R</sub> (%)	4 °C	S <sub>R</sub> (%)	22 °C	S <sub>R</sub> (%)
0	76407,68	0,00	80106,28	0,00	80201,07	0,00
24	76507,00	0,13	80659,01	0,69	81748,95	1,93
48	76560,49	0,20	81067,56	1,2	96642,29	20,50
72	76576,51	0,23	82108,94	2,5	100291,44	25,05
týden	76797,36	0,51	92122,22	15	149542,92	86,46

Tab.29: Stabilita - retinyl-stearát

t (hod)	- 25 °C	S <sub>R</sub> (%)	4 °C	S <sub>R</sub> (%)	22 °C	S <sub>R</sub> (%)
0	28276,80	0,00	31006,12	0,00	30428,34	0,00
24	28148,18	0,05	31068,13	0,20	30997,35	1,87
48	28305,08	0,10	31089,84	0,27	32938,68	8,25
72	28324,87	0,17	31099,14	0,30	36331,44	19,40
týden	28333,35	0,20	31533,22	1,70	39642,04	30,00

Roztok retinolu je stabilní minimálně jeden týden při teplotě - 25 °C, roztok  $\alpha$ -tokoferolu si zachová stabilitu minimálně jeden týden při teplotě 4 °C. Roztoky retinyl-palmitátu a retinyl-stearátu zůstanou stabilní minimálně jeden týden při teplotě - 25 °C. Směrodatná odchylka je v těchto případech menší než 1 %.

## **6.ZÁVĚR**

## 6.1. Vývoj a optimalizace metody

- Byly stanoveny optimální chromatografické podmínky pro současné stanovení retinolu,  $\alpha$ -tokoferolu, retinyl-palmitátu a retinyl-stearátu v lidském séru.
- Byly nalezeny optimální vlnové délky pro detekci jednotlivých látek:

Tab.30: absorpční vlnové délky

retinol	325 nm
$\alpha$ -tokoferol	295 nm
retinyl-palmitát	330 nm
retinyl-stearát	330 nm

- Byla zvolena gradientová eluce. Jako optimální se ukázaly mobilní fáze č.1: methanol : voda 95 : 5 a č.2: methanol : 2 – propanol 6 : 4.
- Jako vhodná rychlost průtoku byla vybrána rychlost 3,0 ml/min.
- Při testování způsobilosti systému byla zjištěna tato data:
  - Účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater  $N$  byla  $> 900$ .
  - Asymetrie píků byla  $T < 2,0$ .
  - Rozlišení chromatografických píků bylo  $R_{ij} > 1,5$ .
  - Opakovatelnost vyjádřená jako směrodatná odchylka byla  $RSD < 5,0 \%$ .
- Byly stanoveny další validační parametry:
  - Linearita. Linearita metody byla testována v rozsahu koncentrací  $c = 0,1 - 10 \mu\text{mol/l}$  pro retinol,  $0,5 - 50 \mu\text{mol/l}$  pro  $\alpha$ -tokoferol,  $0,5 - 40 \mu\text{mol/l}$  pro retinyl-palmitát a  $0,5 - 20 \mu\text{mol/l}$  pro retinyl-stearát. Korelační koeficienty byly ve všech případech  $R > 0,999$ .
  - Stabilita. Byla měřena stabilita směsi standardních roztoků v methanolu po dobu jednoho týdne. Roztok retinolu je stabilní při teplotě  $- 25 \text{ }^\circ\text{C}$

minimálně jeden týden, roztok  $\alpha$ -tokoferolu zůstane stabilní při teplotě 4 °C minimálně jeden týden, roztoky retinyl-palmitátu a retinyl-stearátu si zachovají stabilitu minimálně jeden týden při teplotě - 25 °C.

- LOD. Limit detekce byl určen jako pětinásobek šumu.

*Tab.31: Limit detekce*

Látka	LOD ( $\mu\text{mol/l}$ )
retinol	0,04
$\alpha$ -tokoferol	0,50
retinyl-palmitát	$9,40 \cdot 10^{-3}$
retinyl-stearát	0,05

- LOQ. Kvantifikační limit byl určen jako desetinásobek odezvy slepého pokusu šumu.

*Tab.32: Limit kvantifikace*

Látka	LOQ ( $\mu\text{mol/l}$ )
retinol	0,08
$\alpha$ -tokoferol	1,10
retinyl-palmitát	$1,88 \cdot 10^{-2}$
retinyl-stearát	0,10

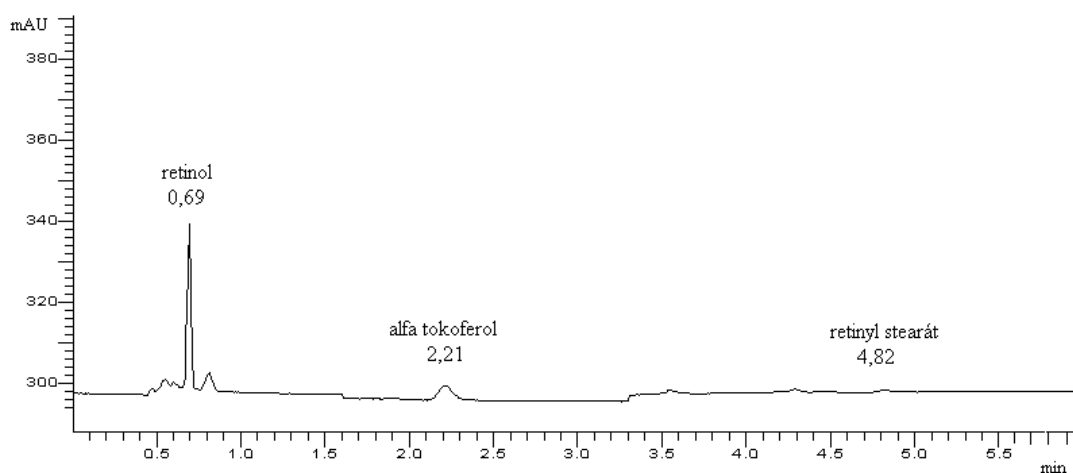
- Robustnost. Robustnost byla zjištěna pomocí třech parametrů: změny složení mobilní fáze, teploty a průtoku mobilní fáze.
- Byl nalezen extrakční postup zajišťující 98 % výtěžnost.

## 6.2. Klinické využití metody

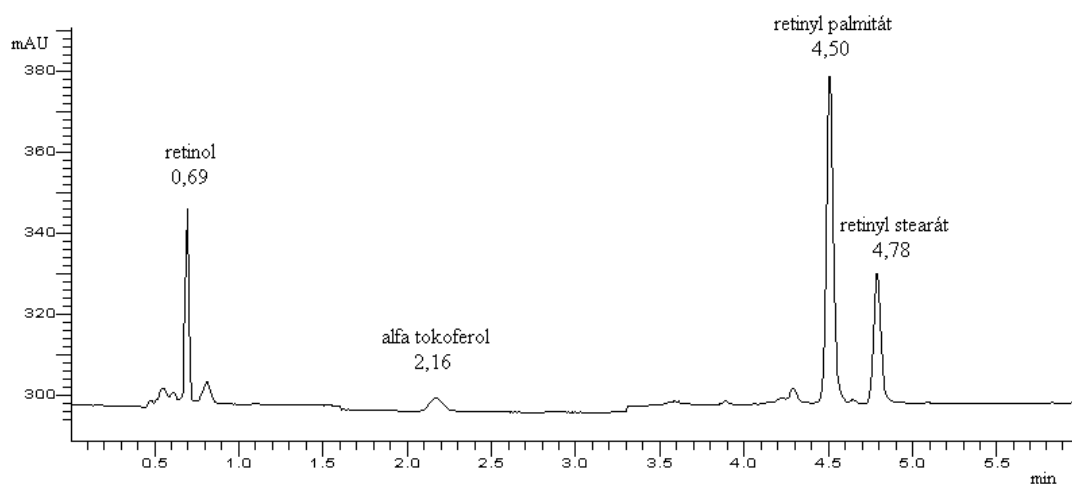
Tato metoda je využívána v klinické praxi pro stanovení esterů retinolu a jednotlivých vitaminů při vitamin A absorpčním testu u onkologických nemocných při testování poškození sliznice střeva během chemoterapeutické léčby. Pacienti jsou rozděleni do třech skupin podle způsobu léčby.

1. chemoterapie
2. radioterapie
3. kontrolní skupina – zdraví dobrovolníci

Příklady stanovení retinolu,  $\alpha$ -tokoferolu, retinyl-palmitátu a retinyl-stearátu v krevním séru zdravého dobrovolníka během vitamin A absorpčního testu dokumentují Obr. 23 a 24.



*Obr.23:* Chromatogram krevního séra před podáním vitaminu A. Koncentrace látek: retinol 3,06  $\mu\text{mol/l}$ ,  $\alpha$ -tokoferol 15,31  $\mu\text{mol/l}$ , retinyl-palmitát nebyl detekován, retinyl-stearát 0,50  $\mu\text{mol/l}$ .



*Obr.24:*. Chromatogram krevního séra 5 hodin po podání 360 000 IU vitaminu A. Koncentrace látek: retinol 3,62  $\mu\text{mol/l}$ ,  $\alpha$ -tokoferol 13,03  $\mu\text{mol/l}$ , retinyl-palmitát 37,88  $\mu\text{mol/l}$ , retinyl-stearát 18,04  $\mu\text{mol/l}$ .

Metoda významně přispěla k rozšíření spektra vyšetření používaných pro studium nových chemoterapeutik a pomohla získat nové poznatky, které odkrývají další možnosti výzkumu v oblasti léčby nádorových onemocnění.

Práce byla také prezentována na Soutěži mladých analytických chemiků o cenu firmy Merck v Olomouci 2006.

Práce byla představena formou posteru na konferenci SKVIMP 2006.

## **7.PŘÍLOHY**



Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty

Univerzity Palackého v Olomouci

Odborná skupina analytické chemie České společnosti chemické

## **ANALYTICKÁ CHEMIE – MERCK 2006**

**Sborník prací 9. ročníku soutěže**

**o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru**

**analytické chemie**

**o cenu firmy Merck**



Uspořádali : Jiří Barek, Jan Petr, Karel Ventura



Vydala Česká společnost chemická, Praha 2006

ISBN 80-86238-50-4

# VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ ESTERŮ RETINOLU V LIDSKÉM SÉRU S VYUŽITÍM MONOLITICKÉ KOLONY A DIODE-ARRAY DETEKCE

Lenka Krčmová<sup>1</sup>, Lubor Urbánek<sup>1,3</sup>, Dagmar Solichová<sup>3</sup>, Bohuslav Melichar<sup>4</sup>, Josef Dvořák<sup>4</sup>, Veronika Opletalová<sup>2</sup>, Petr Solich<sup>1</sup>

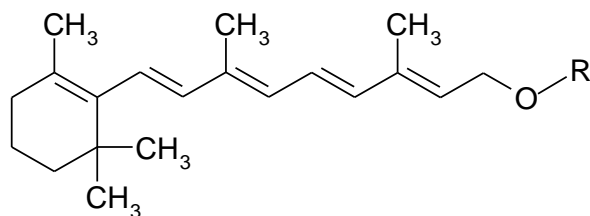
<sup>1</sup>Katedra analytické chemie a <sup>2</sup>Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv,  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského  
1203, 500 05 Hradec Králové

<sup>3</sup>Klinika gerontologická a metabolická a <sup>4</sup>Klinika onkologie a radioterapie, Fakultní  
nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Vitamin A, původně nazývaný jako axeroftol, je podle svého účinku nejdéle známým vitaminem. Jeho izolaci v čisté formě a stanovení struktury molekuly umožnily až na počátku 20. století moderní analytické metody. V 50. letech doporučila IUPAC pro tento vitamin název retinol<sup>1</sup>.

Vitamin A patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Po chemické stránce je to alkohol obsahující ve své molekule šestičlenný  $\beta$ -jononový kruh s bočním řetězcem složeným ze dvou izoprenoidních jednotek.(obr. 1)

Konjugace *all-trans* retinoidů s mastnými kyselinami poskytuje retinyl-estery (obr.1), které představují zásobu vitamínu A hlavně v játrech. Zde jsou nejvíce zastoupeny estery kyseliny palmitové a stearové.



Obr.č. 1

retinol                    R = H  
retinyl-palmitát        R = C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O  
retinyl-stearát        R = C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O

Absorpce vitamínu A na kartáčovém lemu tenkého střeva je úzce spojena s metabolismem lipidů. Po průchodu střevní stěnou je retinol navázán na CRBP (cell-retinol-binding-protein) typu II. Dále dochází k esterifikaci retinolu s mastnými

kyselinami s dlouhými řetězci katalyzované lecitin-retinol-acyltransferasou. Vzniklé estery jsou pomocí chylomikronů dopraveny přes lymfatický a krevní systém do jater<sup>2</sup>.

Estery retinolu jsou převážně užívány ke studiu metabolismu lipidů např. chylomikronů, chylomikronremnantů a lipoproteinů, ale i pro sledování změn při poškození sliznice střeva, které patří mezi nejčastější toxické projevy protinádorové chemoterapie a radioterapie. Změny permeability sliznice tenkého střeva lze monitorovat retinol absorpčním testem, kdy je pacientovi nalačno odebrán vzorek srážlivé krve (2ml), a poté je mu podána zatěžovací dávka vitamínu A o síle 360 000 IU. Za pět hodin po podání je odebrán druhý vzorek srážlivé krve a následně je provedena analýza retinolu a jeho esterů<sup>3</sup>.

Pro stanovení vitamínu A a jeho esterů se v současnosti užívá především různých modifikací separačních postupů s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po předchozí extrakci ze vzorku. Pro detekci často slouží fluorescenční detektory, či univerzální UV detektory, ale uplatňují se také postupy s elektrochemickou detekcí<sup>4</sup>.

Nově vyvinutá HPLC metoda pro stanovení esterů retinolu využívá přednosti monolitních stacionárních fází. Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi silikagelu, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze protékat póry monolitu<sup>5</sup>. Monolitní kolona obsahuje dvojitou strukturu pórů, makropóry (2  $\mu\text{m}$ ) a mezopóry (13 nm). Tato dvojitá struktura pórů způsobuje, že stacionární fáze má porozitu větší než 80 % což umožňuje provádět analýzu s mnohem menším zpětným tlakem než u konvenční částicové kolony, které mají porozitu jen okolo 65 %. Průtok mobilní fáze až do 9 ml/min potom umožňuje dosažení mnohem rychlejší separace. Díky nízkým tlakovým nárokům lze několik monolitních kolon zapojit do série a zvýšit tím počet teoretických pater. Průtokový gradient umožňuje redukci reekvilibračního času kolony. Vnitřní povrch sorbentu může být chemicky modifikován stejně jako konvenční materiály<sup>6,7</sup>.

Některé práce zabývající se stanovením esterů retinolu uvádí dobu analýzy při použití částicových stacionárních fází 12-20 minut.<sup>8,9,10</sup> Použití monolitní kolony značně zkrátí celkový čas analýzy, což významně přispívá i ke snížení celkové spotřeby rozpouštědel.

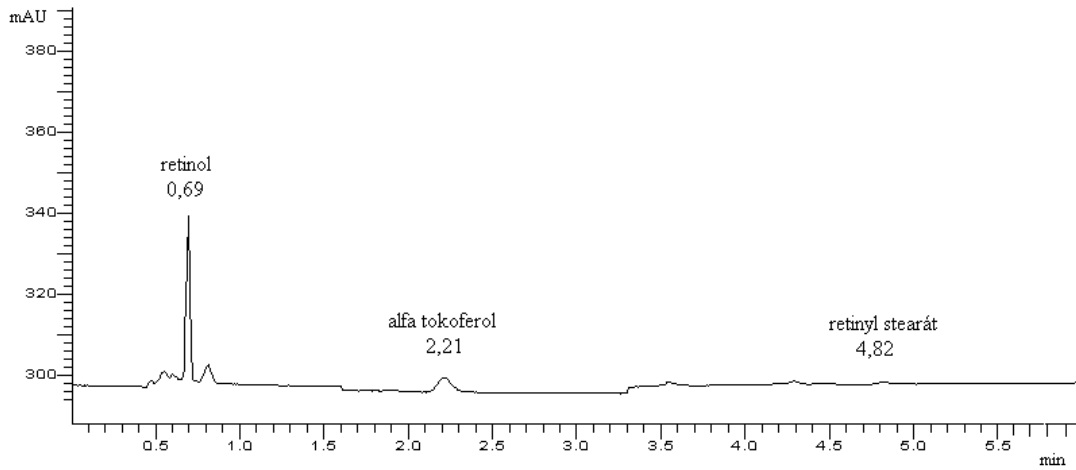
V naší práci jsme vyvinuli, validovali a optimalizovali HPLC metodu, která umožňuje detekci a kvantifikaci retinolu,  $\alpha$ -tokoferolu, retinyl-palmitátu a -stearátu, a tím i sledování změn poškození sliznice střeva v rámci absorpčního testu. Metodou lze stanovit také kyselinu retinovou, retinyl-acetát a -propionát. Tyto látky však nebyly pro další výzkum důležité, a proto nebyla provedena jejich validace.

Nová metoda byla vypracována na kapalinovém chromatografu LC 200 vybaveném autosamplerem, kolonovým termostatem, diode-array detektorem a řízeném softwarem Turbochrom PE verze 4.1 (Perkin Elmer, USA). Pro vlastní separaci byla použita monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm (Merck, Německo) s gradientovou elucí. V čase 0-2,1 min. byla mobilní fáze tvořena směsí metanol:voda (95:5). Při této mobilní fázi byl eluován retinol a  $\alpha$ -tokoferol. Estery retinolu (palmitát a stearát) byly eluovány směsnou mobilní fází methanol:2-propanol (60:40) v rozmezí 2,1-4,9 min. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 3 ml/min, teplota 25°C a nastříkované množství vzorku bylo 20  $\mu$ l. Retinol byl detekován při vlnové délce 325 nm,  $\alpha$ -tokoferol při 295 nm a retinyl-palmitát a -stearát při 330 nm. Celková doba analýzy byla 6 min.

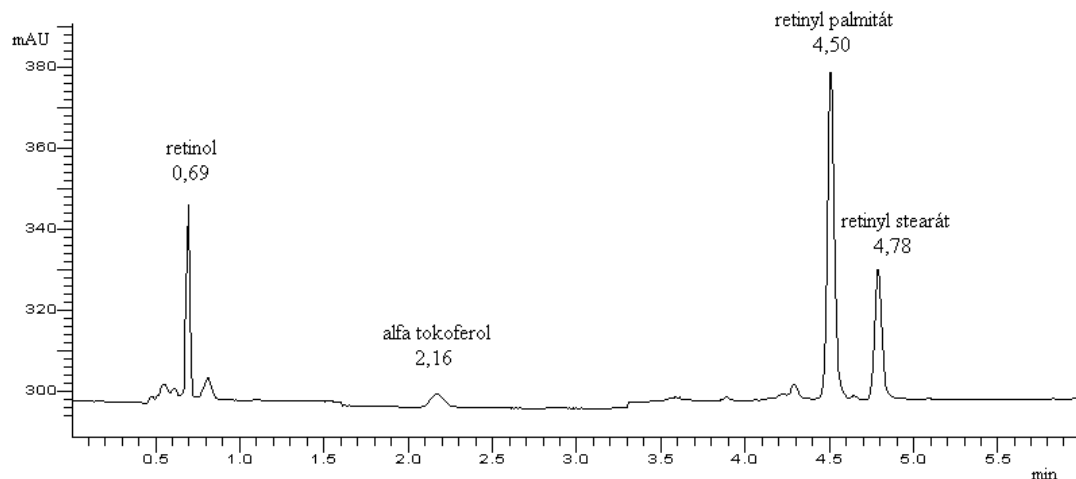
Vzorek krevního séra byl připraven metodou liquid-liquid extrakce (LLE). K 0,5 ml séra bylo přidáno 2,5 ml extrakční směsi hexan:toluen (8:2). Po protřepání (5 min. na třepačce) bylo sérum deproteinováno přidávkem 0,5 ml lihu denaturovaného methanolem. Po deproteinaci séra byl vzorek opět protřepán (5 min.) a dále centrifugován 10 min. při 1 600 x g a 0°C. Z horní organické fáze bylo následně odebráno 2,0 ml supernatantu, který byl odpařen pomocí koncentrátoru (Eppendorf, Německo). Pro zvýšení výtěžnosti byla provedena dvojitá extrakce, jejíž oba podíly byly spojeny a společně odpařeny.

Tato metoda byla prakticky použita pro stanovení esterů retinolu a jednotlivých vitaminů při absorpčním testu u onkologických nemocných při testování poškození sliznice střeva během chemoterapeutické léčby. Významně přispěla k rozšíření spektra vyšetření pro studium nových chemoterapeutik a pomohla získat nové poznatky, které odкрývají další možnosti výzkumu v oblasti léčby nádorových onemocnění.

Příklady stanovení retinolu,  $\alpha$ -tokoferolu, retinyl-palmitátu a -stearátu v krevním séru zdravého dobrovolníka během retinol absorpčního testu:



Obr.č. 2 Chromatogram krevního séra před podáním vitaminu A. Koncentrace látek: retinol 3,06  $\mu$ mol/l,  $\alpha$ -tokoferol 15,31  $\mu$ mol/l, retinyl-palmitát nebyl detekován, retinyl-stearát 0,50  $\mu$ mol/l



Obr.č. 3 Chromatogram krevního séra 5 hodin po podání 360 000 IU vitaminu A. Koncentrace látek: retinol 3,62  $\mu$ mol/l,  $\alpha$ -tokoferol 13,03  $\mu$ mol/l, retinyl-palmitát 37,88  $\mu$ mol/l, retinyl-stearát 18,04  $\mu$ mol/l.

## Literatura

1. Hlúbik P., Opltová L.: Vitaminy, Grada Publishing, Praha 2004
2. Collins M. D., Eckhoff C., Slikker W., Bailey J. R., Nau H.: Fundam. Appl. Toxicol. 19(1),109 (1992)
3. Výzkumný záměr MZ 000179906
4. Sborník konference Vitaminy 2003, Univerzita Pardubice 2003
5. Švec F.: Chem. Listy 98, 232 (2004)
6. [www.chromolith.com](http://www.chromolith.com)
7. Miyabe K., Guichon G.: J. Sep. Sci. 27, 853 (2004)
8. Dzerk A.M., Carlson A., Loewen G. R., Shirley M.A., Lee J.W.:J. Pharmaceut. Biomed. 16, 1013 (1998)
9. Sakhi K., Gundersen T. E., Ulven S. M, Blomhoff R., Lundanes E.: J. Chromatogr. A 828, 451 (1998)
10. Ruhl R., Schweigert F. J.: J. Chromatogr. B 798, 309 (2003)

*Práce vznikla za podpory grantů IGA MZ ČR, projekt NR 8048-3 a FRVŠ č. 1629/2006.*

# **Klinická výživa a metabolická péče v gastroenterologii a gerontologii**

**Editoři:**

**Luboš Sobotka  
František Novák  
Dana Vaňková**

RNDr. František Skopec, CSc. – Nucleus HK®

## INTESTINAL MUCOSAL DAMAGE MONITORING IN CANCER PATIENTS TREATED WITH CYTOTOXIC DRUGS

*D. Solichová, L. Krčmová, L. Urbánek, B. Melichar, I. Svobodová,  
V. Opletalová, V. Bláha, P. Žďánský*

*Dept. of Metabolic Care and Gerontology, Dept. of Oncology and  
Radiotherapy, Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic  
Dept. of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of  
Pharmacy Charles University, Hradec Králové*

Absorption test of vitamin A is used for monitoring of intestinal permeability and may represent a sensitive indicator of intestinal damage. In human, dietary retinyl esters, the major sources of vitamin A are completely hydrolyzed after ingestion in the intestine by the pancreatic enzyme, pancreatic triglyceride lipase (PTL), and intestinal brush border enzyme, phospholipase B. Unesterified retinol is taken up by the enterocytes, perhaps involving both diffusion and protein-mediated facilitated transport. Once in the cell, retinol is complexed with cellular retinol-binding protein type 2 (CRBP2) and the complex serves as a substrate for reesterification of the retinol by the enzyme lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). Retinol not bound to CRBP2 is esterified by acyl-CoA acyltransferase (ARAT). The retinyl esters are incorporated into chylomicrons, intestinal lipoproteins that transport other dietary lipids. Chylomicrons containing newly absorbed retinyl esters are then secreted into the lymph.

In this present study, a simple and rapid reversed-phase HPLC procedure for selective and sensitive determination of retinyl esters in blood serum has been developed and used for monitoring intestinal mucosal damage in cancer patients treated with cytotoxic drugs after absorption test of vitamin A.

The monolithic column Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm), Merck (Darmstadt, Germany) and HPLC instrumentation Series LC 200 from Perkin Elmer (Norwalk, USA) attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Work-Station version 4.1. was used for monitoring of retinyl-palmitate and retinyl-stearate in patients treated with different cytotoxic drugs. The gradient elution was used for analysis of retinyl esters, mobile phase methanol:water (95:5) in 0–2.1 min and methanol: 2-propanol (60:40) in 2.1–4.9 min, flow rate 3 ml/min. The injection volume of sample was 20 µl and analysis was done in ambient



temperature. The retinyl esters were monitored at 330 nm and analysis was achieved in 6 minutes. The method was used for analysis of samples of oncology patients for monitoring changes of intestinal permeability after treatment by chemotherapy.

*Literature:*

Harrison E.H., Hussain M.M. Mechanisms Involved in the Intestinal Digestion and Absorption of Dietary Vitamin A. *J. Nutr.* 2001;131: 1405–1408.

*This project was supported by IGA Ministry of Health Czech Republic No. NR/8048-3 and Research Project MZO 00179906.*

# Intestinal Mucosal Damage Monitoring in Cancer Patients Treated with Cytotoxic Drugs

D. Solichová<sup>1</sup>, L. Krcmová<sup>2</sup>, L. Urbánek<sup>2,1</sup>, B. Melichar<sup>3</sup>, I. Svobodová<sup>1</sup>,  
V. Opletalová<sup>4</sup>, V. Bláha<sup>1</sup>, J. Bastos<sup>5</sup>, P. Ždánský<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>3</sup>Dept. of Radiology and Oncology, Teaching Hospital Hradec Králové, Czech Republic

<sup>4</sup>Dept. of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>5</sup>Faculty of Pharmacy, Coimbra University, Portugal

## Abstract

Absorption test of vitamin A is used for monitoring of intestinal permeability and may represent a sensitive indicator of intestinal damage. In human, dietary retinyl esters, the major sources of vitamin A are completely hydrolyzed after ingestion in the intestine by the pancreatic enzyme, pancreatic triglyceride lipase (PTL), and intestinal brush border enzyme, phospholipase B. Unesterified retinol is taken up by the enterocytes, perhaps involving both diffusion and protein-mediated facilitated transport. Once in the cell, retinol is complexed with cellular retinol-binding protein type 2 (CRBP2) and the complex serves as a substrate for reesterification of the retinol by the enzyme lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). Retinol not bound to CRBP2 is esterified by acyl-CoA acyltransferase (ARAT). The retinyl esters are incorporated into chylomicrons, intestinal lipoproteins that transport other dietary lipids. Chylomicrons containing newly absorbed retinyl esters are then secreted into the lymph.

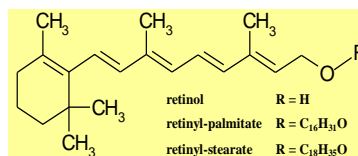
In this present study, a simple and rapid reversed-phase HPLC procedure for selective and sensitive determination of retinyl esters in blood serum has been developed and used for monitoring intestinal mucosal damage in cancer patients treated with cytotoxic drugs after absorption test of vitamin A.

The monolithic column Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm), Merck (Darmstadt, Germany) and HPLC instrumentation Series LC 200 from Perkin Elmer (Norwalk, USA) attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Work-Station version 4.1. was used for monitoring of retinyl-palmitate and retinyl-stearate in patients treated with different cytotoxic drugs. The gradient elution was used for analysis of retinyl esters, mobile phase methanol:water (95:5) in 0-2.1 min and methanol:2-propanol (60:40) in 2.1-4.9 min, flow rate 3 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume of sample was 20 µl and analysis was done at ambient temperature. The retinyl esters were monitored at 330 nm and analysis was achieved in 6 minutes. The method was used for analysis of samples of oncology patients for monitoring changes of intestinal permeability after treatment by chemotherapy.

## Aim

The aim of this study was a development of a novel, simple and rapid reversed-phase HPLC procedure for selective and sensitive determination of retinyl esters in blood serum. This method was used for monitoring intestinal mucosal damage in cancer patients treated with cytotoxic drugs after absorption test of vitamin A.

## Methods



The new type of monolithic column Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm), Merck (Darmstadt, Germany) and HPLC instrumentation Series LC 200 from Perkin Elmer (Norwalk, USA) attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Work-Station version 4.1. was used for monitoring of retinyl-palmitate and retinyl-stearate in patients treated with different cytotoxic drugs. The gradient elution was used for analysis of retinyl esters, mobile phase methanol:water (95:5) in 0-2.1 min and methanol:2-propanol (60:40) in 2.1-4.9 min, flow rate 3 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume of sample was 20 µl and analysis was done at ambient temperature. The DAD detection of α-tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and 325 nm respectively, retinyl esters were monitored at 330 nm wavelength. Analysis was achieved in 6 minutes.

## Results

Figure 1:

Patient serum before absorption test

retinol 3.06 µmol l<sup>-1</sup>, α-tocopherol 15.31 µmol l<sup>-1</sup>, retinyl-palmitate under limit of detection, retinyl-stearate 0.50 µmol l<sup>-1</sup>

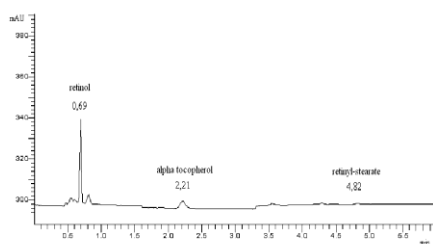


Figure 2:

Patient serum after absorption test (360 000 IU of vitamin A, after 5 hours)

retinol 3.62 µmol l<sup>-1</sup>, α-tocopherol 13.03 µmol l<sup>-1</sup>, retinyl-palmitate 37.88 µmol l<sup>-1</sup>, retinyl-stearate 18.04 µmol l<sup>-1</sup>.

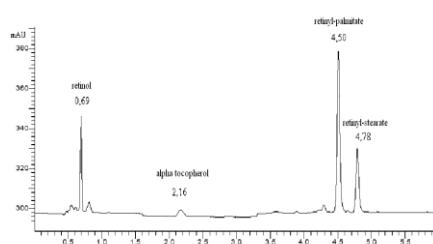


Table 1:

Validation characteristics of HPLC method for analysis of retinol, α-tocopherol and retinyl esters

Parameter	Retinol	Alpha tocopherol	Retinyl -palmitate	Retinyl -stearate
Linearity (R <sup>2</sup> )	0.9997	0.9998	0.9995	0.9998
Accuracy RSD (%)	5.29	6.68	8.10	5.65
Repeatability RSD (%)	1.92	3.97	4.26	3.19
LOD (µmol l <sup>-1</sup> )	4.0 · 10 <sup>-2</sup>	5.0 · 10 <sup>-1</sup>	9.4 · 10 <sup>-3</sup>	5.0 · 10 <sup>-2</sup>
LOQ (µmol l <sup>-1</sup> )	8.0 · 10 <sup>-2</sup>	1.1	1.88 · 10 <sup>-2</sup>	1.0 · 10 <sup>-1</sup>

## Conclusions

The novel and rapid HPLC method for analysis of retinyl esters in human serum after absorption vitamin A test was developed and used for monitoring of intestinal permeability changes after treatment by chemotherapy.

## Acknowledgements

Supported by IGA Ministry of Health Czech Republic, No. NR/8048-3 and Research Project MZO 00179906.

## Literature

1. Harrison E.H., Hussain M.M.: Mechanisms Involved in the Intestinal Digestion and Absorption of Dietary Vitamin A. *J. Nutr.* 2001;131:1405-1408.

## **8.LITERATURA**

1. Hlúbik P., Opltová L., Vitaminy, Grada Publishing, Praha 7, (2004), 19-41.
2. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., Harperova biochemie, Nakladatelství H+H, Jinočany, (2002), 618-621.
3. [http://www.ronnie.cz/c-715-Vitamin-A-retinol-\(I\).html](http://www.ronnie.cz/c-715-Vitamin-A-retinol-(I).html) (stránky navštíveny dne 18.9.2005).
4. Český lékopis 2002, Grada Publishing, Praha, (2002), 4569-4572.
5. Song W. O., Beecher G. R., Eitenmiller R., Modern analytical methodologies in fat- and water-soluble vitamins, John Wiley and sons, inc. (2000) 34-51.
6. Arnhold T., Nau H., Vitamin A modern analytical methodologies in fat-soluble vitamins, Chemical analysis series 54, John Wiley + Sons Inc., (2000)
7. <http://www.faculty.virginia.edu/rastinejad/ret.pdf> (stránky navštíveny 10.7.2005).
8. Schmidt C. K., Brouwer A., Nau H., Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum, Analytical Biochemistry 315 (1), (2003), 36 – 48.
9. Hagen E., Myhre A. M., Tjelle T. E., Berg T., Norum K. R., Retinyl esters are hydrolyzed in early endosomes of J774 macrophages, Journal of lipid research 40, (1999), 309-317.
10. Racek J. et. al., Klinická biochemie, Galén, Praha, (1999), 23-31.
11. Collins M. D., Eckhoff Ch., Slikker W., Bailey J. R., Nau H., Quantitative plasma disposition of retinol and retinyl esters after high-dose oral vitamin A administration in the cynomolgus monkey, Fundamentals and applied toxicology 19, (1992), 109-116.
12. Harrison E. H., Hussian M. M., Mechanism involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A, The Journal of nutrition 131 (5), (2001), 1405-8.
13. Ruotolo G., Zhang H., Bentsianov V., Le N., Protocol for the study of the metabolism of retinyl esters in plasma lipoproteins during postprandial lipemia, Journal of lipid research 33, (1992), 1541-1549.
14. Quadro L., Hamberger L., Gottesman M. E., Colantuoni V., Ramakrishnan R., Blaner W.S., Transplacental delivery of retinoid: the role of retinol-binding protein and lipoprotein retinyl ester, American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism 286(5), (2004), 844-51.

15. Le N., Coates P. M., Gallagher P. R., Jean A., Kinetics of retinyl esters during postprandial lipemia in man: A compartmental model, *Metabolism* 46, (1997), 584-594.
16. Krasinski S. D., John J. S., Reusell R. M., Schaefer E. J., Postprandial plasma vitamin A metabolism in humans: a reassessment of the use of plasma retinyl esters as markers for intestinally derived chylomicrons and their remnants, *Metabolism* 39, (1990), 357-356.
17. Vitaminy 2001 sborník konference. (2001) 39-40.
18. Wang L., Wang J., Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl-acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25, (2001), 785-793.
19. De Ruyter M. G. M., De Leenheer A. P., Simultaneous determination of retinol and retinyl esters in serum or plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography, *Clinical chemistry* 24, (1978), 1920-1923.
20. Hartmann S., Fraescheis O., Ringenbach F., Wyse R., Determination of retinol and retinyl esters in human plasma by HPLC with automated column switching and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography Biomedical Science Applied* 751, (2001), 265-275.
21. Bankson D., Russell R. M., Sadovski J. A., Determination of retinyl esters and retinol in serum or plasma by normal-phase liquid chromatography: method and applications, *Clinical Chemistry* 32, (1986), 35-40.
22. Van Breemen R. B., Nikolic D., Xu X., Xiong Y., Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using HPLC-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 794, (1998), 245-251.
23. Orth M., Hanush M., Kroning G., Fluorometric determination of total retinyl esters in triglyceride-rich lipoproteins, *Clinical Chemistry* 44, (1998), 1459-65.
24. Senoo H., Stang E., Nilsson A., Kindberg G.M., Berg T., Roos N., Norum K. R., Blomhoff R., Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of rat liver, *Journal of Lipid Research* 31, (1990), 1229-39.
25. Larsson B., Nilsson A., Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake in the cholestatic, *Scandinavian Journal Gastroenterology* 15(8), (1980); 959-67.
26. Kelley S.K., Nilsson C.B., Green M.H., Green J.B., Hakansson H., Use of model-based compartmental analysis to study effects of 2,3,7,8-tetrachloro-

- dibenzo-p-dioxin on vitamin A kinetics in rats, *Toxicological Science* 44, (1998), 1-13.
27. Tso P., Nilsson A., Metabolism in vivo of [ $^{14}\text{C}$ ] oleic acid and [ $^3\text{H}$ ] retinol of lipid-poor and lipid-rich chyle, *Biochemica and Biophysica acta* 1126, (1992), 215-220.
28. Výzkumný záměr MZ 000179906
29. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab/glts.htm> (stránky navštíveny dne 10.8.2005).
30. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text6.htm> (stránky navštíveny dne 10.8.2005).
31. Reinersdarff K., Bush E., Liberto J. D., Plasma kinetics of vitamin A in humans after a single oral dose of [8,9,19- $^{13}\text{C}$ ] retinyl palmitate, *Journal of lipid research* 37, (1996), 1875-1884.
32. <http://www.uoc.muni.cz/do/cotreba/ustamuk.htm> (stránky navštíveny dne 7.6.2005).
33. <http://www.fnplzen.cz/kliniky/ukbh/zdroj/metody/funkcni.html> (stránky navštíveny 12.12.2005).
34. Nováková L., Využití nových trendů při vývoji a validaci HPLC metod pro analýzu biologicky aktivních látek, disertační práce, (2005).
35. Karlíček R. a kolektiv, Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha1, (2001).
36. <http://www.elsevier.com/vj/microTAS> (stánky navštíveny dne 24.11.2005).
37. Miyabe K., Guichon G., Characterization of monolithic columns for HPLC, *Journal of chromatography A* 27, (2004), 853-873.
38. Platonova G. A., Tennikova T. B., Affinity processes realized on high-flow-trought matacrylate-based macroporous monoliths, *Journal of chromatography A* 1065, (2005), 19–28.
39. [www.chromolith.com](http://www.chromolith.com) (stránky navštíveny dne 25.11.2005).
40. Švec F., Monolitické stacionární fáze pro HPLC, *Chemické listy* 98, (2004), 232-238.
41. <http://www.faf.cuni.cz/> (stránky Veřejných složek navštíveny dne 5.1.2006).
42. Věstník SÚKL 1994/1.

43. Nováková L., Validace metody pro stanovení obsahu kyseliny sorbové v přípravku Lipolotio HBF, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK v Praze, (2005)
44. Holík M., Příručka validace analytických metod, Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.
45. Solichová D., Klinické využití metody HPLC pro stanovení liposolubilních vitamínů a neopterinu, disertační práce, (2003).
46. Jabor A., Zámečník M., Preanalytická fáze 2005, Česká společnost klinické biochemie, (Praha 2005).
47. Huang H. S., Goodmanm D. W., Vitamin A and Carotenoids I. Intestinal Absorption and Metabolism of <sup>14</sup>C-Labeled Vitamin A Alcohol and β-Carotene in the Rat, Journal of Bioogical Chemistry 240, (1964), 2839–2844.
48. Dzerk M., Carlson A., Loewen G. R., Shirley M. A., Lee J. W., A HPLC method for the determination of 9-cis retinoic acid (ALRT1057) and its 4-Oxo metabolite in human plasma, Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis 16, (1998), 1013-1027.
49. Rodríguez-Delago M. A., Díaz-Flores Estévezb J.F., Díaz-Flores Estévezc F.,Calzadilac H.C., Romeora D., Fast determination of retinol – tocopherol in plasma by LC, Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis 28, (2002), 991-997.
50. Slowell A. L., Huff D. L., Yeager P. R., Caudill P. S., Gunter W. E., Retinol α-tocopherol, lutein/zeaxantin, β-cryptoxantin, lycopene, α-carotene, trans-β-carotene, and four retinyl-esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelenth detection, Clinical chemistry 40, (1994), 411-416.