

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**VYUŽITÍ MODERNÍCH SEPARAČNÍCH METOD PRO
KLINICKÉ ÚČELY**

Dizertační práce

2015

Mgr. Barbora Honegrová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.

Mgr. Barbora Honegrová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a školitelce specialistece doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D., za jejich odbornou pomoc a vedení, podnětné návrhy a připomínky, dále za všechny cenné rady, podporu a laskavý přístup, ale také za motivaci v průběhu studia.

Velice děkuji všem členům katedry a především kolegům z Tkáňové ústředny Fakultní nemocnice Hradec Králové za jejich vstřícnost, ochotu, pomoc a trpělivost, kterou se mnou měli v čase sepisování dizertační práce.

Velké poděkování patří rovněž prof. MUDr. Luboši Sobotkovi, CSc., prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, CSc. a celému kolektivu laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky za to, že jsem měla možnost spolupracovat na velmi zajímavých projektech a získala jsem tak neocenitelné zkušenosti.

Dále bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Milanovi Bláhovi, CSc. a prof. MUDr. Vladimírovi Bláhovi, CSc. za to, že mi umožnili podílet se na jejich klinických výzkumech.

Na závěr bych chtěla vyjádřit velké díky své mamince, která mě podporovala a povzbuzovala k dokončení postgraduálního studia.

Největší dík pak patří mému manželovi, který mi byl výborným rádčem, vzorem a oporou během celého postgraduálního studia.

Děkuji grantovým agenturám za finanční podporu a možnosti prezentace výsledků práce na mezinárodních konferencích. Práce byla podpořena grantem Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 267 002 a Ministerstvem školství České republiky (projekt MSM0021620822).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Studijní program: Bioanalytická chemie

Kandidát: Mgr. Barbora Honegrová (roz. Kučerová)

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Školitel specialista: doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph. D.

Název dizertační práce: Využití moderních separačních metod pro klinickou praxi

Předložená práce se zabývá vývojem metod pro stanovení vitamínů A a E v biologickém materiálu pomocí kapalinové chromatografie.

V teoretickém úvodu jsou popsány bioanalytické přístupy ke stanovení analytů ze vzorku v komplexních maticích – zejména problematika úpravy vzorku před analýzou, separační chromatografické přístupy využívané v analýze a dále jsou zevrubně diskutovány principy validace bioanalytických metod. Cílové analyty jsou charakterizovány jak z chemického, tak funkčního hlediska.

Experimentální část obsahuje tři oddíly. Dva se zabývají vývojem chromatografických metod s cílem zjistit nejvhodnější podmínky pro stanovení vitamínu A a E v různých biologických materiálech – sérum, lipoproteinové vrstvy a mateřské mléko v klinickém hodnocení v rámci Fakultní nemocnice Hradec Králové. Třetí část pak sleduje stabilitu vitamínů v mateřském mléce a vliv pasterizace (62,5 °C po dobu 20 minut) a skladování na jejich hladiny.

1. Byla provedena studie vhodnosti různých typů UHPLC kolon (monolitická kolona II. generace, kolony plněny celoporézními a povrchově porézními částicemi) pro analýzu retinolu a α -tokoferolu v séru a v mateřském mléce s důrazem na vhodnost pro rutinní stanovení velkého množství vzorků v rámci klinické laboratoře. Monolitická kolona druhé generace Chromolith HighResolution dosáhla nejlepší separační účinnosti ze všech porovnávaných kolon pro zamýšlený účel.

2. Byla provedena studie stability retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce. Byl hodnocen vliv pasterizace a dlouhodobého skladování mateřského mléka za snížené teploty (-27 °C) na obsah liposolubilních vitamínů. Podařilo se prokázat, že ani tepelná úprava ani skladování po celou dobu trvanlivosti (12 týdnů) neovlivňuje obsah těchto

esenciálních složek, což je důležité z důvodu zajištění správné výživy pro nedonošené a předčasně narozené novorozence.

3. Byla vyvinuta HPLC metoda pro simultánní stanovení retinolu, α - a γ -tokoferolu metodou vnitřního standardu s fluorescenční detekcí pro hodnocení účinnosti aferézy u pacientů léčených na separátorovém centru FN HK. Nová metoda je vhodná pro stanovení cílových analytů v séru a lipoproteinových vrstvách. Krátký čas analýzy, 3 minuty, je výhodný pro série velkého počtu vzorků v klinické laboratoři.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Field of study: Bioanalytical Chemistry

Candidate: Mgr. Barbora Honegrová (maiden name Kučerová)

Supervisor: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Co-supervisor: assoc. prof. RNDr. Dagmar Solichová, Ph. D.

Title of doctoral thesis: Using of modern separation methods for clinical practice

This work is focused on the development of methods for the determination of vitamin A and E in biological materials using liquid chromatography.

The theoretical background describes bioanalytical approaches to the determination of analytes from complex matrices. Sample preparation before analysis, chromatographic separation approaches and the validation of bioanalytical methods are discussed. The structure and biological function of target analytes are characterized.

The experimental part contains three sections, two of them focus on the development of new chromatographic methods for the determination of vitamin A and E in biological samples such as serum, lipoprotein layers and breast milk. The aim is to find the most suitable conditions for the chromatographic separation of target analytes that will be used for clinical trials in University Hospital in Hradec Králové. The third section is concerned with monitoring the stability of vitamins in breast milk as well as the influence of pasteurisation and storage on levels of the target vitamins.

1. A comparison was made of different types of UHPLC stationary phases (monolithic columns of 2nd generation, columns filled with porous particles and core-shell particles) for the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum and breast milk. The new method must be applicable to the routine determination of analytes in clinical laboratory. The second generation monolithic column Chromolith HighResolution had the best separation efficiency of all tested columns for the intended purpose.

2. The study of the stability of retinol and α -tocopherol in human breast milk was conducted. The influence of pasteurisation and storing (-27 °C) on levels of liposoluble vitamins was evaluated. It was proved that neither the pasteurisation procedure nor low temperature storing have an effect on these essential compounds during the shelf life (12 weeks). These findings are significant because of the importance of a sufficient supply of vitamins to premature babies for their proper growth and development.

3. A new method for the simultaneous determination of retinol, α - and γ -tocopherol using internal standard and fluorescence detection was developed. This method is suitable for the determination of target analytes in serum and lipoprotein fractions in patients treated by apheresis and for determination of the efficiency of the processes. A short analysis time is favorable for the method to be used in large batches in a clinical laboratory.

1. OBSAH

1. OBSAH	8
2. ÚVOD.....	13
3. CÍL PRÁCE.....	15
4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	18
5. TEORETICKÁ ČÁST	21
5.1. Chromatografie	22
5.1.1. Historie chromatografie.....	22
5.1.2. Principy a rozdělení chromatografických metod.....	22
5.1.2.1. Rozdělení metod podle uspořádání.....	23
5.1.2.2. Rozdělení metod podle povahy mobilní fáze	23
5.1.2.3. Rozdělení metod na základě povahy stacionární fáze a principu separace	24
5.1.3. Instrumentální sestava kapalinového chromatografu	25
5.1.4. Trendy v instrumentaci pro kapalinovou chromatografii	26
5.1.5. Stacionární fáze pro HPLC a UHPLC	27
5.1.5.1. Částicové kolony	28
5.1.5.2. Monolitické kolony	29
5.2. Validace analytických metod v klinických laboratořích.....	32
5.2.1. Rozsah validace metody.....	33
5.2.1.1. Plná validace	33
5.2.1.2. Částečná validace.....	33
5.2.1.3. Křížová validace metody	33
5.2.2. Test způsobilosti chromatografického systému	34
5.2.2.1. Zdánlivá účinnost chromatografického systému	34
5.2.2.2. Rozlišení	35
5.2.2.3. Faktor symetrie píku.....	35
5.2.2.4. Opakovatelnost nástřiku	35
5.2.2.5. Retenční faktor	36
5.2.2.6. Relativní retence	36
5.2.3. Validační parametry	36
5.2.3.1. Přesnost (Accuracy)	36
5.2.3.2. Preciznost (Precision)	37

5.2.3.3.	Selektivita (Selectivity) a specifita (Specificity)	37
5.2.3.4.	Limit detekce (Limit of detection – LOD).....	38
5.2.3.5.	Limit kvantifikace (Limit of quantification – LOQ).....	39
5.2.3.6.	Linearita a rozsah (Linearity and Range)	40
5.2.3.7.	Robustnost (Robustness) a ragidita (Ruggedness).....	40
5.2.3.8.	Přenos (Carry-over)	41
5.2.3.9.	Integrita zředování.....	41
5.2.3.10.	Matricové efekty (Matrix effect).....	41
5.2.3.11.	Stabilita.....	42
5.3.	Úprava vzorku před analýzou.....	44
5.3.1.	Mikroextrakce tuhou fází.....	44
5.3.1.1.	Mikroextrakce na tuhou fázi (Solid phase microextraction – SPME).....	45
5.3.1.2.	Sorpční extrakce na míchadle (Stir bar sorptive extraction – SBSE)	46
5.3.1.3.	Dynamická extrakce vzorků na tuhou fázi (Solid phase dynamic extraction – SPDE)	47
5.3.1.4.	Mikroextrakce tuhým sorbentem v mikrostrůžkačce (Microextraction by packed sorbents – MEPS).....	48
5.3.1.5.	Extrakce pomocí plněných špiček pipet (Disposable-pipette extraction – DPX).....	49
5.3.1.6.	Extrakce magnetickou tuhou fází (Magnetic solid phase extraction – MSPE)	50
5.3.1.7.	Rotační extrakce na kolonce (Spin column extraction).....	51
5.3.2.	Mikroextrakce kapalnou fází (Liquid phase microextraction – LPME)	52
5.3.2.1.	Mikroextrakce na kapce (Single-drop microextraction – SDME).....	52
5.3.2.2.	Mikroextrakce na dutém vlákně (Hollow-fibre liquid phase microextraction – HF- LPME)	55
5.3.2.3.	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (Dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME).....	56
5.3.2.4.	Elektromembránová extrakce (Electrokinetic membrane extraction – EME).....	57
5.4.	Stanovované vitamíny	58
5.4.1.	Vitamín A	58
5.4.2.	Vitamín E.....	61
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	65
6.1.	Porovnání kolon pro UHPLC stanovení retinolu a α-tokoferolu v biologickém materiálu	66
6.1.1.	Přístrojové vybavení a chemikálie	66
6.1.1.1.	Chromatografický systém	66
6.1.1.2.	Laboratorní vybavení	66

6.1.1.3. Použité chemikálie	67
6.1.2. Příprava zásobních roztoků	67
6.1.3. Chromatografické podmínky	67
6.1.4. Výsledky	68
6.1.5. Závěr	75
6.2. Stabilita retinolu a α-tokoferolu v mateřském mléce.....	76
6.2.1. Přístrojové vybavení a chemikálie	77
6.2.1.1. Chromatografický systém	77
6.2.1.2. Laboratorní vybavení	77
6.2.1.3. Použité chemikálie	77
6.2.2. Sběr vzorků	78
6.2.3. Analýza vzorků.....	78
6.2.3.1. Úprava vzorku před analýzou.....	78
6.2.3.2. Chromatografické stanovení	79
6.2.4. Výsledky analytické části.....	80
6.2.4.1. Vliv pasterizace na koncentraci retinolu a α -tokoferolu.....	80
6.2.5. Závěr	84
6.3. Vývoj HPLC metody pro simultánní stanovení retinolu, α- a γ-tokoferolu metodou vnitřního standardu s fluorescenční detekcí	85
6.3.1. Přístrojové vybavení a chemikálie	85
6.3.1.1. Chromatografický systém	85
6.3.1.2. Laboratorní vybavení	85
6.3.1.3. Použité chemikálie	85
6.3.2. Příprava zásobních a standardních roztoků	86
6.3.3. Vývoj metody	86
6.3.4. Chromatografická metoda	87
6.3.4.1. Vybrané validační parametry.....	88
6.3.5. Úprava vzorků před analýzou	89
6.3.5.1. Ultracentrifugace lipoproteinových vrstev	89
6.3.5.2. LLE extrakce vitamínů A a E ze séra a lipoproteinových vrstev	89
6.3.6. Závěr	91

7. ZÁVĚR.....	92
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	94
9. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ A PŘÍSPĚVKŮ	102
9.1. Práce publikované v časopisech	103
9.2. Přehled posterových sdělení.....	104
9.3. Přednášky prezentované na konferencích	107
9.4. Spoluúčast na řešených grantech	109
10. PŘÍLOHY	110
10.1. Příloha I. Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk.....	111
10.2. Příloha II. Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk	117
10.3. Příloha III. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography.....	125
10.4. Příloha IV. The effect of LDL-apheresis and rheohaemapheresis treatment on vitamin E	134
10.5. Příloha V. Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis.....	144

2. ÚVOD

Pro stanovení biologicky aktivních látek v klinických laboratořích se stále častěji využívají chromatografické metody umožňující v jednom kroku spojit jak separaci, tak identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek směsi. V rutinní laboratoři je důležitým faktorem nejen krátký čas analýzy pro velké série vzorků, ale především citlivost metod vůči cílovým analytům ve složité matici (sérum, plazma, moč, sliny, pot, atd.).

Velký důraz je kladen na snížení spotřeby organických rozpouštědel a menší zatížení okolního prostředí. To vede k vývoji nových přístupů v přípravě vzorku před analýzou, které minimalizují či úplně eliminují přítomnost organických rozpouštědel. Značný je také tlak na spotřebu co nejmenšího objemu vzorku použitého k analýze. Miniaturizované metody klasických extrakčních metod LLE a SPE jsou tak mnohem šetrnější k životnímu prostředí a navíc lze tyto nové metody plně automatizovat a on-line propojit s chromatografickým systémem. To vede ke značnému zkrácení doby analýzy a snížení nákladů. Výhodou je i omezení manipulace s biologickým materiálem zdravotnickým personálem.

Na účinnost separace a rychlost analýzy má největší vliv chromatografická kolona. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny nové stacionární fáze umožňující rychlý průtok mobilní fáze s vysokou rozdělovací schopností pro různé analyty. Další modifikace sorbentů pak zajišťují jejich vyšší odolnost oproti pH či vysoké teplotě. Rozvoj je jak v oblasti monolitických kolon, které se s výhodou používají na analýzu biologického materiálu pro specifický pórovitý charakter, tak u částicových kolon, které jsou plněny menšími částicemi s vyšší separační účinností. Technologie kolon s pevným jádrem a porézní vrstvou umožňuje krátkou analýzu, protože analyt neproniká hluboko do částice a může tak být rychle vymyt mobilní fází na detektor.

3. CÍL PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo vyvinout nové moderní separační metody pro stanovení analytů dle konkrétních požadavků klinik Fakultní nemocnice Hradec Králové. Výzkumná laboratoř III. interní gerontometabolické kliniky, ve které probíhalo mé postgraduální studium, je zapojena do grantů a výzkumných projektů, v rámci kterých jsou řešeny klinické studie vyžadující stanovení různých analytů obsažených v biologickém materiálu, jako např. sérum, moč či mateřské mléko. Jedním z úkolů je analýza liposolubilních vitamínů.

Vzhledem ke složitosti matrice biologického materiálu je nutné zohlednit tento aspekt během přípravy vzorku před analýzou, kde je trendem především zmenšování objemu spotřeby organických rozpouštědel i množství vzorku. Proto se klasické metody miniaturizují a je zřejmá snaha o automatizaci úpravy vzorku pro menší manipulaci zdravotnického personálu s biologickým materiálem a eliminaci případných chyb při ručním zpracování.

Prvním úkolem experimentální části dizertační práce bylo porovnání separační účinnosti chromatografických kolon různých typů pro stanovení retinolu a α -tokoferolu na UHPLC systému s využitím fluorescenční detekce. Do projektu byla zařazena monolitická kolona II. generace a kolony plněné celoporézními a povrchově porézními částicemi o různých velikostech. Klíčovým parametrem byla účinnost separace, rychlost analýzy a rozlišení mezi jednotlivými analyty.

Cílem druhého experimentu bylo zjistit stabilitu vitamínů A a E v mateřském mléce. Jelikož je mléko vystaveno během pasterizace teplotě 62,5 °C po dobu 20 minut a následně zchlazeno a skladováno při -27 °C po dobu až 12 týdnů, může být hladina vitamínů v něm značně ovlivněna. Proto měla být sledována hladina těchto vitamínů před pasterizací, následně po ní a pak v průběhu celé doby skladování s cílem zajistit správnou výživu, především nedonošeným a předčasně narozeným dětem, kterým je poté takto upravené mateřské mléko podáváno.

Dalším úkolem byl vývoj a validace HPLC metody pro stanovení retinolu, α - a γ -tokoferolu s využitím vnitřního standardu a fluorescenční detekcí. Nejdříve měly být testovány různé kolony s cílem najít ty, které jsou schopny rozdělit α - a γ -tokoferol. Poté optimalizovat chromatografické podmínky pro kolony s nejlepšími výsledky a metodu validovat. Výhodou využití vnitřního standardu je především zohlednění ztrát cílových analytů během úpravy vzorku před analýzou.

Nedílnou součástí mého postgraduálního studia ve Výzkumné laboratoři bylo podílet se na klinických výzkumech probíhajících na klinikách Fakultní nemocnice Hradec

Králové (FN HK). Mezi úkoly patřilo stanovení retinolu a α -tokoferolu v séru a lipoproteinových vrstvách u pacientů s familiární hypercholesterolémií, kteří jsou dlouhodobě léčeni LDL aferézou na Separátorovém centru IV. interní hematologické kliniky FN HK. U těchto pacientů jsou sledovány změny hladin cílových analytů před a po léčebné aferéze. Vitamíny A a E byly analyzovány i u dalších skupin pacientů s diagnózou věkem podmíněné makulární degenerace před a po léčebné rheoferéze. Cílem bylo zjistit vliv rheoferézy na hladinu antioxidantů v séru, lipoproteinových vrstvách a membráně erytrocytů.

4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
C18	řetězec obsahující 18 atomů uhlíku
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CFME	kontinuální průtoková mikroextrakce (continuous flow microextraction)
ČL	Český lékopis
DAD	detektor diodového pole (diode array detector)
DDME	drop to drop microextraction
DI	přímé ponoření (direct immersion)
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid-liquid microextraction)
DPX	extrakce pomocí plněných špiček pipet (disposable-pipette extraction)
DSDME	mikroextrakce na přímo suspendované kapce (directly-suspended droplet microextraction)
DVB	divinylbenzen
EMA	European Medical Agency
EME	elektromembránová extrakce (electrokinetic membrane extraction)
FDA	Food and Drugs Administration
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (high density lipoprotein)
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra (height equivalent to a theoretical plate)
HF	duté vlákno (hollow fibre)
HIC	hydrofobní interakční chromatografie (hydrophobic interaction chromatography)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HR	HighResolution
HS	umístění nad hladinou (head-space)
ICH	International Conference of Harmonization
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)

LLE	extrakce do kapaliny (liquid-liquid extraction)
LLLME	mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (liquid-liquid-liquid microextraction)
LLOQ	dolní limit kvantifikace (lower limit of quantification)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
LPME	mikroextrakce na kapalnou fázi (liquid phase microextraction)
MeOH	methanol
MEPS	mikroextrakce tuhým sorbentem v mikrostríkačce (microextraction by packed sorbents)
MF	mobilní fáze
MIP	molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymers)
MSPE	extrakce magnetickou tuhou fází (magnetic solid phase extraction)
NP	normální fáze (normal phase)
PDMS	polydimethylsiloxan
PP	srážení proteinů (protein precipitation)
RAM	materiál s omezeným přístupem (restricted access material)
RP	reverzní fáze (reverse phase)
SBSE	sorpční extrakce na míchací tyčince (stir bar sorptive extraction)
SDME	mikroextrakce na kapku (single-drop microextraction)
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SOP	standardní operační postup
SPDE	dynamická extrakce vzorků na tuhou fázi (dynamic solid phase extraction)
SPE	extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction)
SPME	mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction)
SST	test způsobilosti systému (system suitability test)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
ULOQ	horní limit kvantifikace (upper limit of quantification)
USP	Americký lékopis (United States Pharmacopeia)
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou (very low density lipoprotein)

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1. CHROMATOGRAFIE

5.1.1. Historie chromatografie

Revoluční způsob dělení poprvé použil a také pojmenoval ruský botanik Michail Semjonovič Cvět v roce 1903, kdy rozdělil pigmenty chloroplastů z rostlinných extraktů. Zlí jazykové tvrdí, že Cvět do názvu metody zakomponoval své jméno. Význam slova cvět v ruštině je stejný jako chroma v řečtině. Obě znamenají barva. Pro dělení látek použil sloupec uhlíčitanu vápenatého a bylo tedy využito rozdílných absorpčních schopností jednotlivých složek směsi rostlinných barviv [1].

Především z důvodu, že Cvět publikoval v ruštině, byly jeho poznatky ignorovány. Ve třicátých letech 20. století byla tato metoda vzkříšena biochemikem Kuhnem a jeho studentem Ledererem, kteří chromatografii použili při separaci karotenoidů přítomných ve vaječném žloutku [2]. O rozšíření chromatografie se ale zasloužili až Martin a Synge, kteří popsali teorii chromatografie a její využití na separaci aminokyselin [3]. Za svůj objev získali v roce 1952 Nobelovu cenu za chemii.

5.1.2. Principy a rozdělení chromatografických metod

Chromatografie je separační metoda, která je založena na rozdílné distribuci látek mezi nemísitelnou mobilní a stacionární fází. Jako mobilní fáze může být plyn nebo kapalina. Stacionární fáze je buď pevná, nebo může být v podobě kapalného filmu naneseného na pevný nosič.

Vzorek je zaveden na začátek kolony. Jak je rozpuštěný vzorek unášen mobilní fází přes pevnou fázi, začnou se jednotlivé složky vzorku zachycovat na sorbentu a tím se rozdělí na jednotlivé analyty. Průběh chromatografické separace je sledován vhodným detektorem, který je umístěn na konci kolony. Analyt na něm vyvolá odezvu. Signál je převeden do záznamu, který se nazývá chromatogram a skládá se z vrcholu pro každý z oddělených analytů v gausovském tvaru – píků. Chromatografický pík je charakterizován retenčním časem – doba od zavedení vzorku po vrchol píku, nebo retenčním objemem – objem mobilní fáze, který proteče kolonou od nástřiku po vrchol píku. Retenční čas je kvalitativní charakteristikou stanovovaného analytu. O kvantitě daného analytu pak vypovídá plocha pod píkem či výška píku [4].

Chromatografické metody můžeme klasifikovat podle různých hledisek. Následné rozdělení chromatografických metod je upraveno podle L. S. Ettra [5] a doplněno dle současného trendu vývoje nových přístupů.

5.1.2.1. Rozdělení metod podle uspořádání

Podle způsobu provedení můžeme chromatografii rozdělit na dva druhy:

- **Kolonová chromatografie** – stacionární fáze je umístěna v tenké trubce, koloně, ve formě sorbentu, kterým protéká mobilní fáze.
- **Planární chromatografie** – stacionární fáze je nanášena v tenké vrstvě na papírovou, skleněnou, kovovou nebo plastovou desku. Deska je po nanášení vzorku umístěna do vyvíjecí komory s mobilní fází.

5.1.2.2. Rozdělení metod podle povahy mobilní fáze

- **Plynová chromatografie (GC)** – jako mobilní fáze slouží plyn (např. helium, argon, dusík). Vzorek (kapalná či plynná látka) je nejdříve převeden do plynné fáze, poté je nastříknut do proudu inertního plynu a dále unášen přes plněnou kapilární kolonu. Nevýhodou plynové chromatografie je možnost stanovovat pouze látky, které jsou tepelně stabilní a lehce převeditelné do plynné fáze, aniž by se rozložily.
- **Kapalinová chromatografie (LC)** – jako mobilní fáze slouží kapalina (např. rozpouštědlo, tlumivý roztok). Pro dosažení vyšší účinnosti LC docházelo ke zmenšování částic v koloně. Aby byla zvýšena rychlost průchodu vzorku a mobilní fáze přes stacionární fázi, bylo zapotřebí hnát mobilní fázi kolonou vysokotlakým čerpadlem. Proto se tato technika nazývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography). Kapalný nebo pevný vzorek je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, nastříknut a unášen chromatografickou kolonou kapalnou mobilní fází.
- **Superkritická fluidní chromatografie (SFC)** – používá mobilní fázi při tlaku a teplotě vyšší než je její příslušná kritická hodnota (nejčastěji CO₂). Jako stacionární fáze je použita kolona obdobná HPLC kolonám nebo křemenná kapilární kolona s chemicky vázanou fází [6].

5.1.2.3. Rozdělení metod na základě povahy stacionární fáze a principu separace

- **Chromatografie na normálních fázích (NP)** – stacionární fáze je polární, mobilní fáze je nepolární.
- **Chromatografie na reverzních fázích (RP)** – stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární. Velice univerzální metoda pro jednoduché i složité směsi (biologický materiál). Je nejpoužívanější separační technikou v LC.
- **Adsorpční chromatografie** – princip separace je založen na různé afinitě složek ve vzorku vůči povrchu pevné fáze, kde probíhá absorpce a desorpce. Látky, které jsou sorpčními silami vázány k sorbentu silněji, jsou adsorbovány déle, než látky jiné. Látky s menší afinitou vůči sorbentu se tudíž vymývají z kolony dříve. Jako sorbenty pro adsorpční chromatografii se využívají uhlíkové sorbenty, silikagel, oxid hlinitý či organické polymery. Mobilní fáze je vybírána dle eluotropní řady podle vzrůstající polarity.
- **Rozdělovací chromatografie** – separace je založena na rozdílné rozpustnosti složek vzorku ve stacionární fázi (GC) nebo ve stacionární a mobilní fázi (LC).
- **Iontově-výměnná chromatografie** – tato metoda separace je používána pro analyty, které jsou schopny elektrostatické interakce. Retence závisí na interakci nabitých analytů s opačně nabitými ionty ve stacionární a mobilní fázi. Eluce pak probíhá přemístěním iontů analytu ze stacionární fáze, které soutěží s ionty téhož náboje v mobilní fázi. Jako stacionární fáze se používají iontoměniče nanesené na polymerním monolitu či chemicky vázané iontoměniče na silikagelu. Tato metoda se s výhodou využívá pro separaci proteinů [7].
- **Vylučovací chromatografie** – metoda založená na separaci molekul podle jejich velikosti. Metoda je známá také jako gelová permeační chromatografie. Vzorek je nanášen na kolonu, která má porézní náplň s různě velkými póry. K dělení dochází pronikáním jednotlivých molekul rozpuštěných látek do pórů gelu. Malé molekuly procházejí hluboko do stacionární fáze, zatímco velké molekuly migrují kolonou pouze v prostoru mezi částicemi náplně, aniž by byly zadržovány nebo jsou zadržovány jen velice krátce [8].
- **Afinitní chromatografie** – metoda založená na specifické interakci mezi rozpouštědlem a sorbentem za použití imobilizovaného ligandu navázaného na inertní matici. Analyt musí být reverzibilně afinitní k tomuto ligandu. Při

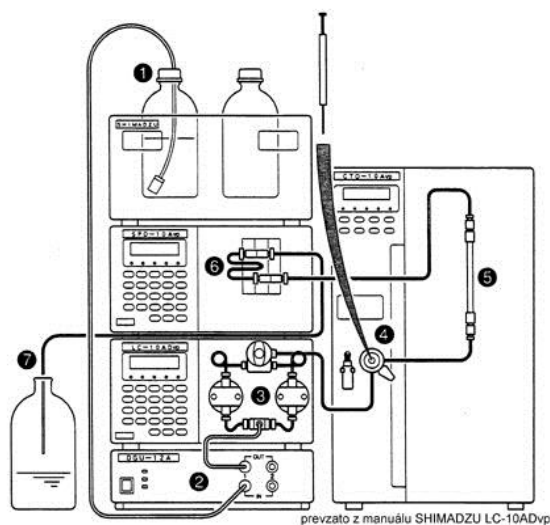
průchodu vzorku kolonou se afinitní molekuly zachytí a molekuly bez afinity projdou kolonou bez jakékoliv interakce. Změnou mobilní fáze dojde k vymytí daného analytu [9].

- **Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)** – separační mechanismus není stále kompletně objasněn. Nejvíce převažuje domněnka, že retence analytu je způsobena jeho rozdělením mezi zakotvenou vrstvou obohacenou o vodu a relativně hydrofóbní mobilní fázi (5-40% voda v acetonitrilu) [10].
- **Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)** – princip separace je postaven na interakci vodné fáze s vysokou koncentrací solí s velice hydrofilní stacionární fází (např. acetamidová fáze). Zvýšením koncentrace soli v mobilní fázi přecházejí analyty do stacionární fáze a dochází ke zvýšení retence. Tato metoda je vhodná pro separaci velkých peptidů a proteinů [11].
- **Micelární elektrokinetická chromatografie** – je druh kapilární elektroforézy (capillary electrophoresis – CE) vhodný pro separaci nabitých i nenabitých molekul. Principem separace je přidání micelární pseudostacionární fáze (tenzidy tvořící micely, které mají hydrofobní střed a hydrofilní povrch), která interaguje s analytem na chromatografickém principu [12].

5.1.3. Instrumentální sestava kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze, odplyňovacího zařízení (degaser), vysokotlakého čerpadla, dávkovače vzorku – autosampleru, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na vyhodnocení získaných dat. Schéma kapalinového chromatografu je zobrazeno na Obr. 1.

Blokové schéma HPLC



Obr. 1 – Schéma sestavy pro LC [13]

Mobilní fáze je ze zásobníku vedena do vysokotlakého čerpadla a prochází přes degaser. Poté pokračuje přes dávkovač vzorku na kolonu napojenou na detektor a nakonec do odpadní láhve. Při využití gradientové eluce je před vysokotlaké čerpadlo ještě umístěn směšovač mobilních fází.

5.1.4. Trendy v instrumentaci pro kapalinovou chromatografii

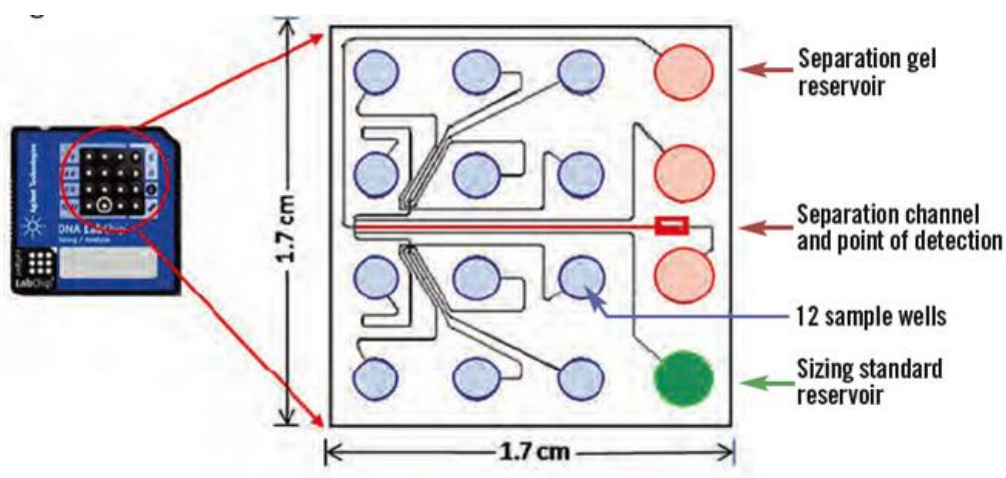
Vývoj chromatografických metod vede především ke zrychlení chromatografické separace při zachování citlivosti a účinnosti metod. Kolony s menšími částicemi vykazují lepší účinnost separace, která je spojena s vyšším operačním tlakem, na který není HPLC systém stavěn. V roce 2004 představila firma Waters (Milford, USA) první UHPLC systém (ultra high performance liquid chromatography) [14]. Oproti HPLC sestavě je mnohem odolnější vůči vysokým tlakům a to až do tlaku 100 MPa (14 500 psi). S tím souvisí i vývoj nových kolon s částicemi o velikosti 2,7 μm a sub-2 μm .

Dalším trendem je využití dvoudimenzionální LC (2D-LC), kde jsou obě dimenze založeny na rozdílném separačním mechanismu. Tento způsob separace je vhodný pro komplexní směsi, kde jednodimenzionální LC nestačí. Jsou to především směsi v analýze potravin, environmentální analýze, molekulární biologii, identifikaci mikroorganismů a metabolomice.

Z důvodu obrovské spotřeby organických rozpouštědel, snahy snížit cenu analýzy a zvýšit její rychlost se vyvíjí miniaturizovaná instrumentace pro analytickou chemii. To vede k rozvoji mikro- a nanokapalinové chromatografie. Mikrokolony mají průměr

v rozsahu 0,5-1 mm, kapilární kolony 100-500 μm a nanokolony pak 10-100 μm . Průtoky mobilní fáze jsou v rozsahu μl a nl/min . Množství vzorku nastříkovaného na nanokolonu je několik nl , u mikrokolon přibližně μl . K detekci lze použít konvenční detektory užívané v HPLC.

Nároky na rychlost a integraci úpravy vzorku před analýzou a separace do jednoho zařízení vedla ke vzniku „ μ -total analysis system“ jinak také laboratoře na čipu (Obr. 2). Čipy jsou vyráběny ze skla, silikonu či polymerů a k separaci využívají stejné náplně kolon jako klasická LC (monolity, částicové kolony). Výhodou je nízký mrtvý objem, spotřeba jen velice malého množství vzorku a možnost automatizace [15].



Obr. 2 - Laboratoř na čipu komerčně dostupná od firmy Agilent [16]

5.1.5. Stacionární fáze pro HPLC a UHPLC

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou chromatografického systému. Může jí být tuhá látka nebo kapalinový film zakotvený nebo chemicky navázaný na nosič. K vlastnímu dělení látek dochází na náplni chromatografické kolony, a proto úspěšnost celého separačního procesu závisí na schopnosti kolony rozdělit dané analyty.

Stacionární fáze lze členit z několika hledisek [17]:

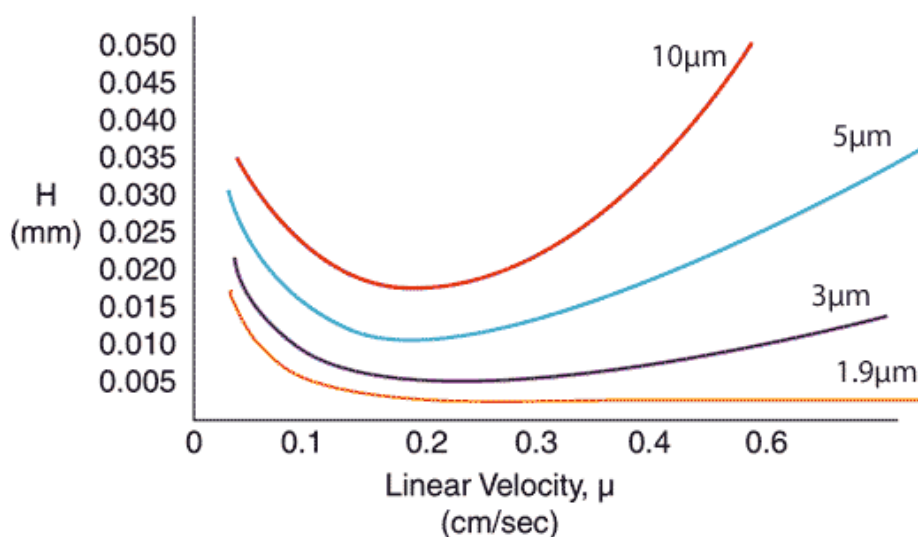
- Podle polarity:
 - Polární
 - Nepochární
 - Amfoterní
- Podle chromatografického módu:
 - Normální (NP)

- Reverzní (RP)
- Ionexy
- HILIC
- HIC
- Podle chemického složení:
 - Anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, hlinitý, titaničitý)
 - Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu
 - Polymerní
 - Hybridní
 - Na bázi grafitového uhlíku

Stacionární fáze v koloně pak mohou mít buď částicový, nebo monolitický charakter.

5.1.5.1. Částicové kolony

První kolony pro HPLC byly skleněné nebo kovové trubice naplněné částicemi o velikosti okolo 100 μm . Poté se zjistilo, že při použití menších částic se zvyšuje účinnost analytické kolony. První kolony s částicemi o velikosti přibližně 25 μm byly komerčně dostupné na konci 60. let 20. století a vzápětí byly částice ještě zmenšeny [18]. Poté následoval objev sférických částic v 90. letech. Kolony se sférickými částicemi o velikosti 5 μm se v následujícím vývoji dále zmenšovaly na 3 μm a následně 2 μm a nakonec i na částice menší než 2 μm [19]. Obr. 3 zobrazuje zvyšující se účinnost chromatografických kolon s různě velkými částicemi – závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze.



Obr. 3 – Průběh van Deemtrových křivek u kolon s částicemi 10 μm , 5 μm , 3 μm a 1,9 μm [20]

Trendem v HPLC a UHPLC separaci je využití povrchově porézních částic (Obr. 4). Tato technologie byla popsána Kirklandem v roce 1992, který tyto částice nazval Poroshell (Agilent) [21]. Částice je tvořena pevným jádrem pokrytým porézní silikagelovou vrstvou, která tvoří 60-75 % objemu částice. Přítomnost tenké porézní vrstvy má za následek urychlení kinetiky přenosu hmoty analytu z mobilní fáze do porézního povrchu částice a následně ven a tím je zvýšena separační účinnost. Navíc charakter částic přispívá k jejich pravidelnější distribuci v koloně oproti plně porézním částicím [22, 23]. V následujících letech se tyto typy kolon začali rozvíjet a byly dostupné na trhu pod různými ochrannými názvy – např. fused-core částice (Ascentis Express, Sigma-Aldrich) či core-shell částice (Kinetex, Phenomenex).

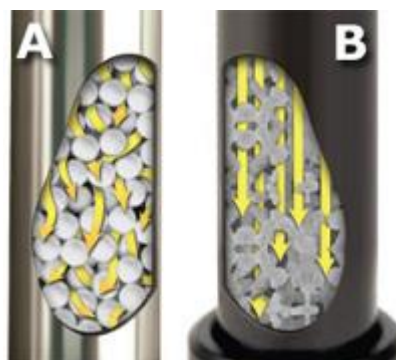


Obr. 4 – Povrchově porézní částice kolon Kinetex, Phenomenex [24]

Výhodou povrchově porézních částic je nejen vyšší separační účinnost, ale i rychlejší analýza bez zvýšení zpětného tlaku chromatografického systému. Díky tomu jsou povrchově porézní částice vhodné jak pro HPLC, tak pro UHPLC systémy [25].

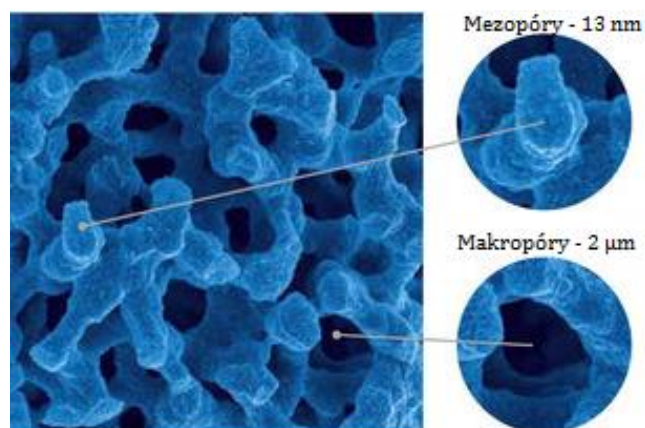
5.1.5.2. Monolitické kolony

Přestože lze zmínku o monolitech najít již kolem roku 1950, éra použitelných a funkčních monolitů začala kolem roku 1990. Průkopníky byli Nakanishi, Švec, Hjerten a Tanaka. Monolitické kolony jsou naplněny jedním kusem porézního materiálu. Jejich hlavní výhodou oproti částicovým kolonám je lepší propustnost tohoto materiálu umožňujícího vysoký průtok mobilní fáze bez vysokého zpětného tlaku a sníženého přenosu hmoty (Obr. 5) [26].



Obr. 5 – Částicová (A) a monolitická (B) náplň v koloně [27]

Monolitická náplň v koloně má výborné hydrodynamické vlastnosti. Makropóry o velikosti 2 μm umožňují rychlý průtok mobilní fáze skrz monolitickou kolonu, což má za následek značné zvýšení přenosu hmoty mezi stacionární a mobilní fází. Mezopóry o velikosti 13 nm pak poskytují obrovský povrch a tím i vysokou separační kapacitu. Celková porozita monolitického materiálu je 85 %, což je o 15-20 % víc než u kolon naplněných 5 μm částicemi [28]. Struktura monolitické náplně komerčně dostupné kolony Chromolith Performanace (Merck, Darmstadt, Německo) je zobrazena na Obr. 6.



Obr. 6 – Struktura monolitické náplně kolony Chromolith (Merck) [29]

Makroporózní monolitické kolony jsou vyráběny přímým naplněním kolony polymerační směsí, poté se uzavřou a teplem se zpolymerují. Monolitické kolony z anorganických materiálů se tak ale připravit nedají, protože ztuhnutí během hydrolytické iniciované polykondenzace tetraalkoxysilanů v přítomnosti polyethylenoxidu je doprovázeno poklesem objemu. Proto se tyčinky vyrábějí odděleně a poté se uzavřou do smršťivé trubice z PEEK materiálu (poly(ether-ether)keton), která pak tvoří tělo kolony. Interaktivní skupiny (nejčastěji C18) se pak již navazují na silikagelový nosič reakcemi přímo v koloně.

Každá monolitická kolona, ať už připravena *in situ* nebo připravena odděleně a poté uzavřena do trubice, je vlastně prototypem. Přesto ale široká nezávislá studie prokázala, že reprodukovatelnost komerčních kolon Chromolith (Merck) vykazuje relativní směrodatnou odchylku v relativní retenci látek 4 % [30].

V roce 2011 byla na trh firmou Merck uvedena monolitická kolona nové generace Chromolith HighResolution (HR). Oproti monolitickým kolonám první generace se liší velikostí pórů, lepším tvarem píků a vyšší separační účinností. Navíc lze použít i ve spojení s UHPLC systémem. Porovnání první a druhé generace je uvedeno v Tabulka 1.

Specifikace sorbentu	Monolit první generace (Chromolith® Performnce)	Monolit druhé generace (Chromolith® HR)
Velikost makropórů	2 µm	1,15 µm
Velikost mezopórů	13 nm	15 nm
Objem pórů	1 ml/g	1 ml/g
Plocha povrchu	300 m ² /g	250 m ² /g
Obsah uhlíku	18 %	18 %

Tabulka 1 – Porovnání parametrů monolitických kolon první a druhé generace (přejato z [31])

Monolitické kolony se s výhodou používají pro bioanalýzu v klinických laboratořích. Umožňují vysoké průtoky pro rychlou separaci a dokážou rozdělit i velké molekuly jako například bílkoviny a nukleové kyseliny za krátký čas [32].

Monolitická struktura silikagelu a absence kolonových frit má za výsledek i vyšší životnost monolitické kolony ve srovnání s plně porézními či povrchově porézními částicemi. Počet nástřiků na částicovou kolonu bez ztráty separační účinnosti je nižší [33].

5.2. VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD V KLINICKÝCH LABORATOŘÍCH

Validace je mezinárodním metrologickým slovníkem definována jako ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. Validace analytického postupu je proces, který zajišťuje, že daný postup nebo analytická metoda jsou vhodné pro stanovený účel. Validací se též rozumí poskytnutí důkazu ve formě záznamů, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci. Validace postupu poskytuje takové prověření analytické metody, které zaručuje, že validovaná metoda dává opakovaně pravdivé výsledky s vysokou mírou jistoty.

Provádění validace metody je nezbytné v následujících případech:

- zavádění nové metody v laboratoři
- pořízení a zavedení nového analytického měřicího systému do provozu
- rozšíření stávající metody o další účel (např. rozšíření analýzy o další druh biologického materiálu)
- převzetí metody z jiné laboratoře nebo odborné publikace
- přetrvávající problém v analytickém systému.

Revalidaci metody je nutné provést v případě, došlo-li ke změně analytického postupu v rozmezí jiných, než je povoleno příslušnými lékopisy či standardním operačním postupem (SOP).

Validaci můžeme provádět dle aktuálních českých či zahraničních platných norem, předpisů a doporučení. Zahraniční jsou např.: International Conference on Harmonization (ICH) – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1) [34], European Pharmacopoeia 8 (Evropský lékopis), United States Pharmacopoeia 37/National Formulary 32 (USP/NF) (Lékopis Spojených Států) [35] a guidelines vydávané FDA (Food and Drug Administration) [36] či European Medicines Agency (EMA) [37]. Z českých autorit se validací analytických metod zabývá Český lékopis 2009 [38] a Státní úřad pro kontrolu léčiv (SÚKL) ve Věstníku 1/1994 [39] a pokynu VYR 32 – doplněk 15.

V této kapitole je čerpáno i z následujících zdrojů literatury:

- ✓ Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E.: Trends in quality in analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, Trend in Analytical Chemistry, 2004, 23, (8), p. 535-552 [40]

- ✓ Green, M. J.: A Practical Guide to Analytical Method Validation, Analytical Chemistry, 1996, 68, (9), p. 305-309 [41]
- ✓ Nováková, L., Douša, M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. [42]

5.2.1. Rozsah validace metody

5.2.1.1. Plná validace

Validace metod zahrnuje veškerá kritéria zajišťující kvalitu získaných dat, jako je přesnost, preciznost, selektivita, limit detekce, limit kvantifikace, linearita a rozsah, robustnost a dle normy European Medicines Agency také přenos, matricové efekty, integrita zředování a stabilita.

Plnou validaci analytické metody je nutno provést při vývoji nové metody, pro analýzu nového léčiva či při doplnění metabolitů do stávající metody pro kvantifikaci.

5.2.1.2. Částečná validace

Částečná validace může být provedena v případě, pokud byly na validované analytické metodě provedeny drobné změny, které nevyžadují plnou validaci. Rozsah částečné validace se může pohybovat v rozmezí jednoho či více validačních parametrů.

Mezi situace, kdy lze provést částečnou validaci patří:

- přenos metody na jiné pracoviště
- změna analytického vybavení
- omezení objemu vzorku
- změna rozsahu koncentrací
- změna v postupech zpracování vzorku
- změna skladovacích podmínek.

5.2.1.3. Křížová validace metody

V případě použití více analytických metod, nebo více měřících laboratoří, je potřeba pro analýzu provést křížovou validaci. Pro provedení křížové validace je třeba analyzovat stejnou sadu kontrolních vzorků pomocí obou validovaných metod (v obou laboratořích). Pro kontrolní vzorky by měla být průměrná přesnost $\pm 15\%$ [37].

5.2.2. Test způsobilosti chromatografického systému

Při vývoji nové analytické metody se musí použité přístroje a vybavení kvalifikovat a musí být schopné dosáhnout výsledků požadovaných pro danou analýzu. K tomu slouží test způsobilosti systému (SST – System Suitability Test), který vede k zajištění přiměřené účinnosti chromatografické sestavy. Co se autorit týče, některé mají SST jako součást validace (ICH), jiné považují SST jako zvláštní test mimo vlastní validaci (USP). EMA naopak SST vůbec nezmiňuje. SST je prováděn vždy na začátku každé série měření, při změně systému nebo při podezření na nesprávně fungující systém. Test způsobilosti se provádí se standardními roztoky látek o koncentracích, které jsou blízké koncentracím v analyzovaném vzorku.

Mezi faktory, které ovlivňují chování chromatografického systému, patří:

- složení, iontová síla, teplota a pH mobilní fáze
- průtok, rozměry chromatografické kolony, teplota a tlak na koloně
- charakteristika stacionární fáze, velikost částic nebo mezopórů, porozita a specifický povrch
- reverzní fáze a další povrchové modifikace stacionárních fází, míra chemické modifikace

5.2.2.1. Zdánlivá účinnost chromatografického systému

Účinnost kolony se může vypočítat jako počet teoretických pater (N),

$$N = 5,54 \times \left(\frac{T_r}{W_h} \right)^2 \qquad N = 16 \times \left(\frac{T_r}{W} \right)^2$$

Rovnice 1 – Účinnost kolony ČL

Rovnice 2 – Účinnost kolony USP

kde T_r je retenční čas analytu (min), W_h je šířka píku v polovině jeho výšky (min), W je šířka píku v základně (min).

Čím větší je počet teoretických pater, tím je kolona účinnější a zóna separované látky je při průchodu kolonou méně rozmývána. Počet teoretických pater by měl být podle USP >2000 a podle ČL >1500.

Pro porovnání kolon o různých délkách se používá tzv. výškový ekvivalent teoretického patra (HETP).

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Rovnice 3 – Výškový ekvivalent teoretického patra

kde L je délka kolony (μm) a N je počet teoretických pater.

5.2.2.2. Rozlišení

Rozlišení mezi píky dvou složek se může vypočítat:

$$R_s = \frac{1,18 \times (T_{rj} - T_{ri})}{W_{hi} + W_{hj}} \qquad R_s = 2 \times \left(\frac{T_{rj} - T_{ri}}{W_i + W_j} \right)$$

Rovnice 4 – Rozlišení dle ČL

Rovnice 5 – Rozlišení dle USP

kde $T_{rj} > T_{ri}$, $T_{ri,j}$ je retenční čas píků, W je šířka píku v základně a W_h je šířka píku v polovině jeho výšky. Limit pro rozlišení je $R_s \geq 1,5$ (ČL, USP).

5.2.2.3. Faktor symetrie píku

Faktor symetrie (též tailing factor) chromatografického píku se vypočítá podle vzorce:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

Rovnice 6 – Faktor symetrie podle ČL, USP

kde $W_{0,05}$ je šířka píku v dvacetině jeho výšky a d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Pokud se hodnota A_s rovná 1,0, značí to symetrii píku. Je-li $A_s > 1,0$, jedná se o chvostování a je-li $A_s < 1,0$, jedná se o čelní asymetrii píku. Limit faktoru symetrie je podle USP i ČL 0,8 – 1,5.

5.2.2.4. Opakovatelnost nástřiku

Opakovatelnost nástřiku standardního roztoku se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka v procentech pro pět (USP) či šest (ČL) nástřiků. Výpočet směrodatné odchylky se vypočítává za pomoci statistického programu.

Limit pro opakovatelnost je u ČL do 1 % a u USP do 2 %.

5.2.2.5. Retenční faktor

Retenční faktor (též hmotnostní distribuční poměr či kapacitní faktor) je definován jako:

$$k = \frac{\text{množství látky ve stacionární fázi}}{\text{množství látky v mobilní fázi}} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

Rovnice 7 – Retenční faktor ČL, USP

kde K_C je distribuční konstanta, V_S je objem stacionární fáze a V_M je objem mobilní fáze.

Retenční faktor složky můžeme určit z chromatogramu dle vzorce:

$$k = \frac{T_r - T_m}{T_m}$$

Rovnice 8 – Retenční faktor vypočtený z chromatogramu

kde T_r je retenční čas a T_m je mrtvý čas, což je čas potřebný pro eluci nezadržované látky.

5.2.2.6. Relativní retence

Relativní retence se vypočítá jako odhad podle vzorce:

$$r = \frac{T_{ri} - T_m}{T_{rST} - T_m}$$

Rovnice 9 – Relativní retence ČL, USP

kde T_{ri} je retenční čas sledované látky, T_m je mrtvý čas a T_{rST} je retenční čas referenční látky.

5.2.3. Validací parametry

5.2.3.1. Přesnost (Accuracy)

Přesnost analytického postupu je vyjádřena těsností shody mezi hodnotou získanou validovanou metodou a správnou hodnotou. Pravdivá hodnota se zjistí buď nezávislou metodou, jejíž přesnost je ověřena, analýzou placeba s přidaným standardem nebo analýzou samotné matrice s přesně známým přídatkem standardní látky. Přesnost se poté vyjádří jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery):

$$\text{výtěžnost} = \frac{\text{nalezená hodnota}}{\text{pravdivá hodnota}} \times 100$$

SÚKL požaduje jen jednu hladinu, tedy stanovení minimálně šesti různých modelových vzorků s přibližně 100% obsahem stanovované látky. ICH doporučuje provedení nejméně devíti stanovení minimálně tří koncentračních úrovní, pokrývajících rozsah metody (tzn. tři koncentrační úrovně a tři opakované analýzy každé koncentrace).

Dříve byla tato veličina označována jako správnost. Tento termín je ale v normě TNI: Mezinárodní metrologický slovník, nahrazen termínem přesnost. Přesnost může být označena také jako pravdivost.

5.2.3.2. Preciznost (Precision)

Preciznost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky testů prováděných s jedním homogenním vzorkem. Jedná se o kompletní přípravu homogenizovaného vzorku, nejde pouze o opakované nástřiky jednoho vzorku. Preciznost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka série měření. Preciznost může být měřena na 3 úrovních:

- **Opakovatelnost** - opakovatelnost vyjadřuje preciznost za stejných provozních podmínek v krátkém časovém intervalu (stejný den, přístroj a pracovník). ICH norma doporučuje stanovení opakovatelnosti devíti měřeními pokrývajících stanovený rozsah metody (tj. tři koncentrace po třech opakováních) nebo stanovení na 100% koncentraci testované látky.
- **Reprodukovatelnost** - reprodukovatelnost odkazuje na opakované měření jednoho vzorku v různých laboratořích (jiný přístroj, pracovník).
- **Intermediární preciznost** - ověření preciznosti metody v rámci jedné laboratoře (stejný vzorek, jiný den, jiný pracovník, jiný přístroj).

5.2.3.3. Selektivita (Selectivity) a specifita (Specificity)

Selektivita metody je její schopnost změřit přesně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti ostatních složek jako jsou nečistoty, rozkladné produkty, matricové složky, zbytková rozpouštědla či neznámé látky. Je nutné doložit, že metoda je dostatečně selektivní pro dané použití a že stanovení obsahu účinné látky není rušeno jinými látkami.

Selektivita je vyjádřena jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými rozkladnými produkty, složkami placebo nebo jinými nečistotami. V případě neznámých či nedostupných nečistot či rozkladných produktů je možné

selektivitu stanovit jako výtěžnost standardního přídatku čisté látky k materiálu, který obsahuje stálé množství jiných látek.

Specifita i selektivita nám dávají představu o spolehlivosti metody. Specifita se obecně vztahuje na metodu, kde je detekován pouze jeden analyt, zatímco selektivita se používá u metod stanovujících různé analyty, které jsou od sebe rozlišeny.

Oba termíny si jsou velice blízké a vyjadřují stejnou charakteristiku. Metoda může být specifická, pouze pokud je 100% selektivní [40].

Co se autorit týče, SÚKL nepožaduje číselné doložení selektivity, ale je nutné doložit chromatogramy placeba, známých vedlejších a rozkladných produktů nebo chromatogramy vzorků po rozkladu teplem, světlem či enzymatickou reakcí. ICH norma uvádí, že při chromatografickém postupu vyžaduje uvedení reprezentativních chromatogramů, které dokazují stupeň selektivity a že píky mohou být odpovídajícím způsobem označeny. Test čistoty píky může být důkazem, že pík neodpovídá více než jedné složce ve vzorku.

5.2.3.4. Limit detekce (Limit of detection – LOD)

Limit detekce je nejnižší množství látky ve vzorku, které může být detekováno, ale ne nutně kvantifikováno. Limit detekce ukazuje citlivost metody a je vyjádřen jako koncentrace analytu.

LOD může být stanoven několika způsoby:

➤ U neinstrumentálních metod

- Experimentální zjištění – z analýzy vzorků o známé koncentraci se určí minimální koncentrace, kdy je ještě možné látku detekovat.

➤ U instrumentálních metod

- Experimentální zjištění jako u neinstrumentálních metod.
- Zjištění na základě poměru signálu k šumu (S/N) – tento přístup může být aplikován pouze u analýz, které vykazují šum na základní linii. Zjištění se provede porovnáním naměřených signálů ze vzorků o známé nízké koncentraci analytu se slepými vzorky a stanoví se minimální koncentrace, kdy je analyt spolehlivě detekován. Limit detekce je pak trojnásobkem poměru S/N.
- Zjištění založené na stanovení směrodatné odchylky odezvy slepého vzorku a směrnice kalibrační přímky:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

Rovnice 10 – Výpočet limitu detekce podle sklonu kalibrační křivky

kde σ je směrodatná odchylka odezvy a S je sklon kalibrační křivky. Sklon může být odhadnut podle kalibrační přímky analytu a σ může být například vypočtena z několika měření rozsahu analytického pozadí odezvy slepého vzorku a výpočtem standardní odchylky těchto měření.

Ať byla použita jakákoliv metoda stanovení, limit detekce by měl být ověřen analýzou dostatečného množství vzorků o koncentraci blízké tomuto limitu.

5.2.3.5. Limit kvantifikace (Limit of quantification – LOQ)

Limit kvantifikace je nejnižší množství analytu ve vzorku, který může být stanoven s přijatelnou přesností a správností za daných experimentálních podmínek.

Stanovení LOQ:

- Vizualní stanovení – může být použito jak u instrumentálních tak i neinstrumentálních metod. LOQ je určeno analýzou vzorku o známé koncentraci analytu a stanovením minimální koncentrace, kdy je analyt kvantifikován s danou přesností a precizností.
- Přístup založen na porovnání poměru S/N – měření se provede stejně jako u zjištění LOD. Limit kvantifikace je pak desetinásobkem poměru S/N
- Výpočet využívající směrodatnou odchylku odezvy slepého vzorku a směrnice kalibrační přímky:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Rovnice 11 – Výpočet limitu kvantifikace podle sklonu kalibrační křivky

kde σ je směrodatná odchylka odezvy a S je sklon kalibrační křivky.

Po stanovení limitu kvantifikace je třeba získané hodnoty ověřit analýzou dostatečného množství vzorků o koncentraci blízké tomuto limitu. Hodnota LOQ pak musí být součástí lineárního rozsahu metody a je tedy většinou prvním bodem kalibrační přímky.

V mezinárodních normách se můžeme setkat s výrazem dolní mez stanovitelnosti (LLOQ – lower limit of quantification). LLOQ je nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s přijatelnou přesností. Jako nejnižší bod kalibrační přímky může být přijat

LLOQ pouze v případě, že je odezva analytu alespoň pětinasobná ve srovnání s odpovědí slepého vzorku.

5.2.3.6. Linearita a rozsah (Linearity and Range)

Linearita analytické metody je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Rozsah je pak dán intervalem mezi nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační přímky, v němž je látka stanovena s takovou přesností, precizností a linearitou, jakou dokládají výsledky validace. Nejvyšší koncentrace v kalibrační přímce se může označovat jako horní limit detekce (ULOQ – upper limit of quantification), tj. nejvyšší koncentrace, kterou lze stanovit s dostatečnou přesností.

Linearita se podle požadavků SÚKLu stanovuje nejméně na pěti koncentračních úrovních za použití standardních roztoků v rozsahu 50 % – 150 % očekávané koncentrace analytů ve vzorku. Výsledná závislost nemusí být lineární, může být proto vyjádřena matematickou funkcí, ale pak je nutné při každém měření vyhodnocovat výsledky celé kalibrační křivky. Linearita se dokládá buď graficky jako závislost výsledků na koncentraci stanovovaného analytu, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy.

Z údajů by pak měly být ke kalibrační křivce doloženy korelační koeficient, y-úsek, směrnice regresní linie a analýza odchylek. Korelační koeficient je hodnocením linearity. Nabývá hodnoty ± 1 , přičemž validovaná metoda by měla mít koeficient vyšší než 0,9990.

5.2.3.7. Robustnost (Robustness) a ragidita (Ruggedness)

Robustnost je míra schopnosti analytické metody dávat přesné a precizní výsledky při záměrném zatížení provedení postupu mírnými odchylkami.

V kapalinové chromatografii patří k těmto změnám:

- ✓ vliv změny pH vodné složky mobilní fáze
- ✓ vliv změny ve složení mobilní fáze
- ✓ změna kolony (změna šarže či výrobce)
- ✓ teplota na koloně
- ✓ průtok mobilní fáze
- ✓ stabilita analyzovaných vzorků.

V souvislosti s robustností se můžeme setkat i s pojmem ragidita. Přestože jsou tyto termíny často brány jako synonyma a jsou tak zaměňovány, pro každý výraz je rozdílná definice. Ragidita metody vypovídá o mezilaboratorním chování analytického procesu, který je zatížen malými změnami okolního prostředí a provozních podmínek. Normy USP

a ICH tento termín nedefinují, ale je součástí opakovatelnosti, jako stupeň reprodukovatelnosti výsledku získaného za různých podmínek (různý den, jiný analytik, přístroj, reagentie, odchylky v přípravě vzorku).

V obou případech je pak variabilita vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka v procentech [40].

5.2.3.8. Přenos (Carry-over)

Problém přenosu by měl být řešen a minimalizován již během vývoje metody. Během validace by přenos měl být posouzen tak, že po nastříknutí vzorku s vysokou koncentrací nebo kalibračního standardu v horní mezi stanovitelnosti se nastříkneme slepý vzorek. Odezva přenosu analytu do slepého vzorku po nástřiku standardu o vysoké koncentraci nesmí být větší než 20 % odezvy dolní meze stanovitelnosti pro analyt a 5 % pro vnitřní standard. Při validaci bioanalytické metody je tedy nutné tento přenos otestovat tak, aby v reálné analýze nebyla ovlivněna přesnost a preciznost. Jako opáření přenosu je pak nástřik slepého vzorku po analýze vzorku s očekávanou vysokou koncentrací [37].

5.2.3.9. Integrita zředování

Ředění vzorků nesmí ovlivnit ani přesnost a ani preciznost. Pokud to lze, měla by se integrita zředování ověřit obohacením (spikováním) matrice vzorkem o koncentraci přesahující horní mez detekce a naředěním tohoto vzorku příslušnou slepou matricí. Pro každý faktor zředění by mělo být nejméně 5 stanovení. Přesnost a preciznost by měla být v rozsahu ± 15 %. Ověření integrity zředění může být provedeno v případě potřeby i jako částečná validace [37].

5.2.3.10. Matricové efekty (Matrix effect)

Vliv matrice by měl být ověřen v případě využití hmotnostně spektrometrické detekce. Pro zhodnocení matricových efektů je potřeba otestovat minimálně 6 různých slepých vzorků matrice. Smíšené matrice by neměly být použity.

Pro každý analyt a vnitřní standard je potřeba vypočítat zvlášť matricový faktor pro každý jednotlivý vzorek matrice. Matricový faktor se vypočte jako poměr plochy pod píkem analytu za přítomnosti matrice (spikovaný vzorek slepé matrice)/plocha pod píkem roztoku analytu v rozpouštědle (mobilní fáze) za nepřítomnosti matrice. Normalizovaný matricový faktor se vypočte jako poměr matricového faktoru analytu/matricový faktor vnitřního standardu. Variační koeficient normalizovaného faktoru, vypočtený z 6 vzorků matrice, by neměl přesáhnout 15 %. Stanovení

matricového faktoru by mělo probíhat za využití kontrolních vzorků o nízké a vysoké koncentraci (maximálně 3x LLOQ a v blízkosti ULOQ). V případě obtížně dostupné matrice (např. likvor, cerebrospinální tekutina, plodová voda, atd.) může být použito méně než 6 různých vzorků matrice, ale vliv matrice musí být zjištěn v každém případě. V případě použití méně než 6 různých vzorků matrice, musí být uveden důvod ve validační zprávě [37].

5.2.3.11. Stabilita

Zhodnocení stability je nezbytné pro ujištění, že během každého kroku přípravy vzorku, jeho analýzy a skladování není ovlivněna koncentrace cílového analytu.

Stabilita se ověřuje za pomoci kontrolních vzorků, kterými jsou slepé vzorky naspikované cílovým analytem na úrovni koncentrace odpovídající dolní a horní mezi stanovitelnosti. Jeden z takto připravených vzorků musí být ihned analyzován. Následně jsou další vzorky podrobeny zpracování či skladovacím podmínkám. Veškeré kroky úpravy vzorku a skladovací podmínky musí odpovídat krokům užitým pro zpracování a uchovávání reálných vzorků. Kontrolní vzorky jsou analyzovány a porovnávány oproti kalibrační křivce získané z čerstvě připravených kalibračních standardů. Zjištěné koncentrace jsou srovnány s nominálními koncentracemi. Střední hodnota koncentrace na každé koncentrační úrovni musí být v rozsahu $\pm 15\%$ nominální hodnoty koncentrace.

Testy stability by měly být provedeny:

- Stabilita zásobních a pracovních roztoků v odpovídajícím zředění, stabilita vnitřních standardů.
- Stabilita analytu během opětovného zmrazení a rozmrazení vzorku v matrici (Freeze and thaw stability) – vzorky jsou z teploty skladování ohřáty na laboratorní teplotu nebo teplotu pro úpravu vzorku. Po kompletním roztátí jsou vzorky znovu zmrazeny na teplotu uskladnění. Během každého cyklu by měly být vzorky zamrazeny alespoň pro dobu 12 hodin, než jsou zase rozmrazeny. Tento proces se opakuje třikrát a následně jsou vzorky zanalyzovány.
- Krátkodobá stabilita analytu v matrici za laboratorní teploty či teploty zpracování vzorku.
- Dlouhodobá stabilita analytu v matrici během skladování.
- Stabilita zpracovaného vzorku při laboratorní teplotě.
- Stabilita zpracovaného vzorku při teplotě v autosampleru.

Všechny vzorky pro stanovení stability by měly být připraveny z čerstvě vyrobeného zásobního roztoku analytu ve vhodné biologické matrici, která neobsahuje interferující látky [37].

5.3. ÚPRAVA VZORKU PŘED ANALÝZOU

Z důvodu složité matrice, obsahu bílkovin, tuků a dalších interferujících látek musí být vzorek před analýzou upraven. Tato úprava bývá časově nejnáročnějším a nejkritičtější bodem během manipulace s biologickým materiálem a zabere až 80 % času z celkové doby analýzy [43]. Na volbě správného a správně provedeného postupu závisí prakticky úspěch celé analýzy, neboť metoda extrakce může ovlivnit výsledky jak kvalitativně, tak kvantitativně. Úpravou se vzorek může též zakoncentrovat či může sloužit ke stabilizaci cílového analytu. Dále musí být zvolená metoda opakovatelná a musí mít co největší výtěžnost.

Mezi konvenční typy úpravy vzorku před analýzou patří extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction – LLE), extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction – SPE) a srážení proteinů (protein precipitation – PP). Trendem posledních let je však miniaturizace těchto metod. Důvody jsou jak časové, tak ekonomické a ekologické, kdy se klade důraz na menší spotřebu rozpouštědel a snížení zátěže životního prostředí. Termín mikroextrakce je používán pro metody, které využívají velmi malé objemy extrakčního činidla vzhledem k objemu vzorku [44].

Mikroextrakční metody mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin – metody založené na principu LLE – liquid phase microextraction (LPME) a metody založené na principu SPE – solid phase microextraction (SPME).

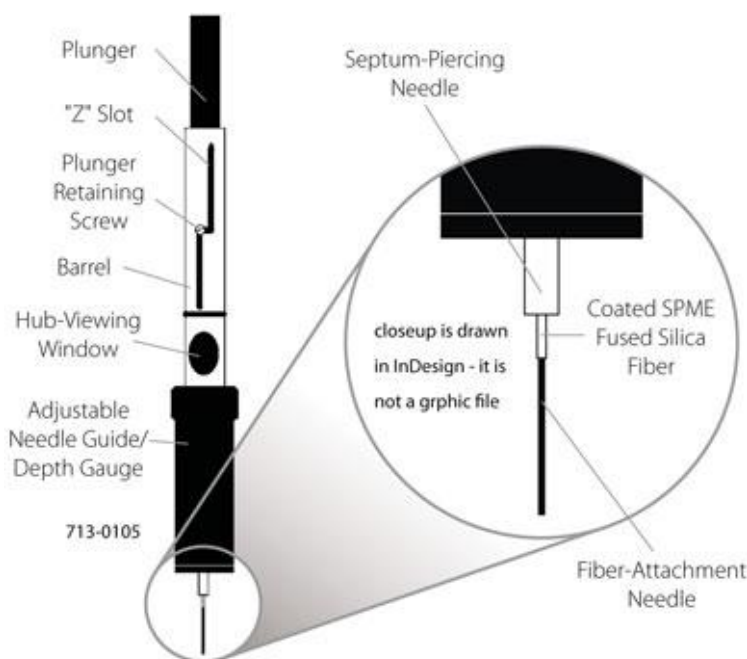
5.3.1. Mikroextrakce tuhou fází

Oproti klasické SPE se mikroextrakce vyznačuje značnou redukcí spotřeby rozpouštědel a dalších reagentů, snížením doby trvání extrakce a také potřebou menšího objemu analyzovaného vzorku. Navíc použití nových extrakčních metod umožňuje přímý nástřik extraktu do chromatografického systému, což může vést k integraci všech kroků přípravy vzorků.

Do metod patřících do této skupiny jsou mikroextrakce na tuhou fázi (solid phase microextraction – SPME), mikroextrakce tuhým sorbentem v mikrostríkačce (microextraction by packed sorbents – MEPS), sorpční extrakce na míchadle (stir bar sorptive extraction – SBSE) či extrakce pomocí plněných špiček pipet (disposable-pipette extraction – DPX).

5.3.1.1. Mikroextrakce na tuhou fázi (Solid phase microextraction – SPME)

Mikroextrakce na tuhou fázi byla představena jako zelená technika Pawliszynem a jeho kolegy v roce 1990 [45]. Je popsána jako velice jednoduchá a účinná úprava vzorku bez potřeby rozpouštědel. **SPME pomocí vlákna** (Fibre SPME) využívá křemíkové vlákno potažené stacionární fází, do které se přímo extrahují analyty ze vzorku (Obr. 7). SPME se vyznačuje jednoduchostí provedení, univerzálností, relativně nízkými náklady na vybavení, krátkým časem extrakce, úplným odstraněním organických rozpouštědel z analytického protokolu, možností sběru vzorků *in situ* a *in vivo*, možností automatizace a možností umístění vlákna přímo do měřicího systému (především do plynového chromatografu).



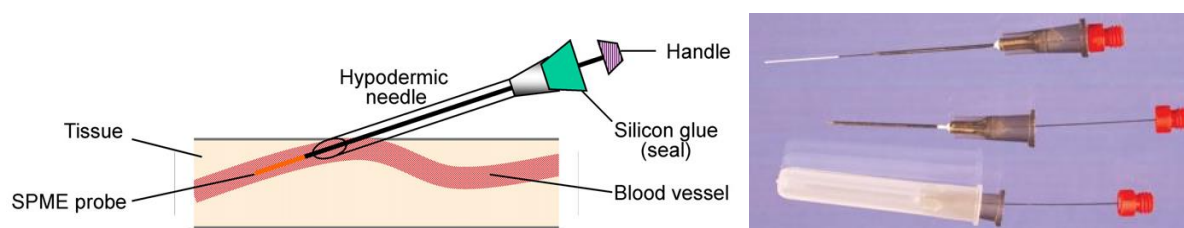
Obr. 7 – Komerčně dostupné SPME zařízení [46]

Pro úpravu vzorků mohou být zvoleny dva způsoby provedení – pro stanovení velice těkavých analytů se užívá **head-space SPME** (HS-SPME), kdy je vlákno vysunutě nad hladinou vzorku a těkavé látky se nachytají na sorbent. Při extrakci analytů z roztoku se vlákno může ponořit přímo do vzorku (**direct immersion SPME** – DI-SPME) [47].

Jako extrakční vrstva se nejčastěji používá polydimethylsiloxan (PDMS), což je viskózní pružná kapalina, nebo pevný krystalický polyakrylát, který se změní v kapalinu při desorpční teplotě. Oba materiály extrahují analyty absorpcí. Porézní materiály jako jsou PDMS-DVB (divinylbenzen), Carbowax-DVB a Carboxen extrahují analyty na principu adsorpce [48].

Pro možnost přímého napojení na chromatografický či elektroforetický systém byla vyvinuta **in-tube SPME** (SPME v kapiláře či jehle). Tato příprava vzorku využívá otevřenou kapiláru oproti vláknu v klasické SPME. Analyty se extrahují z roztoku do tuhé fáze nanesené uvnitř kapiláry, skrz kterou vzorek opakovaně prochází. Po napojení kapiláry na separační systém (LC, GC, CE) jsou analyty desorbovány a eluovány zavedením mobilní fáze na kapiláru (dynamická desorpce). U látek, které jsou silně adsorbovány na povrch kapiláry, se kapilára máčí v mobilní fázi po delší čas před nástřikem na kolonu (statická desorpce). Aby se zabránilo ucpání kapiláry, je třeba vzorek před extrakcí přefiltrovat [43].

Pro monitorování intravenózní koncentrace léčiv a metabolitů bez potřeby odběru vzorku byla vyvinuta metoda **in vivo SPME**, kdy je sonda zavedena přímo do periferní žíly člověka či zvířete. Extrakce probíhá 2 až 5 minut. Poté je jehla vytažena a napojena na chromatografický systém. Pro tento způsob extrakce jsou koncipovány specifické sondy pro extrakci málo těkavých a netěkavých látek přímo z vodného roztoku, kde je sorbent ukryt v chirurgické jehle (Obr. 8).



Obr. 8 – Uspořádání *in vivo* SPME a komerčně dostupné biokompatibilní SPME zařízení [46]

In vivo SPME zjednodušuje a zkracuje analýzu. Navíc nabízí možnost monitorování dynamických procesů v organismu a sledování rychle metabolizujících a nestabilních analytů. Obrovskou výhodou je i omezení styku s krví operujícím personálem [49].

Trendem SPME do budoucna je rozšiřování stacionárních fází. Již teď jsou dostupné vysoce selektivní kapiláry plněné MIP částicemi (molecularly imprinted polymers). Tyto selektivní materiály předcházejí kontaminaci kapiláry bílkovinami absorbovanými společně s cílovými analyty. Dále lze vlákna pokrýt polymerními iontovými kapalinami či nanomateriály [47].

5.3.1.2. Sorpční extrakce na míchadle (Stir bar sorptive extraction – SBSE)

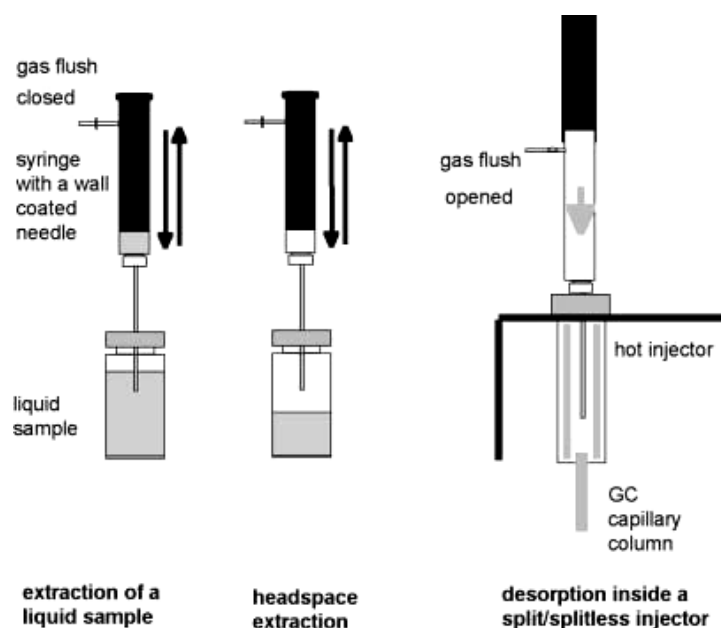
SBSE je další ze zelených technik představená v roce 1999, která je založena na stejném principu jako SPME. Jedná se o mikroextrakční metodu, kdy je magnetické

míchadlo potaženo PDMS [50]. Oproti vláknu má ale míchadlo mnohem větší extrakční účinnost, která je způsobena mnohem větším množstvím naneseného PDMS (vrstva je 0,3-1 mm silná, tj. 50-250x silnější než na vlákně). Extrakce probíhá přímým ponořením míchadla do vodného vzorku. Komerčně dostupné míchadlo Twister® (Gerstel GmbH, Mullheim a/d Ruhr, Německo) se sestává z magnetické tyčinky pokryté skleněným pláštěm s navázaným PDMS o objemu 24-126 μ l. Během míchání se cílové složky navazují na PDMS. Při naplnění sorpční kapacity je míchadlo vyjmuta ze vzorku, analyty jsou desorbovány buď tepelně, nebo rozpouštědlem a poté analyzovány GC nebo LC systémem [51].

Výhodou této metody je možnost obrovské zakoncentrovávací kapacity, jednoduchost provedení a široké spektrum pro použití v environmentální analýze či analýze potravin a biologického materiálu [52]. Tato metoda má ale i svá omezení. Při použití této extrakční metody v biologické matrici, která je velice složitá, může docházet k interferencím pro neselektivnost tohoto postupu. Navíc v bioanalytické oblasti je vzorek omezen na velmi malý objem, který nemusí být dostatečný pro pokrytí stacionární fáze [47]. Další limitací této techniky je její použití pouze pro extrakci nepolárních a semipolárních analytů. Přestože je vyvinuto i několik metod využívající SBSE v biologickém materiálu, je zapotřebí vývoje nových účinných povrchových látek pro rozšíření aplikovatelnosti této metodiky na polární molekuly. SBSE je i extrakční metoda, která může využít vysoce selektivních materiálů (MIPs, materiály s omezeným přístupem – RAM) [51].

5.3.1.3. Dynamická extrakce vzorků na tuhou fázi (Solid phase dynamic extraction – SPDE)

Dynamická extrakce na tuhou fázi je obdobou SPME s tím rozdílem, že se namísto vlákna v injekční jehle používá nerezová jehla vyrobená z kapilární kolony. Hlavní částí zařízení pro SPDE je nerezová jehla o délce přibližně 8 cm, jejíž vnitřní stěna je pokryta filmem PDMS s 10% aktivním uhlíkem o tloušťce 7-50 μ m. Vzorek je dynamicky nasáván do plynotěsné stříkačky (nejčastěji o objemu 2,5 ml) skrz jehlu se sorbentem. Jehla může být buď ponořena do kapalného vzorku (DI-SPDE), či může těkavé analyty vychytávat nad jeho hladinou (HS-SPDE) (Obr. 9) [53].

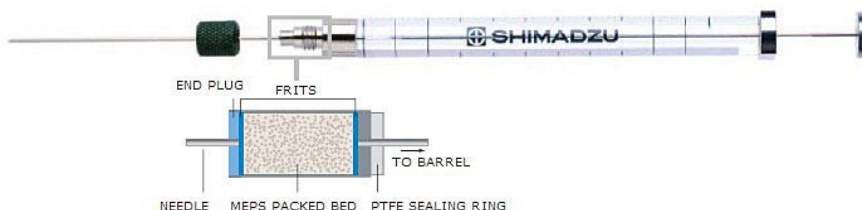


Obr. 9 – Zařízení a princip SPDE [53]

Při srovnání objemu stacionární fáze je v jehle kolem $5,99 \text{ mm}^3$, zatímco SPME vlákno o délce $100 \text{ }\mu\text{m}$ má objem SF pouze $0,94 \text{ mm}^3$. SPDE technika úpravy vzorku je rychlejší a mnohem více mechanicky odolnější oproti křehkému vláknu (životnost SPDE jehly je až 1 500 nástřiků). Může být použita při analýze jak environmentálních tak forenzních a biologických materiálů a navíc může být lehce automatizována [43, 54].

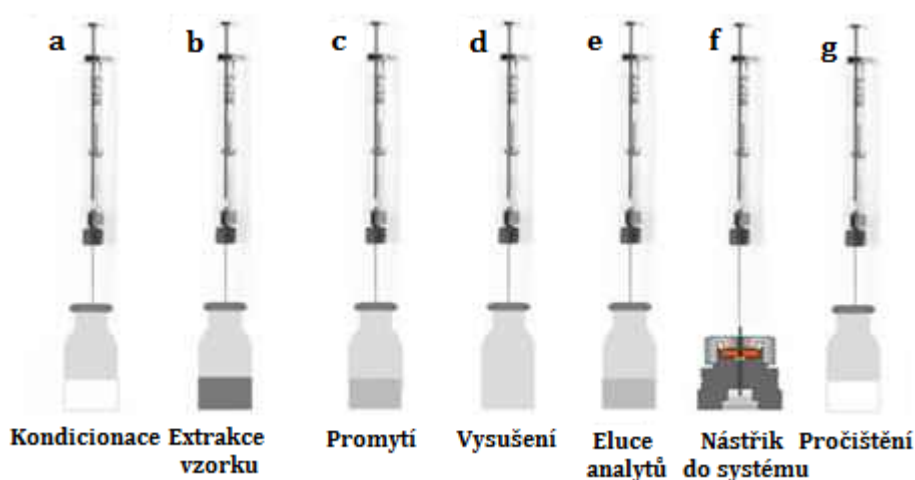
5.3.1.4. Mikroextrakce tuhým sorbentem v mikrostríkačce (Microextraction by packed sorbents – MEPS)

MEPS si nechal patentovat Abdel-Rehim a jeho tým v roce 2003. Je to vlastně miniaturizovaná SPE technika využívající pevný sorbent (1-4 mg) ve formě cartridge mezi vzduchotěsnou stríkačkou o objemu 100-250 μl a jehlou, kdy celé zařízení může být online napojeno na LC, GC nebo CE systém. MEPS výrazně redukuje objem potřebných rozpouštědel a vzorku (10-250 μl). Obrovskou výhodou této metody je také dostupnost velkého množství sorbentů včetně vysoce selektivních materiálů (silikagelové – C2, C8, C18, RAM, HILIC, MIPs).



Obr. 10 – Zařízení na MEPS [55]

Jednotlivé kroky extrakce MEPS jsou shodné s SPE extrakcí (Obr. 11). Prvním krokem je kondicionace sorbentu (a). Tento krok není nezbytný jako u SPE, jelikož množství sorbentu je mnohem menší. Poté se nasaje vzorek (b). Pokud je zapotřebí prekoncentrace analytu, je možné vzorek nasát opakovaně. Poté se vymyjí balastní látky vhodným činidlem a sorbent se vysuší (c, d). Následuje vlastní eluce analytů vhodným rozpouštědlem či mobilní fází (e) a nástřik eluátu do LC nebo GC systému (f). Pro opakované použití sorbentu (až 120 použití) je potřeba ho několikrát promýt vodou a poté elučním činidlem, aby se zabránilo přenosu látek mezi vzorky [56].



Obr. 11 – Schematické kroky MEPS [57]

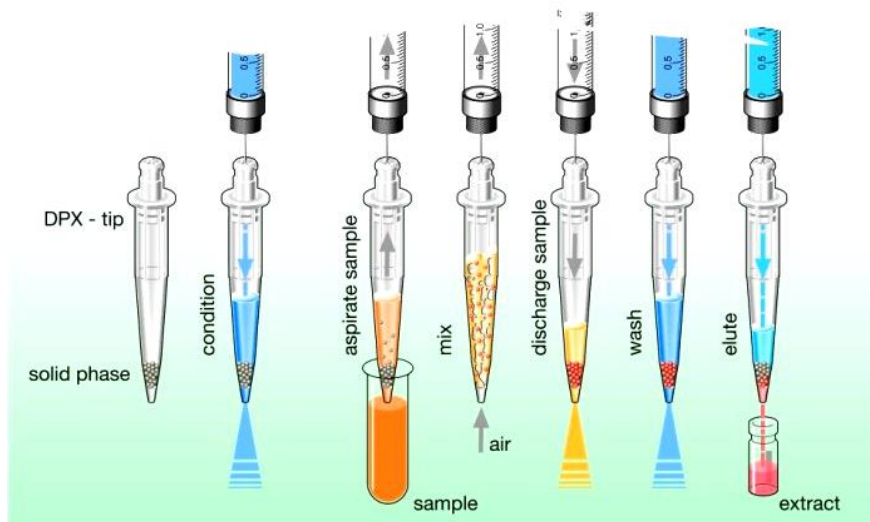
MEPS se s výhodou používá pro analýzu biologického materiálu. Je ale doporučováno, aby se vzorek nejprve zcentrifugoval a poté naředil (až 5x u plazmy, až 25x u vzorků plné krve), aby nedocházelo k ucpání a zvýšenému zpětnému tlaku na sorbentu. Obrovské uplatnění této techniky je zejména monitorování léčiv v bioanalýze (sérum, plazma, moč, sliny). Tato technika se vyznačuje jednoduchostí provedení, univerzálností, možností adaptace na různé analytické systémy či spotřebou malých objemů rozpouštědel a vzorků. Navíc je možné tento způsob extrakce plně automatizovat [58].

5.3.1.5. Extrakce pomocí plněných špiček pipet (Disposable-pipette extraction – DPX)

Tato technika je také založena na SPE, kdy je sorbent umístěn v pipetovací špičce a je z obou stran ohraničen fritou. Komerčně je tato metoda dostupná firmou Gerstel

(Mullheim a/d Ruhr, Německo) a je možné ji automatizovat a online napojit s GC nebo LC systémem.

Po nasátí vzorku do pipetovací špičky je analyt adsorbován a koncentrován na suspenzi sorbentu díky vzduchovým bublinám přítomných v extrahovaném vzorku (zvýšení recovery analytu). Po případném promytí sorbentu je vzorek eluován organickým činidlem do vialky.

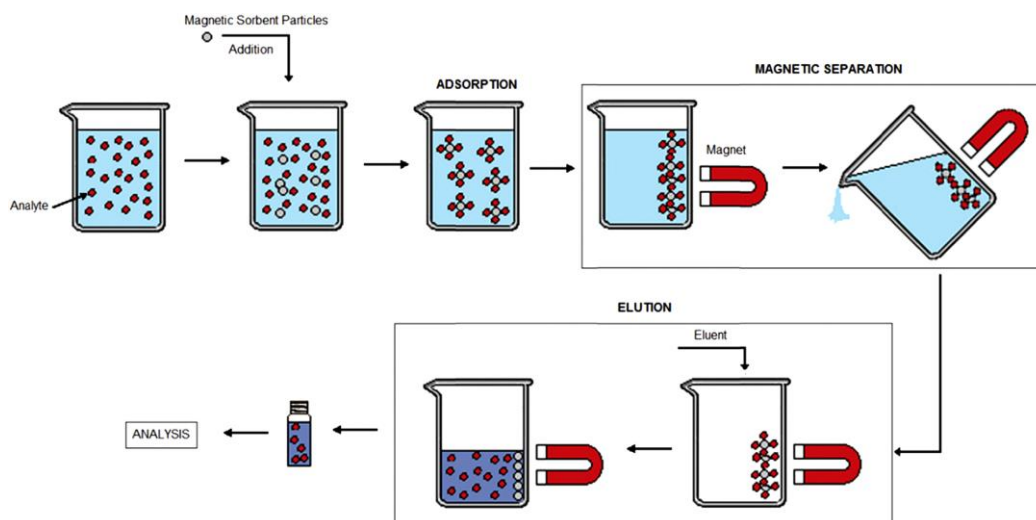


Obr. 12 – Schematické provedení DPX [59]

Částice sorbentu mají velikost 10-20 μm a poskytují velkou povrchovou plochu. Metoda je velice rychlá, k eluci analytu ze sorbentu stačí přibližně 0,5 ml rozpouštědla a množství vzorku potřebného k extrakci je méně než 250 μl . Nevýhodou je komerčně dostupný nízký počet druhů sorbentů (styren-DVB – reverzní fáze, katexové a slabě iontově výměnné materiály) a pouze jedna velikosti špiček o objemu 1 ml [60].

5.3.1.6. Extrakce magnetickou tuhou fází (Magnetic solid phase extraction – MSPE)

Extrakce magnetickou tuhou fází je metoda založená na použití magnetického sorbentu pro zakoncentrování a separaci analytů. Magnetický sorbent je přidán k roztoku vzorku a cílové analyty se adsorbují na povrch magnetických částic. Vlastní oddělení částic sorbentu s navázanými analyty pak probíhá zavedením externího magnetického pole a po eluci vhodným rozpouštědlem se získané látky analyzují (Obr. 13).



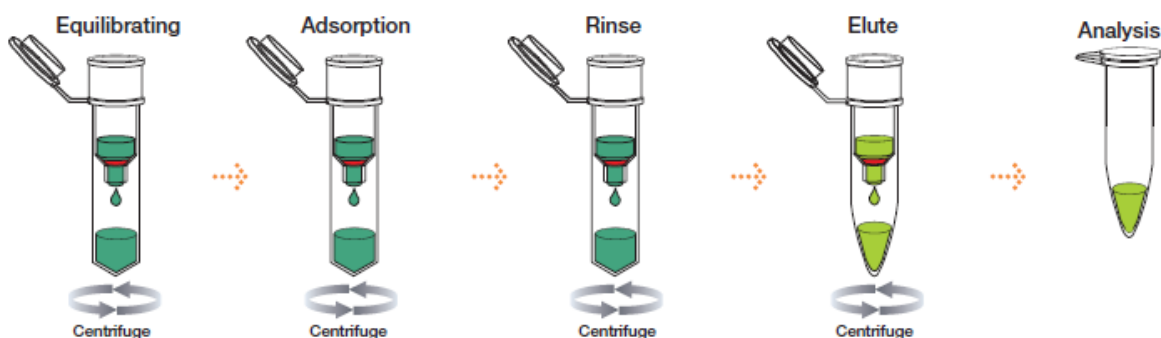
Obr. 13 – Postup magnetické extrakce na tuhou fázi [61]

Magnetické jádro částic je tvořeno železem, kobaltem, niklem a jejich oxidy a je pokryto anorganickým (silikagel, hliník, grafen – tj. supertenká forma uhlíku) nebo organickým (DVB, polyamidy, MIPs) obalem.

V bioanalýze se nejčastěji používají magnetické částice se silikagelovým povrchem a slouží k izolaci a purifikaci biomolekul (bílkoviny, enzymy, peptidy) a izolaci anorganických a organických látek ze vzorků biologického materiálu. Metoda se vyznačuje jednoduchostí a rychlostí celého provedení [62].

5.3.1.7. Rotační extrakce na kolonce (Spin column extraction)

Pro tuto techniku přípravy vzorku se používá rotační kolonka, jejíž součástí je monolitický silikagelový disk, který poskytuje velkou povrchovou plochu k adsorpci žádaného analytu. Veškeré kroky extrakce (nanesení vzorku, promývání, eluce) analytů se provádí centrifugací (Obr. 14) [63].



Obr. 14 – Schéma provedení rotační extrakce na monolitní kolonce [64]

Výhodou této techniky je možnost zpracování většího počtu vzorků současně, jednoduchost provedení a velice nízká spotřeba rozpouštědel a vzorku. Navíc odpadá nutnost využití vakua jako u klasické SPE, což vede k lepší reprodukovatelnosti metodiky. Podmínky extrakce lze ovlivnit pH roztoku vzorku a rotační rychlostí. Ve většině aplikací je využíván monolitický disk C18 [60].

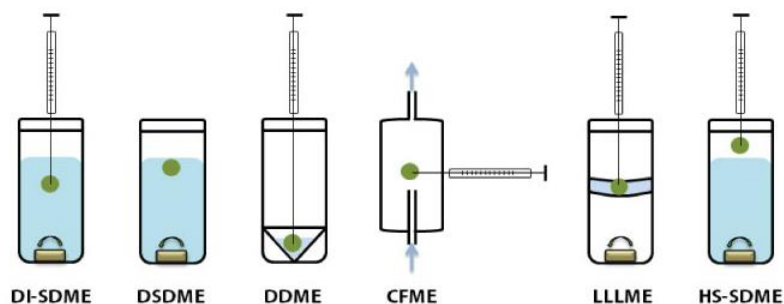
5.3.2. Mikroextrakce kapalnou fází (Liquid phase microextraction – LPME)

Mikroextrakce kapalnou fází je miniaturizovaná LLE procedura využívající pouze mikrolitry rozpouštědel oproti několikanásobně většímu objemu potřebného ke klasické LLE. LPME lze automatizovat a je kompatibilní s GC, LC i CE. Vlastní extrakce probíhá do velice malého objemu s vodou nemísitelného rozpouštědla z vodného roztoku vzorku.

Mezi mikroextrakční techniky patřící do této skupiny jsou mikroextrakce na kapku (single-drop microextraction – SDME), mikroextrakce na duté vlákno (hollow-fibre microextraction – HF-LPME) či disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME) [65].

5.3.2.1. Mikroextrakce na kapce (Single-drop microextraction – SDME)

Metoda byla představena v roce 1996 původně pod názvem extrakce rozpouštědlem na mikropapku či mikroextrakce rozpouštědlem na jedinou kapku. V porovnání s klasickou LLE je spotřeba rozpouštědel snížena o 99 %. Principem této extrakční techniky je rozpuštění cílových analytů v kapce rozpouštědla zavěšené na konci jehly mikrostříkačky. Kapka může být buď ponořená přímo do vzorku (rozpouštědlo nesmí být mísitelné s vodou), jedná o DI-SDME, nebo může být provedena nad hladinou vzorku (HS-SDME). Dalšími možnými variantami je drop to drop mikroextrakce (DDME), mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (liquid-liquid-liquid microextraction – LLLME), mikroextrakce na přímo suspendované kapce (directly-suspended droplet microextraction – DSDME) a kontinuální průtoková mikroextrakce (continuous flow microextraction – CFME) [66]. Způsoby provedení různých módů mikroextrakce na kapce jsou zobrazeny na Obr. 15.



Obr. 15 – Různé způsoby provedení SDME [67]

DI-SDME

Metoda extrakce na kapku jejím přímým ponořením do vzorku je jednoduchá, účinná a levná s malou spotřebou rozpouštědel a vzorku a možností automatizace. Velikost kapky je 0,3 až 3 μl a množství vzorku se pohybuje od 0,3-40 ml. Dále je zapotřebí magnetické míchadlo a stříkačka pro plynovou chromatografii. Kapka extrakčního činidla zavěšena na jehle stříkačky je ponořena do vodného vzorku, který je promícháván pro zlepšení přenosu analytů. Poté je kapka natažena do stříkačky a vstříknuta do chromatografického systému. Jako extrakční činidlo se používá toluen, cyklohexan, chloroform či oktan-1-ol. Použití je omezeno na nepolární a semipolární analyty.

Nevýhodou této techniky je nestálost kapky a to zejména při extrakcích za vyšších teplot či rychlém míchání vzorku. Navíc i částečná rozpustnost extrakčního rozpouštědla ve vodě může vést k její ztrátě. Přesto metoda našla uplatnění ve stanovení léčiv v biologickém materiálu [68].

HS-SDME

Tato technika je vhodná pro stanovení těkavých a středně těkavých analytů. Analyty jsou distribuovány mezi 3 fáze – vodný vzorek, vzduch nad hladinou vzorku a organické rozpouštědlo. Vzorek musí být umístěn ve vzduchotěsné vialce. Oproti DI-SDME je u této metody výhodou především to, že nehrozí ztráta kapky mícháním či jejím rozpuštěním ve vzorku. Navíc je možné použití většího rozsahu rozpouštědel, protože lze použít i látky mísitelné s vodou. Pro extrakci je možné použít oktan-1-ol, tetradekan, ftalátové estery, iontové kapaliny či vodné roztoky. Výhodou je i možnost přidružení derivatizačního činidla do rozpouštědla. Pro zvýšení extrakční účinnosti lze na vzorek aplikovat ultrazvukovou nebo mikrovlnnou energii.

Stejně jako DI mód se HS extrakce vyznačuje nízkou cenou, nízkou spotřebou rozpouštědel a možností automatizace celého procesu [68].

DDME

DDME technika úpravy vzorku je vhodná především pro analýzu vzorků s velice malým objemem. Může se jednat o vzorky plné krve, séra a moči o objemu 7 μl . Výhodou metody je rychlost (5 minut), jednoduchost provedení, nenáročnost na vybavení a extrémně malá spotřeba vzorku a organického rozpouštědla (1 μl). Vlastní provedení extrakce spočívá v naplnění mikrostříkačky organickým rozpouštědlem (1 μl rozpouštědla v 10 μl vzduchotěsné stříkačce), jejím vsunutím do vialky uzavřené septem a vytlačení 0,5 μl extrakčního činidla do vzorku. Po extrakci se kapka zatáhne zpět do jehly a extrahovaný vzorek se nastříkne do detekčního systému. Extrakční činidlo se nesmí mísit s vodou, proto jsou vhodná především nepolární rozpouštědla [69].

LLLME

LLLME je v principu extrakce a zpětná extrakce zároveň vhodná pro ionizovatelné analyty. Byla představena v roce 1998 jako jednoduchá, reprodukovatelná a selektivní metoda využívající organické kapalně membrány zakotvené v teflonovém kruhu [70]. Je založena na extrakci analytu z vodného roztoku do organické membrány s nižší hustotou než má vodný vzorek a zároveň zpětné extrakci do vodné mikrokapky umístěné v této vrstvě. Míchání vodného vzorku má za následek přenos analytů mezi oběma vrstvami. Úpravou pH vodného roztoku získáme nejprve neutrální analyty extrahovatelné do organického rozpouštědla, kde jsou následně ionizovány a extrahovány do kapky. Kapka je poté analyzována na LC či CE systému [71].

DSDME

Extrakční činidlo nemísitelné s vodou se nanese do vodného roztoku vzorku s míchadlem. Když se vzorek s extrakčním činidlem promíchává, začnou se vyvářet jednotlivé kapičky extrakčního činidla, které se poté spojí v jedinou kapku na hladině vodného vzorku. Míchání tak zvyšuje přenos hmoty mezi vzorkem a činidlem. Vzniklá kapka se poté odsaje a aplikuje do chromatografického systému [72].

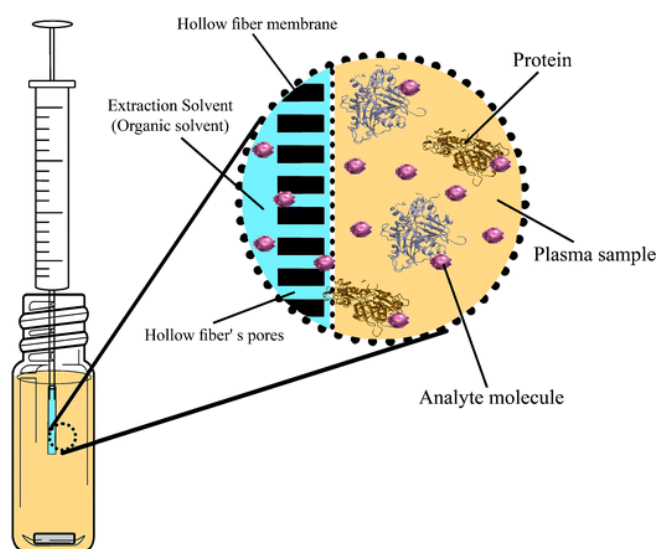
CFME

Technika byla poprvé představena a popsána v roce 2000. Do skleněné komory o objemu cca 0,5 ml je zavedena kapka rozpouštědla (1-5 μl) umístěna na jehle mikrostříkačky. Vzorek protéká skleněnou komorou a do kapky se extrahují cílové analyty. Tato extrakční technika má obrovský koncentrační faktor (rozpouštědla xylen, *n*-butyl acetát), proto je schopná zachytit analyty o koncentraci femtogram/mililitr. Čím

delší je doba extrakce, tím větší výtěžek lze očekávat. Při malém objemu vzorku lze recyklovat protékající vzorek namísto do odpadu zpět do vialky [73].

5.3.2.2. Mikroextrakce na dutém vlákně (Hollow-fibre liquid phase microextraction – HF-LPME)

Nevýhody volného umístění kapky v roztoku může vyřešit použití kapalného extrakčního rozpouštědla naneseného na porézní polopropustnou membránu (Obr. 16). Metodu poprvé představili Rasmussen a Pedersen-Bjergaard v roce 1999, kteří použili duté vlákno jako nosič pro oktan-1-ol při extrakci metamfetaminu z biologického materiálu [74].

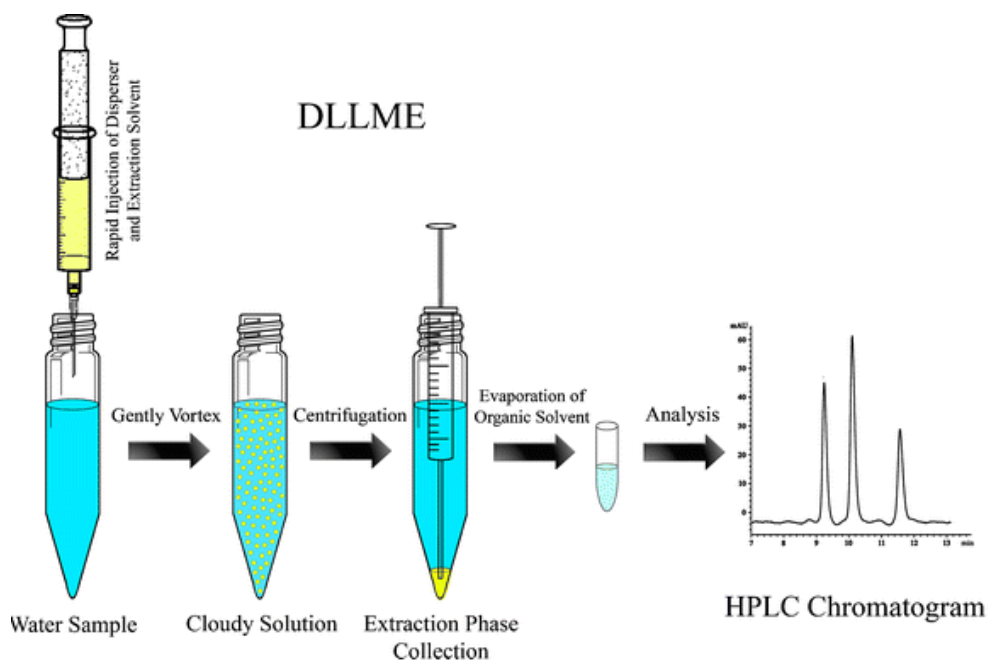


Obr. 16 – Schematický diagram HF-LPME [75]

Porézní propylenové duté vlákno chrání a stabilizuje extrakční činidlo a navíc zvětšuje povrch mezi rozpouštědlem a vodným vzorkem, a tím zvyšuje účinnost extrakce. Duté vlákno se před extrakcí namočí na několik sekund do organického rozpouštědla, kde prostupuje jeho póry a je vázáno kapilární silou k polypropylenové síti. Vytvoří se tak podpůrná kapalinová membrána. Vlákno je poté ponořeno do vodného vzorku. Analyty se extrahují do imobilizovaného extrakčního činidla. Extrakční činidlo se poté odsaje mikrosříkačkou a vstříkne se do chromatografického systému. Pokud je extrakčním činidlem pouze organické rozpouštědlo, jedná se poté o dvoufázový extrakční systém. Ten lze provést buď v HS nebo DI módu. Analyty se také mohou extrahovat z vodného roztoku vzorku přes tenkou (několik μl) vrstvu organického rozpouštědla imobilizovaného póry vlákna do akceptorového roztoku v lumen dutého vlákna, který může mít i vodný charakter. Pak se jedná o třífázový extrakční systém, který je prováděn pH gradientem, transportními přenašeči nebo elektromembránovou extrakcí [76].

5.3.2.3. Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (Dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME)

Disperzní mikroextrakce byla představena Assadim a jeho kolektivem v roce 2006 [77]. Od té doby se tato metodika dostala do širokého použití k úpravě vzorků z environmentální, potravinové a bioanalytické oblasti. Principem této techniky je použití extrakčního činidla nemísitelného s vodou (chlorbenzen, chloroform, sirouhlík) a disperzního činidla (methanol, acetonitril, aceton), které je mísitelné jak s vodou, tak s extrakčním činidlem. Když se směs extrakčního a disperzního činidla rychle vstříkne do vzorku v kónické zkumavce, vzniká vysoká turbulence a vytváří se oblak rozpouštědel. Díky velké povrchové ploše mezi extrakčním činidlem a vodným vzorkem je rychle dosaženo rovnovážného stavu. Po centrifugaci se sediment rozpouštědel odsaje a nastříkne se do LC nebo GC systému (Obr. 17).

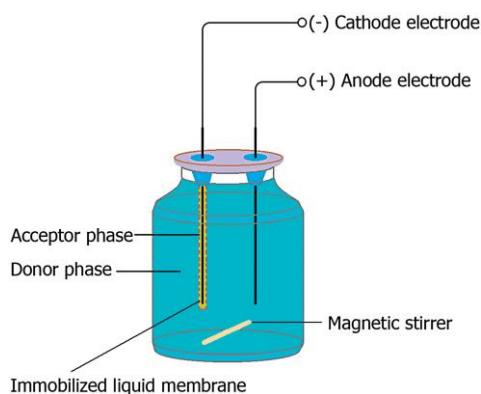


Obr. 17 – Schematický postup DLLME [78]

Výhodou DLLME je jednoduchost, rychlost, nízké náklady na provedení, vysoká výtěžnost a možnost zakoncentrování analytu. Organická extrakční rozpouštědla jsou vybírána na základě jejich hustoty (vyšší hustota než voda), extrakční schopnosti cílových analytů a chromatografických vlastností [79].

5.3.2.4. Elektromembránová extrakce (Electrokinetic membrane extraction – EME)

O EME se poprvé zmínil Pedersen-Bjergaard. Principem je umístění jedné elektrody k dutému vláknu s extrakčním činidlem a druhé do vodného roztoku vzorku. Poté se aplikuje elektrický proud. Nabité analyty ve vzorku jsou přitahovány skrz podpůrnou kapalnou membránu k opačně nabitě elektrodě v akceptorovém roztoku, odkud jsou po extrakci odsáty mikrostríkačkou a aplikovány do separačního systému. Hnací silou extrakčního procesu je elektrické pole.



Obr. 18 - Schéma EME [80]

I přes složitost biologické matrice je tato metoda aplikovatelná na extrakci analytů z biologického materiálu. Většina endogenních látek v séru či moči je efektivně blokována umělou kapalinovou membránou. EME je vysoce selektivní metoda poskytující velice čisté extrakty [81].

5.4. STANOVOVANÉ VITAMÍNY

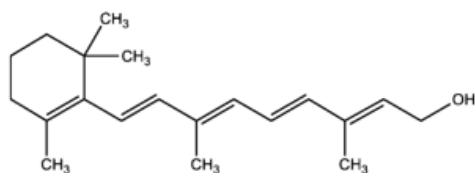
Objevení vitamínů se datuje do roku 1905, kdy Cornelius Adrianus Pekelharing zjistil, že zvířata krmená pouze bílkovinami, sacharidy, anorganickými solemi a vodou prospívají pouze tehdy, když se přidá do stravy malé množství mléka. Z toho vyvodil, že právě mléko obsahuje prozatím nepoznanou látku nezbytnou pro jejich normální růst a vývoj [82]. Kazimierz Funk pak v roce 1911 provedl pokusy na holubech s projevy nemoci odpovídající lidské beri-beri (nemoc z nedostatku vitamínu B₁). Zjistil, že extrakt z neloupané rýže obsahuje látky, které v extraktu z loupané rýže chybí. Předpokládal, že chybějící látka není ani bílkovina a ani aminokyselina. Izoloval frakci ze slupek rýže, která obsahovala „stopový prvek“, jež mohl za uzdravení postižených holubů. Tuto frakci nazval vitamín (vita – život, amin – látka obsahující dusík) [83]. Přestože se později ukázalo, že se nejedná o aminy, název se ujal a byl použit pro mnoho dalších látek nalézajících se v potravě.

Vitamíny jsou esenciální nízkomolekulární organické sloučeniny nezbytné pro normální chod organismu, kde působí jako antioxidanty, hormony, přenašeči H⁺/e⁻ a koenzymy. Vitamíny jsou v organismu přítomny v nízkých koncentracích a tělo si je nedokáže vytvářet v dostatečných dávkách.

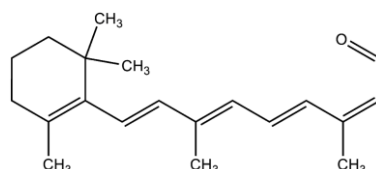
Vitamíny jsou ve většině případů skupinou chemicky příbuzných látek s podobnou biologickou aktivitou. Jsou rozdělovány na základě jejich rozpustnosti – vitamíny rozpustné ve vodě (skupina vitamínů B, vitamín C, biotin) a vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K). Jejich nedostatek – hypovitaminóza – vede k poruchám funkcí organismu a k velmi vážným onemocněním (např. kurděje – nedostatek vitamínu C, křivice – nedostatek vit. D, pellagra – nedostatek niacinu). V nejvíce ohrožené skupině z nedostatku vitamínů jsou těhotné ženy, kojenci a malé děti, staří lidé a lidé s nesprávnou výživou [84].

5.4.1. Vitamín A

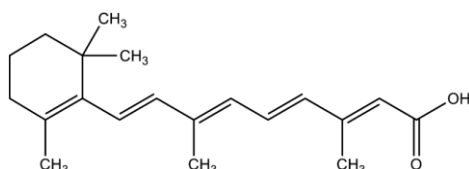
I když se pojem vitamín A odkazuje specificky na *all-trans* retinol (Obr. 19), je také užíván jako generický název pro isoprenoidní sloučeniny vykazující biologickou aktivitu retinolu. Ten se oxidační reakcí mění na své nejaktivnější deriváty – retinal (retinaldehyd) (Obr. 20) a kyselinu retinovou (Obr. 21). Všechny přírodní a syntetické látky vykazující aktivitu vitamínu A jsou kolektivně nazývány jako retinoidy [85].



Obr. 19 - Retinol



Obr. 20 - Retinal



Obr. 21 - Kyselina retinová

Poprvé se o vitamínu A zmiňuje McCollum a Davis v roce 1913 jako o látce obsažené v másle a vaječném žloutku, která je rozpustná v tuku a potřebná pro normální růst a vývoj u potkanů. Zmiňují také rozdíl fyziologických vlastností čerstvého a vařeného jídla v prevenci nemocí jako jsou kurděje či beri-beri [86].

Vitamín A hraje nezastupitelnou roli v mnoha fyziologických procesech. Nejvíce je známa jeho role ve vidění. Dále je nezbytný pro normální vývoj embrya a vznik základů jednotlivých orgánů u plodu, vyžívání imunitního systému, buněčnou proliferaci, udržení epitelální integrity, pro paměť a tvorbu nových neuronů [87].

Vitamín A je v přírodních látkách přítomen v mnoha různých formách. V živočišných tkáních se vyskytuje ve formě retinoidů. U rostlin pak ve formě karotenoidů, které jsou provitamínem A. Zdrojem retinolu je vaječný žloutek, hovězí játra, rybí tuk, mléko a mléčné výrobky. Na β -karoten je bohatá mrkev, červená paprika, dýně či broskev [84].

Většina přijímaného vitamínu v potravě je ve formě retinylových esterů. Ty jsou hydrolyzovány v lumen tenkého střeva za vzniku retinolu. Tento proces se odehrává na kartáčovém epitelu a je katalyzován hydrolázami produkovanými slinivkou. β -karoten na rozdíl od retinoidů může být enterocyty převeden na retinal či jimi být absorbován a v plazmě pak navázán na chylomikrony. Retinol je v plazmě navázán na retinol-vázající

protein (retinol-binding protein – RBP4) a kyselina retinová je navázána na albumin. Malé množství retinylových esterů může být navázáno na lipoproteiny. Hlavním místem pro uložení retinoidů v těle jsou játra. V očích, plicích, tukové tkáni, varlatech a slezině jsou také uloženy, ale v mnohem menší koncentraci ve srovnání s játry [88].

Vitamín A má nezastupitelnou roli v mnoha biologických procesech. Zatímco retinal je esenciální pro vidění, retinol se uplatňuje v imunitních reakcích či reprodukci. Základem naší vize je fotochemická izomerace retinalu z *cis*- na *trans*-konfiguraci. Foton viditelného světla nese dostatečné množství energie způsobující izomeraci chromoforu z 11-*cis*- na 11-*trans*-retinal. *Trans*- izomer se uvolní do cytoplazmy a naváže se na rhodopsin, což je transmembránový protein citlivý na světlo a nachází se na tyčinkách sítnice oka. Ten vyvolá biochemickou dráhu směřující ke vzniku nervového impulsu a představuje tak základní princip vidění [89]. Mezi další funkce retinoidů patří ovlivňování buněčné diference a proliferace. Mohou regulovat transkripci a tvořit kovalentní vazby s některými proteiny, které modifikují vlastnosti cílové bílkoviny a tím i její aktivitu. V reprodukčním systému hraje vitamín A esenciální roli u mužů i žen, kdy jeho nedostatek může vést k infertilitě. U žen je nezbytný k uhníždění vajíčka v děloze a správný vývoj plodu až po narození životaschopného novorozence. Navíc má stimulační účinek na produkci progesteronu. U mužů se vitamín A podílí na regulaci funkce varlat. Jeho nedostatek vede k zastavení spermatogeneze a nepříznivě ovlivňuje produkci testosteronu. Během těhotenství je vitamín A přenášen k plodu přes placentu. Krom jeho esenciální role v růstu a buněčné diferenciaci buněk plodu má nezastupitelnou úlohu ve vývoji plic, srdce a kostry [90]. Studie ukazují i na roli vitamínu A v nádorové aktivitě, kdy inhibuje růst a vývoj různých druhů nádorů, jako například nádory kůže, prsu, ústní dutiny, plic, jater, prostaty a močového měchýře [91]. V imunitním systému se vitamín A podílí na regeneraci slizničních bariér a je zapotřebí v získané (též adaptivní či specifické) imunitě, kde participuje ve vývoji pomocných T-lymfocytů a B-lymfocytů, které produkují protilátky [92]. Vitamín A má své uplatnění i v dermatologii, kde má výrazný vliv na diferenciaci epidermis, ovlivňuje produkci keratinu a inhibuje produkci mazu vedoucí ke vzniku akné [93].

Fyziologická hodnota retinolu v plazmě je 1-2 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace pod 0,7 $\mu\text{mol/l}$ už svědčí pro jeho nedostatek v organizmu. Nedostatek nastává tehdy, jsou-li vyčerpány i veškeré zásoby retinolu v játrech. Tento stav může být způsoben buď jeho nedostatečným příjmem v potravě nebo chronickou poruchou enterické absorpce lipidů (cystická fibróza, pankreatitida). Hypovitaminóza se projevuje šeroslepostí tj. zhoršeným

viděním za nedostatku světla, náchylností k infekcím a poruchou diferenciací buněk, vývoje orgánů, růstu a rozmnožování. Dalšími příznaky jsou ztráta chuti, opožděný růst, zvýšený tlak nitrolební tekutiny a zvýšená keratinizace. U těhotných způsobuje nedostatek vitamínu A šeroslepost a zvýšenou úmrtnost plodu [85].

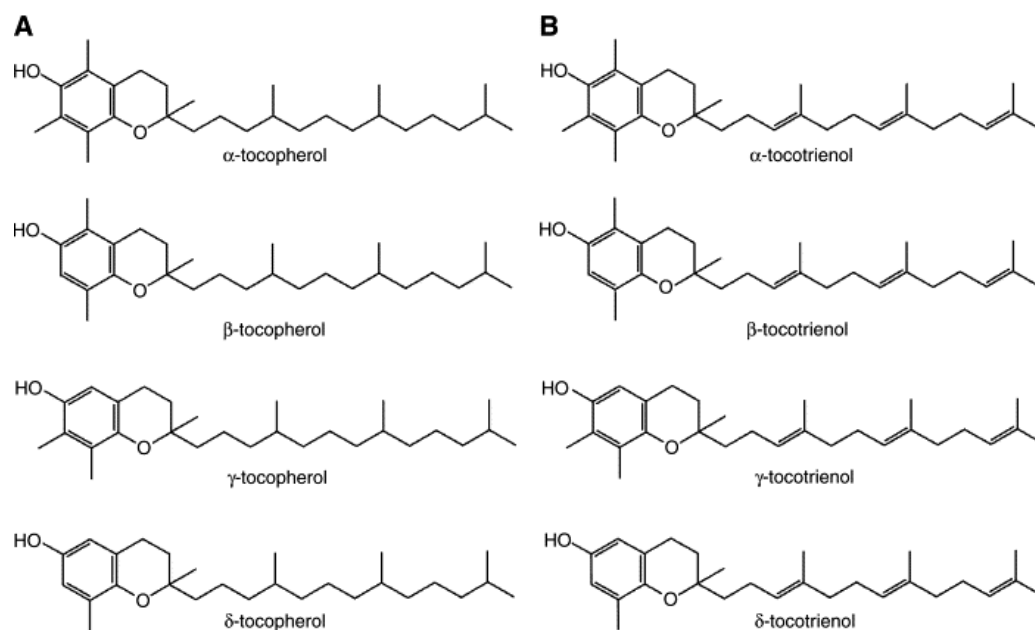
Vitamín A má tendenci ke kumulaci v organizmu. Hrozí tedy riziko hypervitaminózy především z důvodu jeho pomalého odbourávání a velkých skladovacích kapacit ve tkáních. Toxicita může být buď akutního, nebo chronického charakteru. Akutní toxicita se projeví v rámci hodin (maximálně 48 hodin) po předávkování. Chronická toxicita se objeví za několik týdnů, měsíců či let po konzumaci vyšších dávek, které ale nejsou akutně toxické. Mezi příznaky hypervitaminózy patří zvracení, průjem, dvojité vidění, suchost sliznic, únava, bolesti hlavy, bolest a kostní abnormality, svalová ztuhlost a bolestivost, kožní vyrážka, křehké nehty, hepatomegalie a hepatotoxicita [94]. Byly také zaznamenány případy předávkování β -karotenem, které vyúsťuje v karotenémii. Ta se projevuje žluto-oranžovým zabarvením kůže. Na rozdíl od nemocí jater, skléra očí byla zabarvena normálně. Může být způsobena nadměrným konzumováním mrkve či jiného ovoce a zeleniny bohaté na β -karoten a další karotenoidy [95]. Kyselina retinová je teratogenní. Při jejím nadměrném užívání v těhotenství se mohou u plodu vyvinout malformity včetně rozštěpu rtu či patra. Těhotné ženy by se tedy měly během prvního trimestru vyhnout konzumaci jater, což je nejbohatší zdroj vitamínu A [96].

5.4.2. Vitamín E

Vitamín E je liposolubilní vitamín nezbytný pro správné fungování těla, které si jej nedokáže samo vytvořit, a proto musí tento vitamín přijímat v potravě. Vyznačuje se především antioxidačními, neuroprotektivními a protizánětlivými vlastnostmi.

Vitamín E reprezentuje skupinu přírodních látek vyskytujících se celkem v 8 různých izoformách – 4 nasycené analogy nazývané tokoferoly (α , β , γ , δ) a 4 nenasycené analogy nazývané tokotrienoly (α , β , γ , δ), které regulují peroxidační reakce a kontrolují produkci volných radikálů v těle. Všem osmi sloučeninám se souhrnně říká tokoly. Tokotrienoly se strukturně liší od tokoferolů přítomností třech dvojitých vazeb v uhlovodíkovém řetězci (Obr. 22). Zatímco tokoferoly a jejich účinky a vlastnosti jsou rozsáhle studovány, o tokotrienolech se ví jen málo, přestože mají odlišný terapeutický účinek od tokoferolů. Jejich protizánětlivá a cholesterol-snižující schopnost může předcházet vzniku rakoviny, diabetu či kardiovaskulárním a neurodegenerativním onemocněním [97].

Nejúčinnějším tokoferolem je *R,R,R*- α -tokoferol, který je používán i jako mezinárodní standard aktivity vitamínu E. Ostatní tokoferoly mají malou biologickou účinnost. Oxidační aktivita spočívá v reaktivitě fenolického vodíku a schopnosti chromanolového kruhu stabilizovat nepárový elektron. Nejdříve vzniká tokoferoxylový radikál, který dále reaguje s druhým peroxylovým radikálem za vzniku nereaktivního tokoferylchinonu [98].



Obr. 22 – Struktura tokoferolů (A) a tokotrienolů (B)

Tokoferoly jsou syntetizovány fotosyntetickými organizmy včetně vyšších rostlin. Proto jsou hlavním zdrojem vitamínu E rostlinné oleje. Tokoferoly se nacházejí v olivovém, slunečnicovém (α -tokoferol), sójovém (δ -tokoferol) či kukuřičném (γ -tokoferol) oleji. Na tokotrienoly jsou bohaté rýžové otruby, ječmen či palmový olej [99]. Dalšími zdroji jsou ořechy, vaječný žloutek, sýr, sójové boby, avokádo, olivy či pšeničné klíčky.

Vitamín E se absorbuje především z tenkého střeva. Tento proces vyžaduje přítomnost tuku i pankreatických esteráz, které uvolňují volné mastné kyseliny z triglyceridů přijímaných v potravě. Jsou nezbytné i žlučové kyseliny, které tvoří směsné micely a esterázy pro hydrolytické štěpení tokoferylových esterů. Jedinci, kteří nejsou schopni produkovat pankreatické a žlučové šťávy (pacienti s obstrukcí žlučových cest, jaterní cholestázou, pankreatitidou, cystickou fibrózou), mají pak zhoršenou absorpci vitamínu E a dalších živin rozpustných v tucích, které jsou závislé na micelami zprostředkované difúzi pro vstřebání do organismu. Pokud se užívá vitamín E ve formě

vitamínových doplňků, měl by se vždy podávat s jídlem, aby došlo k jeho správnému vstřebání.

Na rozdíl od vitamínu A vitamín E v plazmě nemá specifický přenašeč. Namísto toho je převeden z chylomiker do plazmatických lipoproteinů, a to jak do lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), tak i lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL). Plazmové tokoferoly jsou tak rozděleny mezi tyto tři třídy lipoproteinů, kde jsou nespecificky vázány.

Hlavní funkcí vitamínu E v těle je jeho antioxidační schopnost, kdy udržuje integritu membrány prakticky ve všech buňkách těla. Jako antioxidant redukuje volné radikály a tím chrání buňky před škodlivými účinky vysoce reaktivních oxidačních látek. Dále se zjistilo, že α -tokoferol moduluje funkci T-lymfocytů, redukuje produkci prozánětlivého mediátoru prostaglandinu E₂ a dalších prozánětlivých mediátorů aktivovaných monocytů a makrofágů. Snižuje také plazmatickou hladinu zánětlivého markeru C-reaktivního proteinu (CRP) [84]. Výzkumy ukázaly, že vitamín E hraje svou roli ve fertilizační schopnosti mužů i žen [100]. Vitamín E má pozitivní efekt v redukcii aterosklerotické progresu u pacientů s bypassem koronárních arterií, kteří nebyli léčeni hypolipidemiky. Přestože intervenční klinické zkoušení nepotvrdilo kardiovaskulární benefit suplementovaného vitamínu E, klinická studie využívající směs tokotrienolů a α -tokoferolu prokázala trend zlepšení arteriální compliance (tj. vlastnost cévní stěny umožňující tlumit amplitudu pulsové vlny) po dvouměsíční suplementaci touto směsí. Dále byl studován efekt vitamínu E na rakovinu. Výzkumy zaměřené na vitamín E prokázaly rozdílnou funkci α -, γ - a δ -tokotrienolu ve srovnání s α -tokoferolem během protinádorové aktivity, kdy se projevují antiproliferativní a apoptickou aktivitou proti normálním a nádorovým buňkám. Tokotrienoly inhibují maligní proliferaci závislou na zvýšené aktivitě HMG-CoA reduktázy, kde tokotrienoly tuto aktivitu potlačují [101]. Účinky volných radikálů se projevují v etiologii neurodegenerativních onemocnění jako např. Alzheimerova choroba. Přestože se podávání vitamínů E neukázalo mít účinek v prevenci vzniku demence či Alzheimerovy choroby, studie využívající suplementaci pouze α -tokoferolem prokázala oddálení a prevenci diagnózy Alzheimerovy choroby u starších lidí vykazujících mírné kognitivní postižení [102].

Nedostatek vitamínu E v organizmu je způsoben buď jeho nedostatečným příjmem z potravy, nebo jeho narušenou absorpcí. První zmínky jeho nedostatku byly popsány v 60. letech 20. století u pacientů s lipoproteinovými abnormalitami s následným malabsorpčním syndromem [103]. Přestože se projevy nedostatku vitamínu E

mezidruhově liší, je jeho deprivací postížen především neurosvalový, vaskulární a reprodukční systém. Nedostatek se manifestuje membránovou dysfunkcí vedoucí k oxidační degradaci polynasyčených membránových fosfolipidů a následně k narušení rozhodujících buněčných procesů [84]. Další projevy zahrnují pigmentovou retinopatii, poruchu hybnosti, zpomalené reflexy, ztrátu propriocepce, ztrátu citlivosti v prstech a parestezii. U dospělých se symptomy rozvíjejí přibližně po 10 – 20 letech malabsorpce v závislosti na množství vitamínu E naakumulovaného v organismu [104].

Přestože je organismus schopen tolerovat i vysoké dávky vitamínu E, který je navíc i jedním z nejméně toxických vitamínů, může se při jeho nadměrném užívání vyvinout toxicita. Vysoké dávky vitamínu E pak působí proti ostatním v tucích rozpustným vitamínům. Mezi příznaky hypervitaminózy E patří bolesti hlavy, únava, nevolnost, dvojité vidění, svalová slabost a bolesti zažívacího traktu. Vysoké hladiny vitamínu E inhibují vitamín K dependentní karboxylace, což má za následek zhoršenou mineralizaci kostí. U pacientů užívajících antikoagulantia (např. warfarin) se prodlužuje protrombinový čas, který může vyústit ve zvýšenou krvácivost [84, 105].

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1. POROVNÁNÍ KOLON PRO UHPLC STANOVENÍ RETINOLU A α -TOKOFEROLU V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU

Cílem této práce bylo porovnat různé druhy stacionárních fází pro rutinní stanovení retinolu a α -tokoferolu v lidském séru a mateřském mléce na UHPLC systému. V bioanalytických laboratořích je kladen důraz jak na rychlost, tak na ekonomickou stránku analýzy. Pro porovnání jsme zvolili částicové a monolitické stacionární fáze o různé délce a velikosti částic s cílem vybrat kolonu s nejlepšími parametry pro zamýšlené využití.

6.1.1. Přístrojové vybavení a chemikálie

6.1.1.1. Chromatografický systém

Analýzy byly prováděny na UHPLC systému Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Součástí sestavy je autosampler Rack changer II pro mikrotitrační destičky, degaser DGU-20A3 a autosampler na vialky SIL/30AC (objem nástřiku 0,1 – 50,0 μ l). Mobilní fáze je poháněna dvěma pumpami LC30-AD (rozsah průtoku 0,0001 – 5,0 ml). Kolonový termostat CTO-20 AC lze nastavit na teploty v rozsahu teplot 4 – 85 °C. Analyty byly detekovány fluorescenčním detektorem RF-20AXS. Chromatografický systém komunikuje s počítačem komunikačním modulem CBM-20A. Celá sestava je pak řízena softwarem LabSolution, verze 5.30.

6.1.1.2. Laboratorní vybavení

Při přípravě standardních roztoků a vzorků byly použity analytické váhy Sartorius ME5-0CE (Sartorius AG, Goettingen, Německo), stolní třepačka LabDancer V (IKA, Staufen, Německo), horizontální laboratorní třepačka LT1 (Kavalier, Sázava, Česká republika), termostat Stericell (BMT, Brno, Česká republika), centrifuga Eppendorf 5810-R (Hamburk, Německo) a laboratorní vakuová odparka Eppendorf concentrator 5301 (Hamburk, Německo).

6.1.1.3. Použité chemikálie

Pro přípravu standardních roztoků byly použity následující látky:

- ✓ Retinol, $\geq 97,0\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ (\pm)- α -Tocopherol, synthetic, $\geq 96\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Při přípravě standardních roztoků, vzorků před analýzou a jako mobilní fáze byla použita tato rozpouštědla:

- ✓ n-hexan 96%, multisolvent HPLC grade (Merck, Darmstadt, Německo)
- ✓ Hydroxid draselný – peletky, pure Ph. Eur (AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo)
- ✓ Kyselina L-askorbová p. a. (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ Ethanol absolute (Merck, Darmstadt, Německo)
- ✓ Ethanol denaturovaný 5% methanolem (Lachema, Brno, ČR)
- ✓ Methanol Super Gradient (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- ✓ Deionizovaná voda, Ultrapure water system (Goro, Praha, ČR) – připravena v laboratoři metodou reverzní osmózy a filtrace

6.1.2. Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok retinolu byl připraven rozpuštěním přesného množství naváženého standardu v odměrné baňce methanolem o výsledné koncentraci 1 mmol/l.

Pro primární rozpuštění přesně naváženého množství α -tokoferolu byl použit *n*-hexan. Roztok s koncentrací 2 mmol/l byl dále rozředěn methanolem na zásobní roztok o koncentraci 0,5 mmol/l.

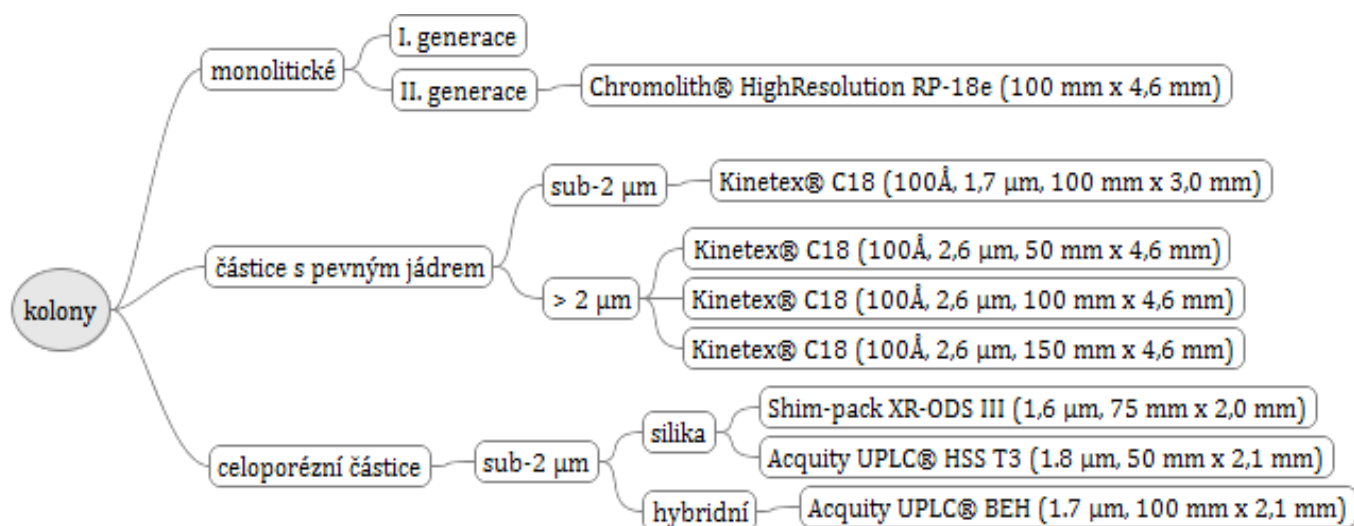
Koncentrace pracovních roztoků použitých při porovnání kolon byla 2,5 $\mu\text{mol/l}$ pro retinol a 12,5 $\mu\text{mol/l}$ pro α -tokoferol.

Zásobní roztok retinolu byl uchován při $-25\text{ }^\circ\text{C}$, zásobní roztok α -tokoferolu při $+4\text{ }^\circ\text{C}$ a směsný standardní pracovní roztok při $-25\text{ }^\circ\text{C}$. Stabilita takto připravených a uchovaných roztoků byla 6 měsíců.

6.1.3. Chromatografické podmínky

Pro porovnání byly vybrány stacionární fáze C18 plněné rozdílnými typy částic – kolony s celoporézními částicemi a částicemi s pevným jádrem (core-shell) a také monolitické kolony. Jednotlivé kolony se lišily v délce, průměru i velikosti částic stacionární fáze. Přehled použitých kolon je uveden na Obr. 23.

Jako mobilní fáze byl zvolen 100% methanol na základě vlastních zkušeností z dříve vyvinutých metod pro dané analyty [106-108]. Analýzy byly prováděny při teplotách 25 °C a 50 °C. U kolon Acquity HSS T3 a Shim-pack byla použita teplota pouze 45 °C z důvodu doporučení maximální operační teploty výrobcem. Objem nástřiku analyzovaného vzorku na kolonu byl u všech měření 1 μ l.



Obr. 23 – Použité kolony

6.1.4. Výsledky

Vybrané kolony byly testovány se záměrem nalézt optimální řešení pro rutinní stanovení hladin retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu, séru a mateřském mléce. Z porovnávaných parametrů byly nejdůležitějšími účinnost kolony, rozlišení a rychlost analýzy. Veškeré výpočty byly prováděny podle USP.

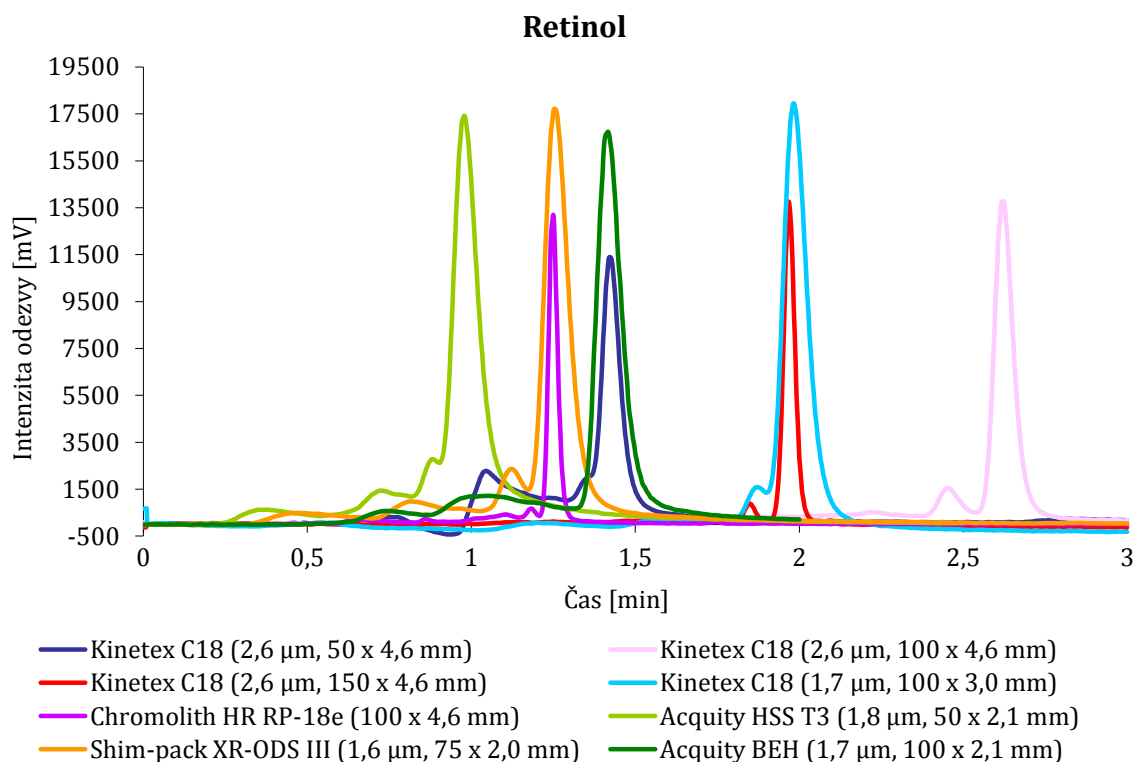
První porovnání naměřených dat bylo podle nejvyšší účinnosti kolony. Účinnost byla vypočítána jako počet teoretických pater na metr, jelikož při testování byly použity kolony o různé délce. Podmínky separace a hodnoty naměřených dat jsou uvedeny v Tabulka 2. Chromatogramy jsou pak znázorněny na Obr. 24.

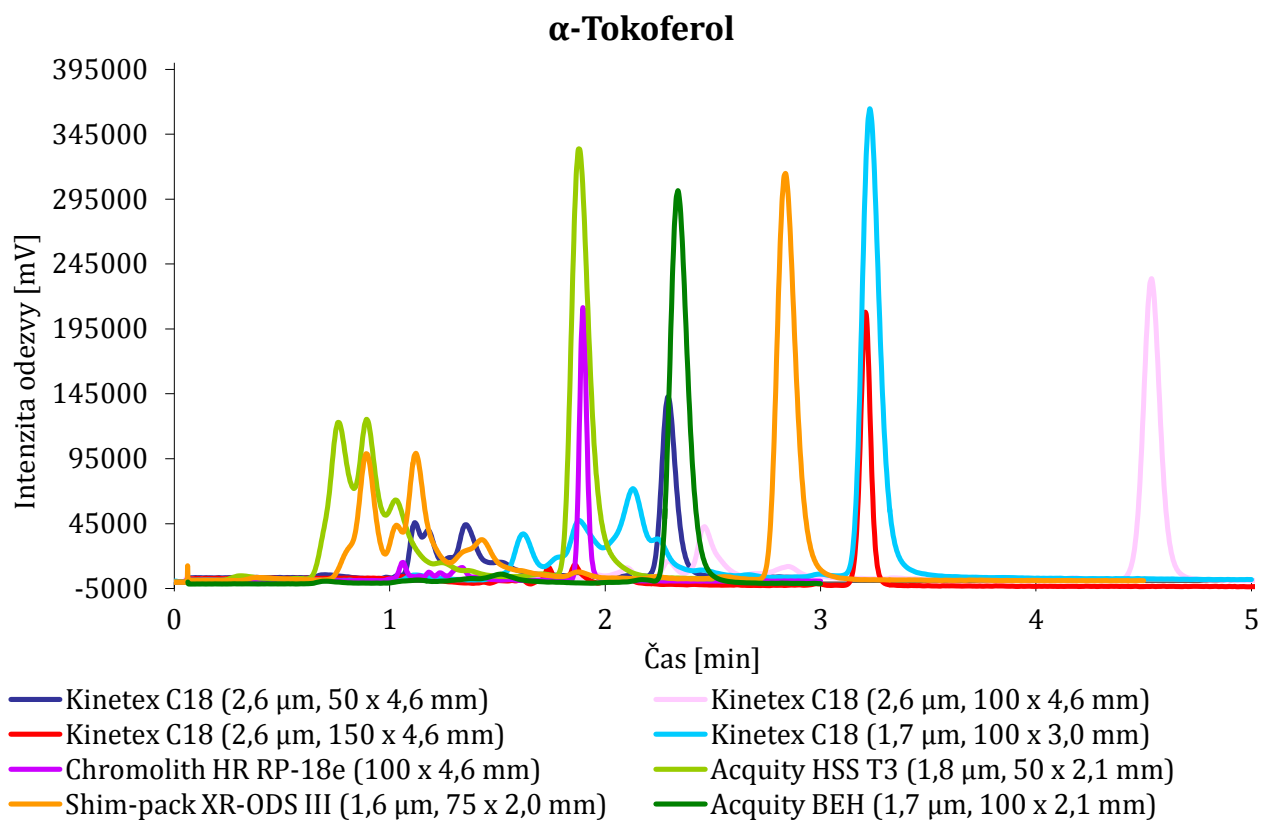
kolona	průtok (ml/min)	T (°C)	retinol		α-tokoferol	
			R _t (min)	N/m	R _t (min)	N/m
Kinetex C18 (2,6 μm, 100 x 4,6 mm)	0,5	50	2,62	89 650	4,54	148 740
Kinetex C18 (2,6 μm, 150 x 4,6 mm)	1,0	50	1,97	93 307	3,21	134 093
Chromolith HR RP-18e (100 x 4,6 mm)	1,5	50	1,25	82 910	1,90	131 870
Kinetex C18 (2,6 μm, 50 x 4,6 mm)	0,5	50	1,43	59 720	2,32	101 000
Shim-pack XR-ODS III (1,6 μm, 75 x 2,0 mm)	0,3	45	1,25	18 240	2,84	65 396
Kinetex C18 (1,7 μm, 100 x 3,0 mm)	0,3	50	1,98	38 730	3,19	62 310
Acquity HSS T3 (1,8 μm, 50 x 2,1 mm)	0,3	45	0,97	20 740	1,83	43 740
Acquity BEH (1,7 μm, 100 x 2,1 mm)	0,3	50	1,42	16 760	2,34	37 880

Tabulka 2 – Podmínky separace a její výsledky odpovídající nejvyšší účinnosti testovaných kolon

Vysvětlivky: T – teplota (°C), R_t – retenční čas (min), N/m – počet teoretických pater na metr

Nejvyšší účinnost měla kolona Kinetex o rozměrech 100 x 4,6 mm a velikostí částic 2,6 μm při průtoku MF 0,5 ml a teplotě 50 °C. Celkový čas analýzy byl ale téměř 5 minut. Monolitická kolona nové generace Chromolith HighResolution (Chromolith HR) měla srovnatelnou účinnost s mnohem kratším časem analýzy.





Obr. 24 - Chromatogramy retinolu a α-tokoferolu dle srovnání nejvyšší účinnosti kolon

V dalším porovnání jsou uvedeny výsledky analýz, u kterých čas analýzy nepřesahoval 2 minuty. Čas hraje v bioanalytické laboratoři velice důležitou úlohu. Navíc cílem bylo zkrátit čas oproti aktuálně používané metodě.

kolona a podmínky separace	retinol		α -tokoferol		R _{ij}	V _S (ml)	T _A (min)	operační tlak na koloně (psi)
	N/m	T _f	N/m	T _f				
Kinetex C18 (2,6 μ m, 50 x 4,6 mm) 1,5 ml/min 25 °C	44 500	1,092	98 580	1,161	9,41	2,83	1,22	1 949
Kinetex C18 (2,6 μ m, 50 x 4,6 mm) 1,0 ml/min 50 °C	49 180	1,029	87 680	1,258	6,74	1,35	1,35	1 013
Kinetex C18 (2,6 μ m, 100 x 4,6 mm) 2,5 ml/min 25 °C	43 280	1,107	90 920	1,063	14,43	3,60	1,44	4 701
Kinetex C18 (2,6 μ m, 100 x 4,6 mm) 2,0 ml/min 50 °C	46 680	1,120	93 740	1,057	10,98	3,00	1,50	2 927
Kinetex C18 (2,6 μ m, 150 x 4,6 mm) 2,5 ml/min 25 °C	60 620	1,091	108 100	1,065	18,26	5,83	1,93	6 814
Kinetex C18 (2,6 μ m, 150 x 4,6 mm) 2,5 ml/min 50 °C	54 240	1,077	91 427	1,038	12,59	4,83	1,53	5 398
Kinetex C18 (1,7 μ m, 100 x 3,0 mm) 1,1 ml/min 25 °C	24 500	1,278	63 690	1,288	10,62	1,58	1,44	7 077
Kinetex C18 (1,7 μ m, 100 x 3,0 mm) 0,9 ml/min 50 °C	24 040	1,215	44 400	1,420	6,77	1,19	1,32	4 300
Chromolith HR RP-18e (100 x 4,6 mm) 3,0 ml/min 25 °C	52 400	1,109	97 260	1,048	13,04	4,47	1,49	2 532
Chromolith HR RP-18e (100 x 4,6 mm) 2,5 ml/min 50 °C	58 400	1,105	90 340	1,062	9,24	3,5	1,40	1 748
Acquity HSS T3 (1,8 μ m, 50 x 2,1 mm) 0,7 ml/min 25 °C	13 813	1,350	42 720	1,340	7,25	0,95	1,36	4 636
Acquity HSS T3 (1,8 μ m, 50 x 2,1 mm) 0,5 ml/min 45 °C	17 600	1,320	38 860	1,450	6,37	0,72	1,43	2 613
Shim-pack XR-ODS III (1,6 μ m, 75 x 2,0 mm) 1,1 ml/min 45 °C	14 917	1,360	39 969	1,353	8,18	1,74	1,58	10 025
Acquity BEH (1,7 μ m, 100 x 2,1 mm) 0,9 ml/min 25 °C	12 517	1,261	27 487	1,183	8,12	1,44	1,60	10 402
Acquity BEH (1,7 μ m, 100 x 2,1 mm) 0,7 ml/min 50 °C	10 687	1,344	30 232	1,318	5,79	0,96	1,37	6 997

Tabulka 3 – Podmínky separace a výsledky analýzy s časem trvání do 2 minut

Vysvětlivky: N/m – počet teoretických pater na metr, T_f –faktor symetrie píku, R_{ij} – rozlišení, V_S – spotřeba mobilní fáze na analýzu, T_A – doba trvání analýzy.

Každá hodnota je průměrem 3 měření.

Nejkratší dobu analýzy dosáhla kolona Kinetex o rozměrech 50 x 4,6 mm za průtoku 1,5 ml/min a teplotě MF 25 °C. Přes dostatečnou účinnost a nízkou spotřebu mobilní fáze byl tvar píku pro α -tokoferol v porovnání s ostatními kolonami nevyhovující.

Překvapivé byly výsledky separace u kolon plněných celoporézními částicemi s velikostí do 2 μ m. Separační účinnost a tvar píku nedosahovaly hodnot jako u kolon plněných částicemi o velikosti 2,6 μ m. Monolitická kolona měla pak srovnatelné výsledky s kolonami plněnými core-shell částicemi jak v účinnosti, tak v krátkém čase analýzy a spotřebě MF.

Podle získaných výsledků jsme pro následující měření vybrali kolony Kinetex o rozměru 100 x 4,6 s velikostí částic 2,6 μ m, chromatografické podmínky – průtok 2,0 ml/min, teplota MF 50 °C a Chromolith HR o rozměru 100 x 4,6 mm, chromatografické podmínky – průtok 2,5 ml/min, teplota MF 50 °C. Byla testována opakovatelnost nástřiku standardního roztoku, séra a mateřského mléka. Vzorky séra a mateřského mléka byly připraveny extrakcí z kapalně do kapalně fáze dle metod vyvinutých v naší laboratoři [106, 109]. Opakovatelnost byla hodnocena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) retenčního času a plochy pod píkem z 10 samostatně připravených vzorků. U retenčního času hodnota relativní směrodatné odchylky ani u jedné z kolon nepřesahovala 0,5 %. U hodnoty plochy pod píkem dosahovala kolona Chromolith HR RSD <1 % a kolona Kinetex <2 % [110]. Obě testované kolony požadavek splnily.

Limit detekce byl vypočten jako trojnásobek hodnoty signál/šum (S/N). Limit kvantifikace byl vypočítán jako $S/N \times 10$.

Srovnání parametrů dříve vyvinutých metod ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky s parametry nejlepších kolon v tomto experimentu je uvedeno v následující tabulce.

Metoda	Urbánek <i>et al.</i> [106]		Krčmová <i>et al.</i> [107]		Plíšek <i>et al.</i> [108]		Kučerová <i>et al.</i> [111]			
Kolona	Chromolith RP-18e (100 x 4,6 mm)		Chromolith RP-18e (100 x 4,6 mm)		Kinetex C18 (2,6 µm, 100 x 4,6 mm)		Chromolith HR RP-18e (100 x 4,6 mm)		Kinetex C18 (2,6 µm, 100 x 4,6 mm)	
Parametr	retinol	α-tokoferol	retinol	α-tokoferol	retinol	α-tokoferol	retinol	α-tokoferol	retinol	α-tokoferol
V _I (µl)	50		20		5		1		1	
MF	100% methanol		100% methanol		100% methanol		100% methanol		100% methanol	
FR (ml/min)	2,5		2,5		1,5		2,5		2,0	
T (°C)	25		25		49		50		50	
N			2 213	3 936	3 265	7 462	5 840	9 034	4 668	9 374
HETP (µm)			45,1	28,3	31,0	13,0	17,1	11,1	21,4	10,7
T _f			1,198	1,524	1,750	1,420	1,062	1,105	1,120	1,057
W (min)			0,21	0,20	0,12	0,13	0,04	0,05	0,04	0,05
LOD (nmol/l)	20,0	100,0	130,0	90,0	4,0	78,0	2,3	6,4	2,5	5,8
LOQ (nmol/l)	70,0	300,0	270,0	190,0	12,0	182,0	7,7	21,4	8,2	19,2
T _A (min)	1,8		1,8		1,75		1,4		1,4	
V _S (ml)	450		450		263		350		300	

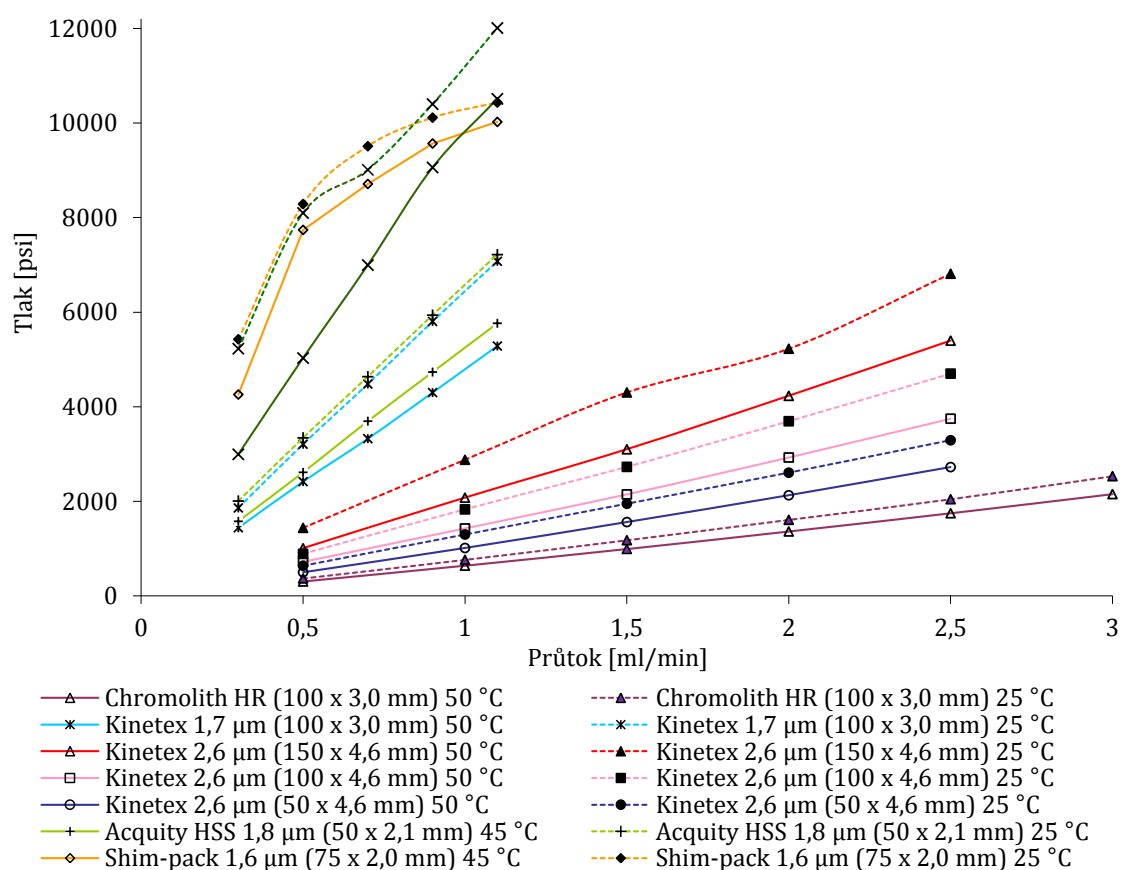
Tabulka 4 – Porovnání naměřených parametrů s metodami vyvinutými ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky

Vysvětlivky: V_I – objem nástřiku (µl), MF – složení mobilní fáze, FR – průtok (ml/min), T – teplota (°C), N – počet teoretických pater, HETP – výškový ekvivalent teoretického patra (µm), T_f – faktor symetrie píku, W – šířka píku na základně (min), LOD – limit detekce (nmol/l), LOQ – limit kvantifikace (nmol/l), T_A – čas analýzy, V_S – spotřeba mobilní fáze (ml)/100 analýz

Důležitým parametrem pro životnost kolony je hodnota zpětného tlaku na koloně během analýzy. Z tohoto důvodu jsme také porovnali hodnoty dosažených tlaků u všech testovaných kolon při změnách průtoků mobilní fáze (Obr. 25).

Přestože maximální limit tlaku udaný výrobcem většiny testovaných kolon byl mnohem vyšší než dosahované hodnoty při analýzách, vysoký průtok nebyl u kolon testován, neboť retenční čas pro retinol dosahoval hodnot blízkých mrtvému času systému, a retinol nemohl být detekován.

Nízký tlak na monolitické koloně je dán unikátní porózní strukturou její náplně. Core-shell kolony s malými částicemi jsou vytvořeny pro UHPLC systémy operujícími pod vysokým tlakem.



Obr. 25 – Porovnání operačního tlaku na testovaných kolonách

6.1.5.Závěr

Na základě získaných výsledků byla jako nejlepší kolona pro vývoj nové UHPLC metody pro rutinní stanovení retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu vybrána monolitická kolona druhé generace Chromolith HighResolution o rozměrech 100 x 4,6 mm. Objem nástřiku vzorku na kolonu chromatografického systému byl zvolen 1 μ l a jako mobilní fáze použit 100% methanol s průtokem 2,5 ml/min a optimální teplotou analýzy 50 °C. Retenční čas retinolu byl 0,77 minuty a α -tokoferolu 1,19 minuty. Celkový čas analýzy byl 1,4 minuty. Na jednu analýzu bylo spotřebováno 3,5 ml mobilní fáze. Vyšší spotřeba mobilní fáze je kompenzována delší životností monolitické kolony oproti částicovým kolonám a její nižší cenou. Na základě našich zkušeností s monolitickými kolonami máme ověřeno, že na monolitické koloně je možné provést více než 1000 analýz retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu bez ztráty účinnosti kolony [107, 112, 113]. Množství nástřiků vzorků biologického materiálu na kolonu plněnou core-shell a celoporézními částicemi bez ztráty účinnosti je nižší [28, 114]. Životnost kolon lze samozřejmě prodloužit použitím předkolony a vhodnou úpravou analyzovaných vzorků.

Monolitická kolona druhé generace, Chromolith HR, je srovnatelná a v některých parametrech dokonce lepší v porovnání s ostatními UHPLC kolonami použitými v tomto experimentu. Spojení monolitů v kombinaci s UHPLC je novým směrem, který spojuje výhody obou pro bioanalýzu.

6.2. STABILITA RETINOLU A α -TOKOFEROLU V MATEŘSKÉM MLÉCE

Mateřské mléko je jedinou přirozenou a nenahraditelnou výživou pro novorozené děti, která obsahuje veškeré základní živiny důležité pro správný růst a vývoj jedince. Tyto živiny jsou v mléce přítomné v optimálním množství a poměru. Pokud tedy novorozenec nemůže být kojen vlastní matkou, měla by mu být poskytnuta plnohodnotná náhrada. Z tohoto důvodu jsou zřízeny mléčné banky, které zpracovávají mateřské mléko od dobrovolných dávkyně (matky s přebytky mateřského mléka či matky, jejichž děti jsou hospitalizovány na dětském oddělení).

Složení mateřského mléka se mění v průběhu laktace. V prvních dnech po porodu se vytváří mlezivo (kolostrum), které je takzvaným prvním mlékem. Mlezivo se tvoří těsně před porodem a je produkováno 3 – 5 dní po něm. Je to hustá, smetanově žlutá tekutina, která je bohatá na proteiny a vitamíny a naopak neobsahuje téměř žádnou vodu, neboť ledviny novorozence ještě nejsou schopné ji zpracovat. Kolostrum je bohaté na vitamíny A a E, které ochraňují organismus dítěte proti oxidačnímu stresu. Celkově mlezivo obsahuje mnoho vitamínů, minerálů, stopových prvků, bílkovin a růstových faktorů, které hrají důležitou roli v imunitním systému novorozence. V kolostru je vysoký obsah leukocytů, z nichž jsou až z 90 % makrofágy, které fagocytují bakterie a kvasinky. Zbýlých 10 % tvoří lymfocyty.

Přibližně 40 hodin po porodu se začne vytvářet zralé mateřské mléko. Na začátku kojení dítě dostává tzv. přední mléko. Toto mléko obsahuje více vody a málo bílkovin a tuků. Slouží k hydrataci a zahánění žízně novorozence. Přední mléko se postupně mění na zadní mléko, které je hutné, krémové a bohaté na tuky a bílkoviny. Tímto mlékem dítě zažene hlad.

Mateřské mléko donášejí dávkyně do mléčné banky buď čerstvé (max. 24 hodin po odsátí) nebo zmražené (dávkyně je ideálně vybavena lahvičkami z mléčné banky). Maximální doporučená doba skladování zmraženého mléka u dávkyně je 7 dní.

V České republice se může nepasterizované mléko dávat pouze vlastním dětem. Exspirace čerstvého mléka je 24 hodin. Pokud je pak mléko určeno pro jiné novorozence, musí projít pasterizací. Během pasterizace se mléko ohřívá na 62,5 °C v pasterizační vaně po dobu 20 minut. Poté následuje prudké zchlazení na 10 °C během 10 minut. Nakonec je

mléko řízeně zamrazeno na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uloženo v mrazícím zařízení. Takto zpracované mléko má expiraci 3 měsíce.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaký efekt má proces pasterizace a následné skladování mléka na hladinu retinolu a α -tokoferolu po celou dobu jeho trvanlivosti (3 měsíce).

6.2.1. Přístrojové vybavení a chemikálie

6.2.1.1. Chromatografický systém

Pro stanovení retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce byl využit HPLC systém Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Součástí sestavy je autosampler Rack changer II pro mikrotitrační destičky, autosampler na vialky SIL/20AC (objem nástřiku $1,0 - 50,0\ \mu\text{l}$) a degaser DGU-20A5. Mobilní fáze je poháněna dvěma pumpami LC20-AB (rozsah průtoku $0,0001 - 10,0\ \text{ml}$). Kolonový termostat CTO-20A lze nastavit na teploty v rozsahu teplot -10 až $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analyty byly detekovány DAD detektorem SPD-M20A. Chromatografický systém komunikuje s počítačem komunikačním modulem CBM-20AC. Celá sestava je pak řízena softwarem LC Solution.

6.2.1.2. Laboratorní vybavení

Při přípravě standardních roztoků a vzorků mateřského mléka byly použity analytické váhy Sartorius ME5-OCE (Sartorius AG, Goettingen, Německo), termoblok Transsonic Ultrasonic Cleaning Units TP 680 DP (Elma, Singen, Německo), stolní třepačka LabDancer V (IKA, Staufen, Německo), horizontální laboratorní třepačka LT1 (Sázava, ČR), termostat Stericell (BMT, Brno, ČR), centrifuga Eppendorf 5810-R (Hamburk, Německo) a laboratorní vakuová odparka Eppendorf concentrator 5301 (Hamburk, Německo).

6.2.1.3. Použité chemikálie

Pro přípravu standardních roztoků byly použity následující látky:

- ✓ Retinol, $\geq 97,0\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ (\pm) - α -Tocopherol, synthetic, $\geq 96\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Při přípravě standardních roztoků, vzorků před analýzou a jako mobilní fáze byla použita tato rozpouštědla:

- ✓ n-hexan 96% , multisolvent HPLC grade (Scharlau Chemie, Sentmenat, Španělsko)

- ✓ Hydroxid draselný – peletky, pure Ph. Eur (AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo)
- ✓ Kyselina L-askorbová p. a. (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ Ethanol absolute (Merck, Darmstadt, Německo)
- ✓ Methanol, HPLC grade (Merck, Darmstadt, Německo)
- ✓ Deionizovaná voda, Ultrapure water system (Goro, Praha, ČR) – připravena v laboratoři metodou reverzní osmózy a filtrace

6.2.2.Sběr vzorků

Vzorky mateřského mléka pocházely od zdravých matek ve věku 26 – 39 let. Délka kojení se pohybovala v rozmezí 7 až 53 dní. Pro studii bylo použito celkem 25 různých vzorků mléka. Veškeré vzorky použité ve studii byly na základě získání informovaného souhlasu od všech dárkyň. Tento postup schválila Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Po doručení mléka do mléčné banky byly z každého vzorku odebrány 2 ml pro stanovení obsahu vitamínů před pasterizací. Mléko poté prošlo pasterizací. Ihned poté byly odebrány opět 2 ml pro stanovení hladiny vitamínů po pasterizaci. Zbytek mléka byl rozdělen do 5 zkumavek po objemu 4 ml, které byly do doby analýzy skladovány při teplotě -27 °C.

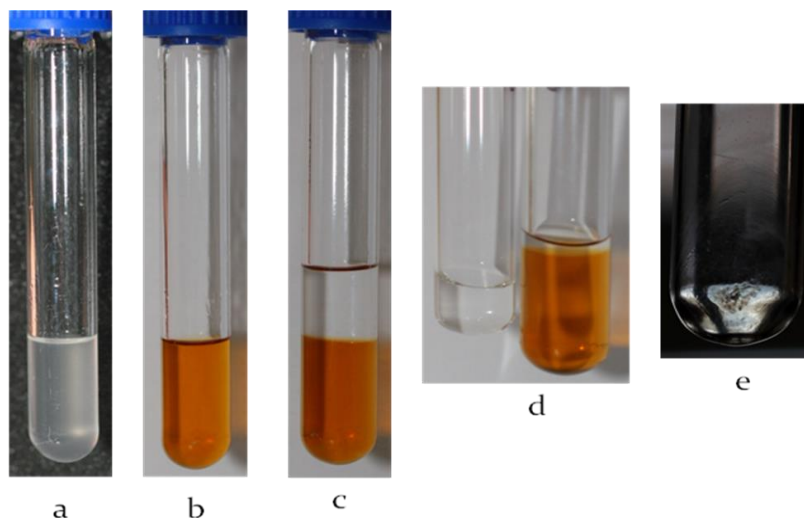
Během studie jsme stanovovali hladiny retinolu a α -tokoferolu před a ihned po pasterizaci a dále pak po 1, 2, 4, 8 a 12 týdnech skladování. Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

6.2.3.Analýza vzorků

6.2.3.1. Úprava vzorku před analýzou

Extrakce retinolu a α -tokoferolu probíhala podle metody vyvinuté ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky FNHK [109]. Mateřské mléko bylo ohřáto na vodní lázni na 37 °C za stálého míchání, aby bylo dostatečně homogenní a došlo k rovnoměrné distribuci tukových částic. Prvním krokem byla deproteinace – k 0,5 ml vzorku byly přidány 2 ml chlazeného ethanolu (a). Aby se zabránilo oxidaci během saponifikace, byl přidán 1 ml čerstvě připravené kyseliny askorbové. Saponifikace probíhala působením 1 ml 10 M hydroxidu draselného při teplotě 80 °C ve tmě po dobu 30 minut (b). Poté byly analyty extrahovány do 2 ml hexanu na horizontální třepačce (c).

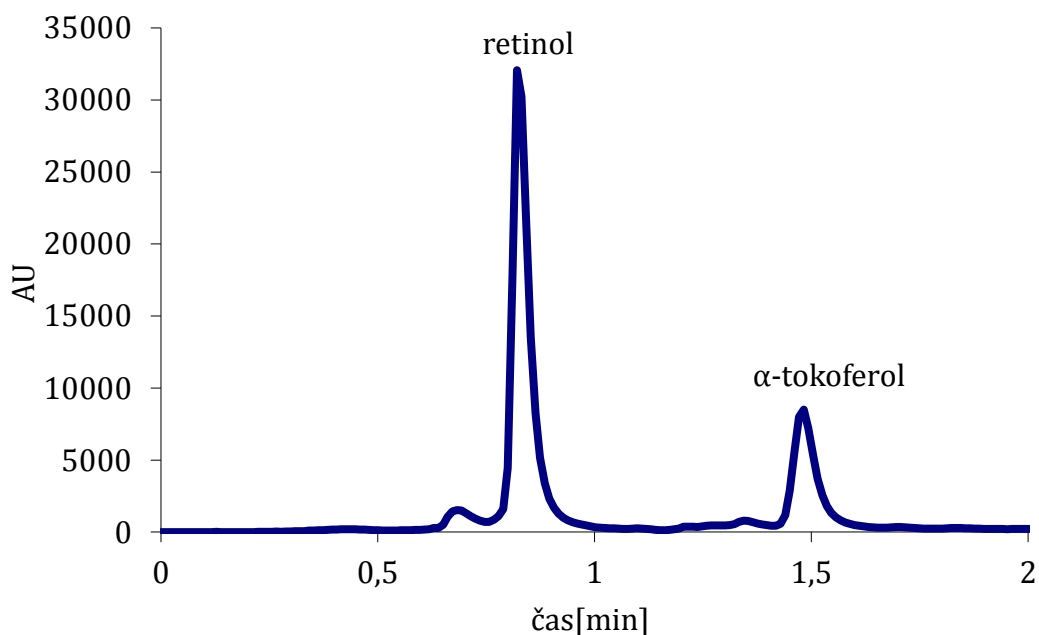
Po centrifugaci (3220 x g, 10 minut, 4 °C) bylo odděleno 1,5 ml hexanové vrstvy (d), která byla odpařena ve vakuové odparce (45 °C) (e). Před HPLC analýzou byl odparek rozpuštěn v 375 µl methanolu.



Obr. 26 - Úprava vzorku před analýzou (© foto Jan Honegr)

6.2.3.2. Chromatografické stanovení

Stanovení koncentrace cílových analytů ve vzorcích mateřského mléka bylo provedeno podle metody RP-HPLC rovněž vyvinuté ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky [106]. Jako stacionární fáze byla použita monolitická kolona Chromolith Performance RP-18e (Merck, Darmstadt, Německo) o rozměrech 100 mm x 4,6 mm. Jako mobilní fáze byl použit methanol, průtok 2,5 ml/min, teplota kolonového termostatu 25 °C. Retinol byl detekován pomocí DAD detektoru při vlnové délce 325 nm, α -tokoferol při 295 nm. Celková doba analýzy byla 2 minuty. Na Obr. 27 je znázorněn chromatogram vzorku mateřského mléka z této studie, koncentrace retinolu 3,88 µmol/l, α -tokoferolu 24,93 µmol/l.



Obr. 27 – Chromatogram vzorku mateřského mléka

Statistická analýza zhodnocení změn hladin vitamínů před a po pasterizaci a dále pak během skladování byla provedena softwarem NCSS 2007 (Kaysville, USA). Hladina statistické významnosti byla zvolena na úrovni $p < 0,05$. Pro porovnání možných změn hladin sledovaných vitamínů v mateřském mléce před pasterizací a po pasterizaci a během 12 týdnů skladování byly použity testy Anova a Mann Whitney.

6.2.4. Výsledky analytické části

6.2.4.1. Vliv pasterizace na koncentraci retinolu a α -tokoferolu

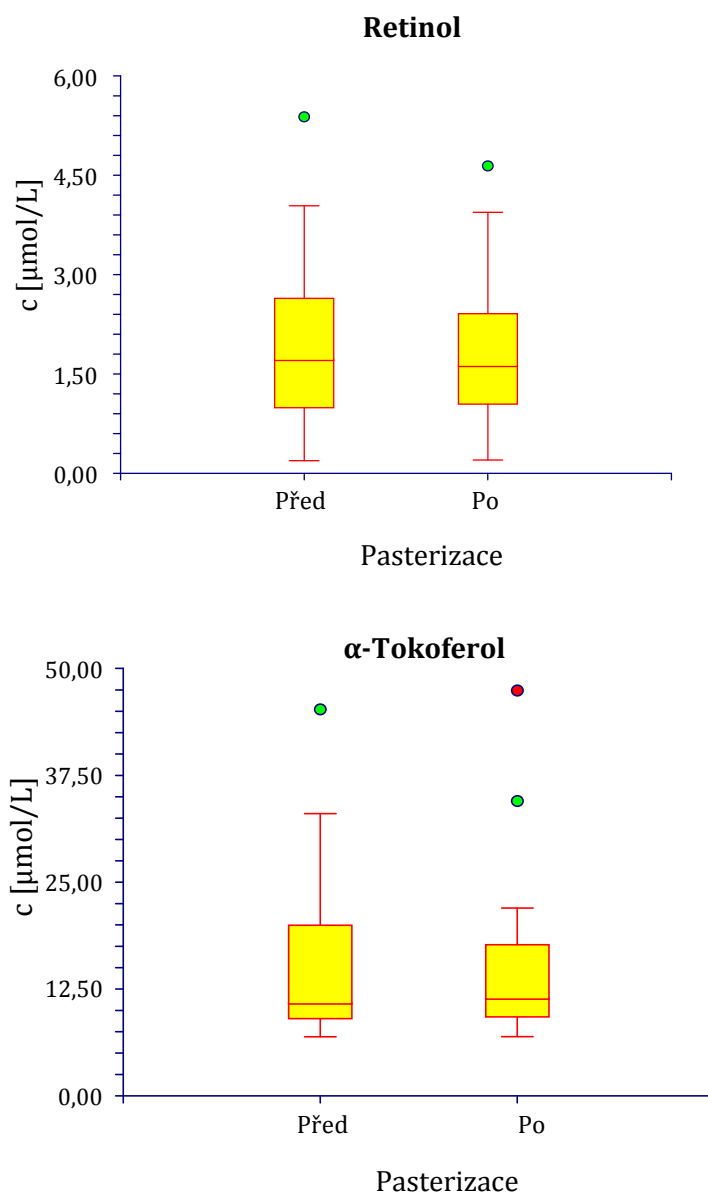
První porovnání se zabývá vlivem pasterizace na koncentraci vitamínů A a E v mateřském mléce. Náš experiment potvrdil, že pasterizace statisticky významně nesnižuje koncentraci retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce (Tabulka 5).

Analyt [$\mu\text{mol/l}$]	Před pasterizací			Po pasterizaci		
	N	Průměr	SD	N	Průměr	SD
Retinol	25	1,88	1,31	25	1,89	1,14
α -Tokoferol	25	14,91	9,40	25	14,55	9,35

Tabulka 5 – Změna koncentrace analytů před a po pasterizaci

Vysvětlivky: N – počet vzorků, SD – směrodatná odchylka

Na Obr. 28 je grafické znázornění hladin retinolu a α -tokoferolu ve vzorcích mateřského mléka před a po pasterizaci (mediány se směrodatnými odchylkami a rozsahem koncentrací).



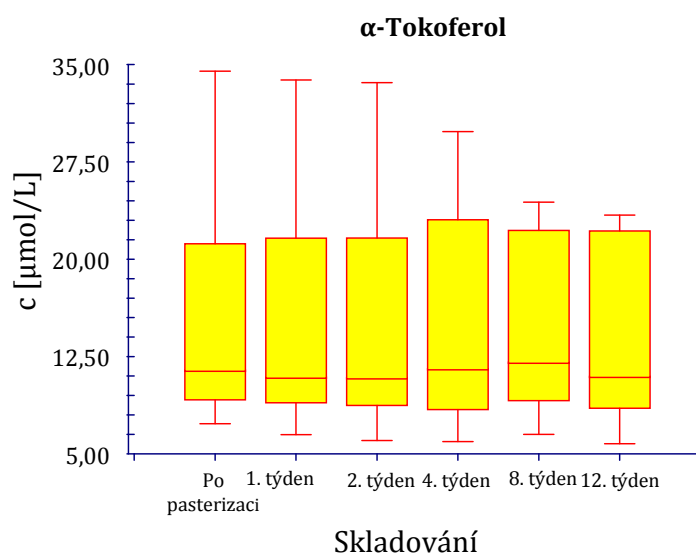
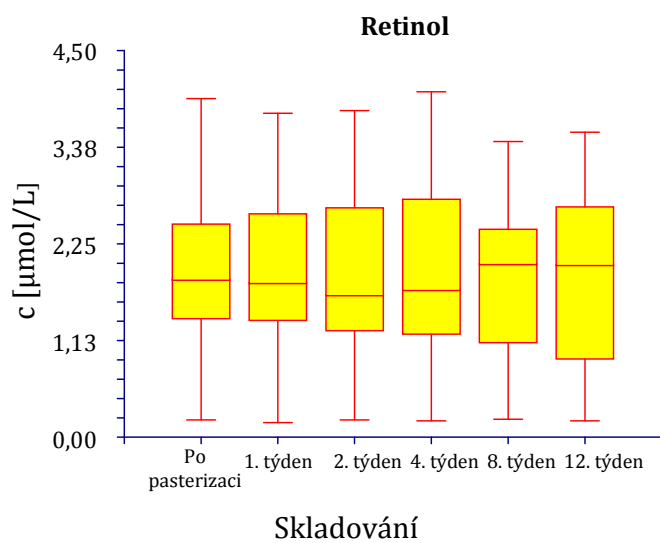
Obr. 28 – Změny v koncentraci analytů v před a po pasterizaci mateřského mléka

Další částí sledování bylo hodnocení možné změny koncentrace retinolu a α -tokoferolu během skladování mateřského mléka při $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ v průběhu 12 týdnů. Doba 12 týdnů byla určena z důvodu maximální možné doby skladování mateřského mléka v Mléčné bance FNHK. Po uplynutí této doby nesmí být mléko použito a musí dojít k jeho likvidaci. Grafické znázornění změn hladin vitamínu A a E v průběhu skladování je uvedeno na Obr. 29 (mediány, rozsah koncentrací).

Analyt [μmol/l]	1. týden			2. týden			4. týden			8. týden			12. týden		
	N	Průměr	SD	N	Průměr	SD	N	Průměr	SD	N	Průměr	SD	N	Průměr	SD
Retinol	19	1,88	1,04	19	1,90	1,08	19	1,96	1,15	15	1,82	1,00	15	1,82	1,06
α-Tokoferol	19	13,63	7,08	19	13,49	7,20	19	13,97	7,41	15	13,95	6,31	15	13,17	3,38

Tabulka 6 – Změna koncentrace analytů během skladování

Vysvětlivky: N – počet vzorků, SD – směrodatná odchylka



Obr. 29 - Změny v koncentraci analytů v průběhu skladování vzorků mateřského mléka

Z uvedených výsledků vyplývá, že skladování mateřského mléka po dobu 12 týdnů při teplotě $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ neovlivnilo statisticky významně hladinu sledovaných liposolubilních vitamínů.

6.2.5.Závěr

V rámci této studie byla testována stabilita vitamínů A a E v mateřském mléce během jeho zpracování a uskladnění v Mléčné bance Tkáňové ústředny FNHK. Výsledky ukázaly, že hladina sledovaných liposolubilních vitamínů retinolu a α - tokoferolu není ovlivněna pasterizací a ani následným skladováním při teplotě $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ po celou dobu stanovené trvanlivosti mléka. Změny hladin sledovaných vitamínů nebyly statisticky významné. Toto zjištění je důležité z důvodu zachování nutriční hodnoty takto zpracovaného mléka, které je podáváno předčasně narozeným dětem hospitalizovaným na Dětské klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové, aby byly zachovány podmínky pro jejich správný růst a vývoj.

Výsledky projektu jsou sepsány a připraveny k publikaci v odborném časopise pod názvem „The effect of processing and storage on α -tocopherol and retinol levels in human breast milk“.

6.3. VÝVOJ HPLC METODY PRO SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ RETINOLU, α - A γ -TOKOFEROLU METODOU VNITŘNÍHO STANDARDU S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ

Cílem této práce bylo vyvinout novou separační metodu pro simultánní stanovení retinolu, α - a γ -tokoferolu s využitím vnitřního standardu. α - a γ -Tokoferol jsou biologicky neaktivnější formy vitamínu E. Metoda je určena pro stanovení těchto analytů v lipoproteinových vrstvách séra pacientů, kteří jsou léčeni na Separátorovém centru IV. interní hematologické kliniky FN HK.

6.3.1. Přístrojové vybavení a chemikálie

6.3.1.1. Chromatografický systém

Pro stanovení cílových analytů byl využit HPLC systém Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Jeho bližší specifikace je uvedena v kapitole 6.2.1.1. Pro detekci byl použit fluorescenční detektor RF-10AXL.

6.3.1.2. Laboratorní vybavení

Při přípravě standardních roztoků a vzorků před analýzou byly použity analytické váhy Sartorius ME5-0CE (Sartorius AG, Goettingen, Německo), ultracentrifuga Optima MAX-XP s rotorem MLA 15 (Beckman Coulters, Brea, Kalifornie, USA), stolní třepačka LabDancer V (IKA, Staufen, Německo), horizontální laboratorní třepačka LT1 (Kavalier, Sázava, Česká republika), centrifuga Eppendorf 5810-R (Hamburk, Německo) a laboratorní vakuová odparka Eppendorf concentrator 5301 (Hamburk, Německo).

6.3.1.3. Použité chemikálie

Pro přípravu standardních roztoků byly použity následující látky:

- ✓ Retinol, $\geq 97,0\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ (\pm) - α -Tocopherol, synthetic, $\geq 96\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ $(+)$ - γ -Tocopherol, $\geq 96\%$, HPLC (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ rac-Tokol 50mg/ml (Matreya LLC, Pleasant Gap, Pensylvánie, USA)

Při přípravě vzorků před analýzou a jako mobilní fáze byla použita tato rozpouštědla:

- ✓ n-hexan (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

- ✓ chlorid sodný (Merck, Darmstadt, Německo)
- ✓ Ethanol denaturovaný 5% methanolem (Lachema, Brno, ČR)
- ✓ Methanol, HPLC grade (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ Acetonitril, CHROMASOLV® Plus, HPLC, ≥ 99,9% (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- ✓ Deionizovaná voda, Ultrapure water system (Goro, Praha, ČR) – připravena v laboratoři metodou reverzní osmózy a filtrace

6.3.2. Příprava zásobních a standardních roztoků

Zásobní roztok retinolu byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství standardní látky v odměrné baňce methanolem o výsledné koncentraci 2 mmol/l.

Pro primární rozpuštění α -, γ -tokoferolu a tokolu byl použit *n*-hexan. Výsledná koncentrace zásobního roztoku α -tokoferolu byla 2 mmol/l, γ -tokoferolu 2,4 mmol/l a tokolu 1 mmol/l.

Koncentrace směšného standardu použitého při vývoji metody byla 1 μ mol/l pro retinol, 20 μ mol/l pro α -tokoferol, 10 μ mol/l pro γ -tokoferol a 10 μ mol/l pro tokol.

Zásobní roztok retinolu byl uchován při -25 °C, zásobní roztok tokoferolů a vnitřního standardu při +4 °C a směšný standardní pracovní roztok při -25 °C. Stabilita takto připravených a uchovaných roztoků byla 6 měsíců.

6.3.3. Vývoj metody

Při výběru vhodné stacionární fáze pro zamýšlenou metodu bylo testováno několik C18 monolitických kolon a kolon s pevným jádrem. Rozhodujícím parametrem byla schopnost rozdělit α - a γ - tokoferol.

Pro první testování byl jako mobilní fáze použit 100% methanol při průtoku 0,5 až 2,5 ml/min. Z kolon byly na rozdělení α - a γ -tokoferolu zkoušeny následující, přičemž červeně označené kolony nerozdělily α - a γ -tokoferol, modře označené rozdělily analyty nedostatečně a zelené analyty rozdělily s dostatečným rozlišením:

Monolitické kolony:

- Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm)
- Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm)
- Chromolith Performance RP-18e (50 x 4,6 mm)
- Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm)
- Chromolith HighResolution RP-18e (100 x 4,6 mm)

Kolony s pevným jádrem:

- Ascentis Express C18 (2,7 μm , 50 x 4,6 mm)
- Ascentis Express C18 (2,7 μm , 150 x 3 mm)
- Kinetex C 18, (2,6 μm , 100 x 4,6 mm)
- Sun Shell C18 (2,6 μm , 100 x 2,1 mm)
- Accucore C18 (2,6 μm , 100 x 4,6 mm)

Přestože kolona Kinetex dostatečně separovala cílové analyty, nebyla pro další vývoj testována z důvodu hraničního operačního tlaku chromatografického systému (3000 psi).

Následující optimalizace podmínek separace probíhala s kolonami Chromolith HighResolution o rozměrech 100 x 4,6 mm a Ascentis Express s velikostí částic 2,6 μm a rozměry 50 x 4,6 mm. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min.

Pro lepší separaci tokoferolů byl k methanolu přidáván acetonitril. Čím vyšší byl poměr acetonitrilu v mobilní fázi, tím se snižovala odezva na detektoru pro α -tokoferol. U kolony Ascentis ani přidání různých poměrů acetonitrilu do mobilní fáze nezlepšilo tvar píků, které byly nadále široké s výrazným chvostováním. U kolony Chromolith HR jako optimální poměr methanolu a acetonitrilu se zachováním dostatečné separace analytů na koloně a jejich odezvy na detektoru s uspokojivým tvarem píku byl 85 % MeOH a 15 % ACN.

U kolony Chromolith HR, která měla nejlepší výsledky separační účinnosti pro zamýšlené použití, byla ještě optimalizována teplota kolonového termostatu v rozsahu 20, 25 a 30 $^{\circ}\text{C}$. Při teplotě 20 $^{\circ}\text{C}$ bylo rozlišení srovnatelné s výsledky při teplotě na koloně 25 $^{\circ}\text{C}$, ale tvar píku byl podstatně horší – píky byly širší s větším chvostováním. Při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ se snížilo rozlišení mezi α - a γ -tokoferolem.

6.3.4. Chromatografická metoda

Pro simultánní stanovení retinolu, α - a γ -tokoferolu s vnitřním standardem byla použita kolona Chromolith HighResolution jako stacionární fáze. Mobilní fáze se skládala z 85 % metanolu a 15 % acetonitrilu. Teplota kolonového termostatu byla nastavena na 25 $^{\circ}\text{C}$. Pro zrychlení celkového času analýzy byl využit průtokový gradient mobilní fáze – první 0,9 minut byl průtok 2,0 ml/min, který byl následně zpomalen na 1,5 ml/min pro dostatečnou a uspokojivou separaci tokoferolů. Nástřik vzorku na kolonu byl 1 μl .

K detekci byl využit fluorescenční detektor. Pro retinol byla nastavena excitační vlnová délka na 325 nm a emisní na 480 nm. Pro tokoferoly a tokol byl detektor nastaven pro excitační vlnovou délku na 295 nm a emisní na 330 nm. Celkový čas analýzy byl 3 minuty.

6.3.4.1. Vybrané validační parametry

Metoda byla validována podle požadavků USP.

Test vhodnosti systému

analyt	R _t [min]	plocha	N	T _f	W [min]	R _{ij}
retinol	1,17	21 918	905	1,16	0,16	
tokol	1,81	619 294	1 997	1,18	0,17	3,92
γ-tokoferol	2,33	363 276	2 875	1,15	0,17	3,05
α-tokoferol	2,59	350 125	3 472	1,19	0,18	1,50

Tabulka 7 – Test vhodnosti systému, nástřík 1 µl, koncentrace retinolu 2,5 µmol/l, tokolu 10 µmol/l, γ-tokoferolu 5 µmol/l, α-tokoferolu 10 µmol/l

Vysvětlivky: R_t – retenční čas, N – počet teoretických pater, T_f – faktor symetrie píku, WR_{ij} – rozlišení.

Rozsah metody

	retinol	γ-tokoferol	α-tokoferol
kalibrační rozsah [µmol/l]	0,1 – 10	0,2 – 20	0,4 – 40
determinační koeficient	0,9999	0,9999	0,9999
LOD [nmol/l]	24	14	35
LOQ [nmol/l]	80	48	118

Tabulka 8 – Kalibrační rozsah metody

Opakovatelnost

	retinol	tokol	γ-tokoferol	α-tokoferol
Opakovatelnost nástříku				
Retenční čas – RSD [%]	0,29	0,19	0,17	0,12
Opakovatelnost nástříku				
Plocha píku – RSD [%]	3,43	0,32	6,18	1,27
Opakovatelnost extrakce				
Retenční čas – RSD [%]	0,36	0	2,33	2,59
Opakovatelnost extrakce				
Plocha píku – RSD [%]	6,46	3,0	2,43	4,51

Tabulka 9 – Opakovatelnost nástříku a extrakce biologického materiálu (sérum)

6.3.5. Úprava vzorků před analýzou

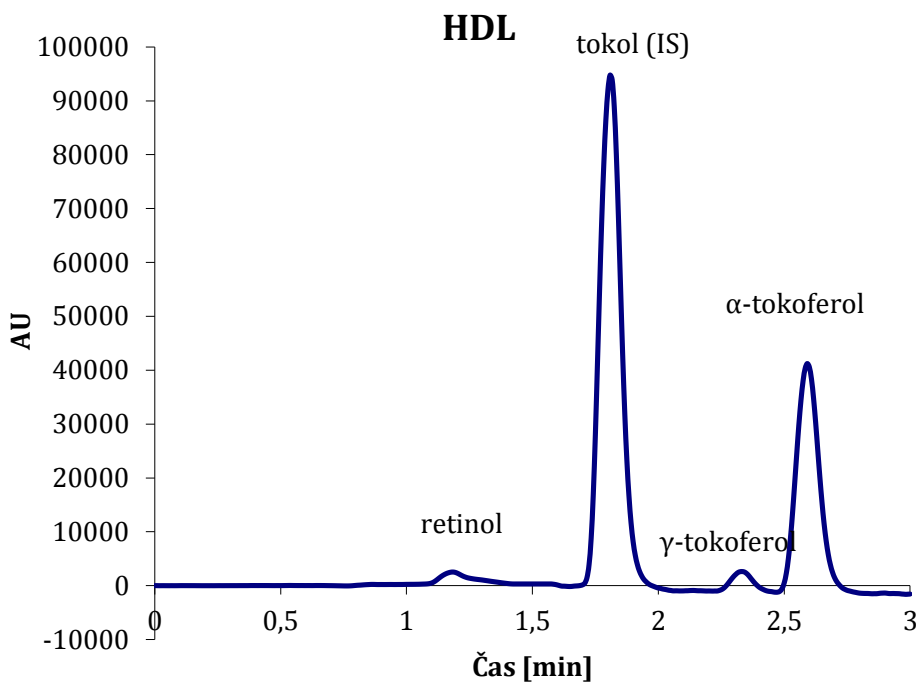
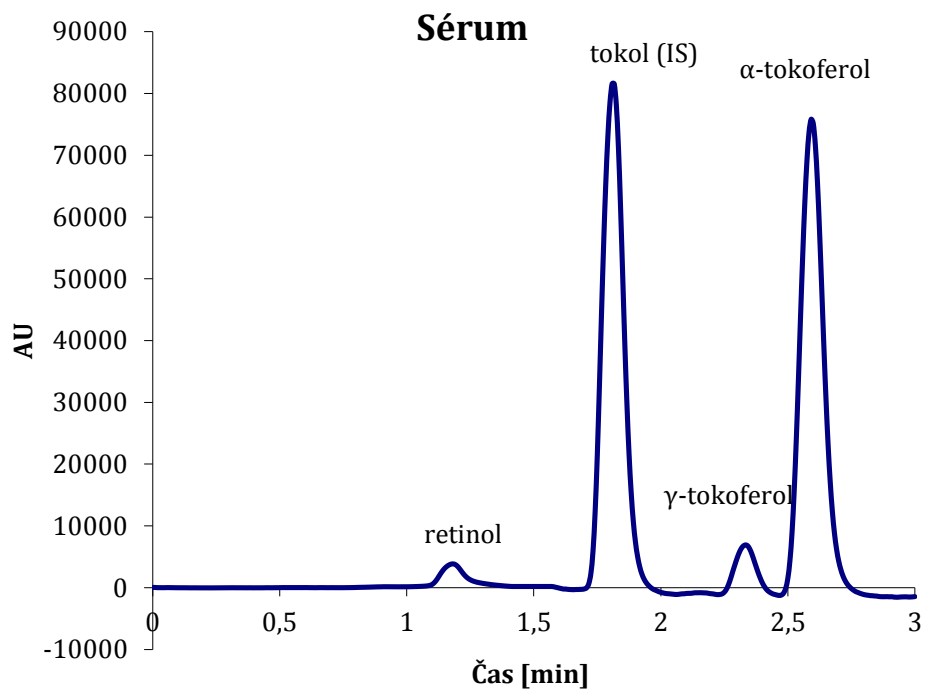
6.3.5.1. Ultracentrifugace lipoproteinových vrstev

Vzorky plné srážlivé krve odebrané z periferní žíly po 12 hodinovém lačnění byly po přijetí vzorku v laboratoři centrifugovány (4 °C, 2 000 x g, 10 minut). Z odděleného séra se jedna část uložila při teplotě -20 °C a nižší. Druhá část byla použita pro rozdělení lipoproteinových vrstev.

Lipoproteinové vrstvy (VLDL, LDL, HDL) byly ze séra separovány gradientovou ultracentrifugací v chloridu sodném (NaCl) v poměru 1:1 [115]. Pro oddělení VLDL vrstvy byl použit 0,9% NaCl. Pro rozdělení LDL a HDL pak 16,7% NaCl. Do roztoku NaCl byla přidána 0,1% EDTA, aby se zabránilo oxidaci lipoproteinů během ultracentrifugace. Ultracentrifugace probíhala při teplotě 10 °C, rychlosti 150 000 rpm (1 003 000 x g) po dobu 60 minut. Takto rozdělené lipoproteinové vrstvy byly skladovány při -20 °C do doby zpracování před následnou analýzou.

6.3.5.2. LLE extrakce vitamínů A a E ze séra a lipoproteinových vrstev

Sérum bylo zpracováno dle metody vyvinuté ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové [106]. V prvním kroku deproteinace je k 0,5 ml séra nebo lipoproteinové frakce přidáno 0,5 ml ethanolu denaturovaného methanolem s přídatkem interního standardu (tokolu) o koncentraci 10 µmol/l. Následně jsou cílové analyty extrahovány do 2 ml hexanu na stolní třepačce. Po centrifugaci (4 °C, 2 000 x g, 10 minut) je hexanová vrstva odebrána a odpařena v koncentrátoru (vacuum, 45 °C, 15 minut). Před analýzou je odparek rozpuštěn v 0,4 ml methanolu.



Obr. 30 – Chromatogram séra a HDL lipoproteinové vrstvy – koncentrace retinolu v séru je 2,41 $\mu\text{mol/l}$, v HDL 1,85 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace γ -tokoferolu v séru je 0,87 $\mu\text{mol/l}$, v HDL pak 0,44 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace α -tokoferolu je v séru 15,73 $\mu\text{mol/l}$, v HDL vrstvě 8,24 $\mu\text{mol/l}$.

6.3.6.Závěr

Byla vyvinuta nová analytická metoda pro simultánní stanovení retinolu, α - a γ -tokoferolu v biologickém materiálu s využitím vnitřního standardu. Jako stacionární fáze byla po testování různých druhů kolon vybrána monolitická kolona, která se pro své vlastnosti s výhodou využívá při stanovení látek v biologickém materiálu. Metoda vnitřního standardu pak eliminuje případné ztráty během extrakčního postupu. Nová metoda je vhodná pro stanovení cílových analytů v séru a lipoproteinových vrstvách. Krátký čas analýzy (3 minuty) je výhodný pro série velkého počtu vzorků v klinické laboratoři.

7. ZÁVĚR

Dizertační práce se zabývá vývojem chromatografických metod pro stanovení vitamínů A a E v biologickém materiálu a jejich využitím v klinickém výzkumu, například pro sledování stability těchto vitamínů v mateřském mléce během zpracování (pasterizace) a následného skladování.

Pro účel vývoje nové metody pro stanovení retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu s využitím UHPLC systému byly porovnávány různé typy chromatografických kolon – monolitická kolona II. generace, kolony plněné celoporézními částicemi, kolony plněné povrchově porézními částicemi. Velikost částic byla v rozsahu 1,6 – 2,7 μm . Fluorescenční detekce vedla ke značnému zvýšení citlivosti metody pro cílové analyty oproti stávajícím metodám dostupným ve výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Monolitická kolona nové generace Chromolith HighResolution prokázala nejlepší separační účinnost ze všech porovnávaných kolon.

Nově byla vyvinuta HPLC metoda pro rutinní stanovení retinolu, α - a γ -tokoferolu s využitím vnitřního standardu a fluorescenční detekcí. Výhodou vnitřní standardizace je především eliminace ztrát cílových analytů během úpravy vzorku před analýzou. I u této metody se monolitická kolona nové generace Chromolith HighResolution ukázala jako nejlepší z testovaných kolon zamýšlených pro tento účel. Metoda byla validována v souladu s doporučeními regulačních autorit (v tomto případě USP) a může být použita pro stanovení analytů v séru a lipoproteinových vrstvách.

Stabilitní studie vitamínů A a E v mateřském mléce, která byla řešena ve spolupráci s Mléčnou bankou Tkáňové ústředny FN HK dokázala, že pasterizace (62,5 °C po dobu 20 minut) a ani následné uskladnění (-27 °C) nemá vliv na hladinu stanovovaných analytů a je tak zachována jeho nutriční hodnota. Toto zjištění je důležité pro zajištění správné výživy nedonošených a předčasně narozených dětí hospitalizovaných na Dětské klinice Fakultní nemocnice HK, kterým je mléko podáváno.

Nově vyvinuté metody obohatily a rozšířily soubor metod Výzkumné laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky a jsou využívány při řešení výzkumných projektů v rámci Fakultní nemocnice Hradec Králové. Nové poznatky byly publikovány v renomovaných analytických časopisech s impakt faktorem.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Svec, F., What Is Going on in Today's Liquid Chromatography? *Chemické Listy*, **2009**, *103*, (4), 266-270.
- [2] Ettre, L.S., M.S. Tswett and the invention of chromatography. *LC GC Europe*, **2003**, *16*, (9), 632-638.
- [3] Martin, A.J.; Synge, R.L., A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J*, **1941**, *35*, (12), 1358-1368.
- [4] Harvey, D. *Modern analytical chemistry*. 1st ed. McGraw-Hill: Boston, **2000**.
- [5] Ettre, L.S., Nomenclature for chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, **1993**, *65*, (4), 819-872.
- [6] Saito, M., History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2013**, *115*, (6), 590-599.
- [7] Nordborg, A.; Hilder, E.F., Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, *394*, (1), 71-84.
- [8] In *Pharmacopoea Bohemica MMIX - Addendum MMXII (Ph. B. MMIX - Add. MMXII)*: Praha, **2012**.
- [9] Cazes, J. *Encyclopedia of chromatography*. 3rd ed. CRC Press: Boca Raton, **2010**.
- [10] Hemstrom, P.; Irgum, K., Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, **2006**, *29*, (12), 1784-1821.
- [11] Hydrofobní interakční chromatografie – HIC – HPLC. <http://www.hplc.cz/Teorie%5Chic.html> (15. listopadu 2015),
- [12] Hancu, G.; Simon, B.; Rusu, A.; Mircia, E.; Gyéresi, Á., Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **2013**, *3*, (1), 1-8.
- [13] B2_HPLC.jpg (JPEG obrázek, 640 × 461 bodů). http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/B2_HPLC.jpg (19. září 2015),
- [14] Swartz, M.E., Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction. *Lc Gc North America*, **2005**, 8-14.
- [15] Zotou, A., An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry*, **2012**, *10*, (3), 554-569.
- [16] Fish and Chips - Page 2 of 4 - Food Quality & Safety. <http://www.foodqualityandsafety.com/article/fish-and-chips/2/> (15. listopadu 2015),
- [17] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. I.* 1. vyd. ed. Lucie Nováková ; Michal Douša: Praha, **2013**.
- [18] Kirkland, J.J.; DeStefano, J.J., The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1126*, (1-2), 50-57.
- [19] Guiochon, G.; Gritti, F., Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *Journal of Chromatography A*, **2011**, *1218*, (15), 1915-1938.
- [20] How do small particle size columns increase sample throughput? / Chromatography Information / Restek.com. http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016 (16. listopadu 2015),
- [21] Kirkland, J.J., Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. *Analytical Chemistry*, **1992**, *64*, (11), 1239-1245.
- [22] Kortz, L.; Helmschrodt, C.; Ceglarek, U., Fast liquid chromatography combined with mass spectrometry for the analysis of metabolites and proteins in human body fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, *399*, (8), 2635-2644.

- [23] Gritti, F.; Guiochon, G., Diffusion models in chromatographic columns packed with fully and superficially porous particles. *Chemical Engineering Science*, **2011**, *66*, (17), 3773-3781.
- [24] Core-shell technology - Stationary Phases Overview - Stationary phases - Chromatography / Chromservis.eu. <https://www.chromservis.eu/i/core-shell-technology/c/stationary-phases-overview> (17. listopadu 2015),
- [25] Guillarme, D.; Ruta, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L., New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, *397*, (3), 1069-1082.
- [26] Miyabe, K.; Guiochon, G., Characterization of monolithic columns for HPLC. *Journal of Separation Science*, **2004**, *27*, (10-11), 853-873.
- [27] More about chromatography - Stationary phases - Chromatography / Chromservis.eu. <https://www.chromservis.eu/c/more-about-chromatography?offset=130> (16. listopadu 2015),
- [28] Cabrera, K., Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*, **2004**, *27*, (10-11), 843-852.
- [29] Chromolith® HPLC Columns | Merck Millipore. https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/analytcs-and-sample-preparation/chromolith-hplc-columns/Z3Sb.qB.jBsAAAFc1Um_MhK.nav (17. listopadu 2015),
- [30] Svec, F., Monolithic Stationary Phases. Place of Birth: Prague. *Chemicke Listy*, **2004**, *98*, (5), 232-238.
- [31] Sklenarova, H.; Chocholous, P.; Koblova, P.; Zahalka, L.; Satinsky, D.; Matysova, L.; Solich, P., High-resolution monolithic columns-a new tool for effective and quick separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, *405*, (7), 2255-2263.
- [32] Svec, F.; Lv, Y.Q., Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography. *Analytical Chemistry*, **2015**, *87*, (1), 250-273.
- [33] Cabrera, K., A New Generation of Silica-Based Monolithic HPLC Columns with Improved Performance. *LC GC North America*, **2012**, 56-60.
- [34] Guideline, I.C.H.H.T., Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, **2005**, *1*.
- [35] United States Pharmacopeial, C. *Usp37-Nf32*. United States Pharmacopeial, **2013**.
- [36] Food and Drug Administration, FDA guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research*, **2001**, *1*, 124-129.
- [37] Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on bioanalytical method validation. *European Medicines Agency*, **2011**.
- [38] Český lékopis 2009 - Doplněk 2012 (ČL 2009 - Dopl. 2012): *Pharmacopoea Bohemica MMIX - Addendum MMXII (Ph. B. MMIX - Add. MMXII)*. 1. vyd. ed, **2012**.
- [39] Šabartová, J., Validace analytických metod v kontrole léčiv. *Věstník SÚKL : měsíční informace o léčivech a zdravotnických prostředcích*, **1994**, (1), 6-8.
- [40] Taverniers, I.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E., Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, *23*, (8), 535-552.
- [41] Green, J.M., A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, **1996**, *68*, (9), A305-A309.
- [42] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. ed. Lucie Nováková, Michal Douša: Hradec Králové, Klatovy, **2013**.
- [43] Szultka, M.; Pomastowski, P.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B., Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. *Journal of Separation Science*, **2014**, *37*, (21), 3094-3105.

- [44] Kole, P.L.; Venkatesh, G.; Kotecha, J.; Sheshala, R., Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*, **2011**, *25*, (1-2), 199-217.
- [45] Arthur, C.L.; Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, **1990**, *62*, (19), 2145-2148.
- [46] Lord, H.; Cudjoe, E.; Vuckovic, D.; Togunde, P.; Musteata, F.M.; Zhou, S.N.; Zhang, X.; Hoque, M.E.; Pawliszyn, J., Bioanalysis with SPME. *Fast and Accurate LC-MS Analysis of 25-Hydroxyvitamin D*, 14.
- [47] Spietelun, A.; Marcinkowski, L.; de la Guardia, M.; Namiesnik, J., Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, **2013**, *1321*, 1-13.
- [48] Gorecki, T.; Yu, X.M.; Pawliszyn, J., Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst*, **1999**, *124*, (5), 643-649.
- [49] Lord, H.L.; Zhang, X.; Musteata, F.M.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J., In vivo solid-phase microextraction for monitoring intravenous concentrations of drugs and metabolites. *Nature Protocols*, **2011**, *6*, (6), 896-924.
- [50] Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C., Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, **1999**, *11*, (10), 737-747.
- [51] Nazyropoulou, C.; Samanidou, V., Stir bar sorptive extraction applied to the analysis of biological fluids. *Bioanalysis*, **2015**, *7*, (17), 2241-2250.
- [52] Camino-Sanchez, F.J.; Rodriguez-Gomez, R.; Zafra-Gomez, A.; Santos-Fandila, A.; Vilchez, J.L., Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. *Talanta*, **2014**, *130*, 388-399.
- [53] Lipinski, J., Automated solid phase dynamic extraction - Extraction of organics using a wall coated syringe needle. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **2001**, *369*, (1), 57-62.
- [54] www.online4u.cz; obchod@online4u.cz SPDE - Labicom - laboratorní přístroje a příslušenství, poradenská a servisní činnost. <http://www.labicom.cz/spde-86/>
- [55] GC Columns & Consumables|MEPS™ : SHIMADZU (Shimadzu Corporation). http://www.shimadzu.com/an/gc/column_consumable/feature4.html (8. listopadu 2015),
- [56] Abdel-Rehim, M., Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*, **2010**, *1217*, (16), 2569-2580.
- [57] Microextraction by Packed Sorbent MEPS - Building Materials. <http://www.drdarrinlew.us/building-materials/microextraction-by-packed-sorbent-meps.html> (8. listopadu 2015),
- [58] Alves, G.; Rodrigues, M.; Fortuna, A.; Falcao, A.; Queiroz, J., A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. *Bioanalysis*, **2013**, *5*, (11), 1409-1442.
- [59] GERSTEL Disposable Pipette Extraction - DPX. http://www.ccastaging3.com/products.php?prod_id=53 (8. listopadu 2015),
- [60] Namera, A.; Saito, T., Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis. *Bioanalysis*, **2013**, *5*, (8), 915-932.
- [61] Herrero-Latorre, C.; Barciela-Garcia, J.; Garcia-Martin, S.; Pena-Crecente, R.M.; Otarola-Jimenez, J., Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review. *Analytica Chimica Acta*, **2015**, *892*, 10-26.
- [62] Wierucka, M.; Biziuk, M., Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2014**, *59*, 50-58.

- [63] Saito, T.; Yamamoto, R.; Inoue, S.; Kishiyama, I.; Miyazaki, S.; Nakamoto, A.; Nishida, M.; Namera, A.; Inokuchi, S., Simultaneous determination of amitraz and its metabolite in human serum by monolithic silica spin column extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2008**, 867, (1), 99-104.
- [64] MonoSpin™ Series (Product Features) | GL Sciences. <http://www.glsciences.com/c-product/sample/solid/monospin-series-product-features/> (10. listopadu 2015),
- [65] Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A., Liquid-phase microextraction. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, 29, (1), 1-14.
- [66] Spietelun, A.; Marcinkowski, L.; de la Guardia, M.; Namiesnik, J., Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, **2014**, 119, 34-45.
- [67] Liquid-phase Microextraction in Food Analysis - Separation Science :: Premier Learning for Analytical Chemists. <http://www.sepscience.com/Sectors/Food/Articles/1455-/Liquidphase-Microextraction-in-Food-Analysis> (11. listopadu 2015),
- [68] Kokosa, J.M., Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 71, 194-204.
- [69] Wu, H.F.; Yen, J.H.; Chin, C.C., Combining drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry using electronic ionization and self-ion/molecule reaction method to determine methoxyacetophenone isomers in one drop of water. *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, (5), 1707-1712.
- [70] Ma, M.H.; Cantwell, F.F., Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: Quantitative extraction. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, (18), 3912-3919.
- [71] Pena-Pereira, F.; Lavilla, I.; Bendicho, C., Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **2009**, 64, (1), 1-15.
- [72] Lu, Y.C.; Lin, Q.; Luo, G.S.; Dai, Y.Y., Directly suspended droplet microextraction. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 566, (2), 259-264.
- [73] Liu, W.P.; Lee, H.K., Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, (18), 4462-4467.
- [74] Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E., Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, (14), 2650-2656.
- [75] Saraji, M.; Boroujeni, M.K., Analysis of narcotic drugs in biological samples using hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Microchimica Acta*, **2011**, 174, (1-2), 159-166.
- [76] Ghambarian, M.; Yamini, Y.; Esrafil, A., Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Microchimica Acta*, **2012**, 177, (3-4), 271-294.
- [77] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M.R.M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1116, (1-2), 1-9.
- [78] Saraji, M.; Boroujeni, M.K.; Bidgoli, A.A.H., Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance

liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, *400*, (7), 2149-2158.

[79] Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M., Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, **2010**, *1217*, (16), 2342-2357.

[80] Yamini, Y.; Pourali, A.; Seidi, S.; Rezazadeh, M., Electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography: an efficient method for extraction and determination of morphine, oxymorphone, and methylmorphine from urine samples. *Analytical Methods*, **2014**, *6*, (15), 5554-5565.

[81] Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E., Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1109*, (2), 183-190.

[82] Rosenfeld, L., Vitamine-vitamin. The early years of discovery. *Clinical Chemistry*, **1997**, *43*, (4), 680-685.

[83] Piro, A.; Tagarelli, G.; Lagonia, P.; Tagarelli, A.; Quattrone, A., Casimir Funk: His Discovery of the Vitamins and Their Deficiency Disorders. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2010**, *57*, (2), 85-88.

[84] Combs, G.F. *The vitamins : fundamental aspects in nutrition and health*. 3rd ed. Elsevier Academic Press: Burlington, Mass., **2008**.

[85] Barber, T.; Esteban-Pretel, G.; Pilar Marin, M.; Timoneda, J., Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. *Nutrients*, **2014**, *6*, (11), 4984-5017.

[86] McCollum, E.V.; Davis, M., The necessity of certain lipins in the diet during growth. *Journal of Biological Chemistry*, **1913**, *15*, (1), 167-175.

[87] Zhong, M.; Kawaguchi, R.; Kassai, M.; Sun, H., Retina, Retinol, Retinal and the Natural History of Vitamin A as a Light Sensor. *Nutrients*, **2012**, *4*, (12), 2069-2096.

[88] O'Byrne, S.M.; Blaner, W.S., Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *Journal of Lipid Research*, **2013**, *54*, (7), 1731-1743.

[89] Palczewski, K., Chemistry and Biology of Vision. *Journal of Biological Chemistry*, **2012**, *287*, (3), 1612-1619.

[90] Debier, C.; Larondelle, Y., Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition*, **2005**, *93*, (2), 153-174.

[91] Doldo, E.; Costanza, G.; Agostinelli, S.; Tarquini, C.; Ferlosio, A.; Arcuri, G.; Passeri, D.; Scioli, M.G.; Orlandi, A., Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. *Biomed Research International*, **2015**, *14*.

[92] Stephensen, C.B., Vitamin A, infection, and immune function. *Annual Review of Nutrition*, **2001**, *21*, 167-192.

[93] Goodman, D.S., Vitamin A and retinoids in health and disease. *New England Journal of Medicine*, **1984**, *310*, (16), 1023-1031.

[94] Hathcock, J.N.; Hattan, D.G.; Jenkins, M.Y.; McDonald, J.T.; Sundaresan, P.R.; Wilkening, V.L., Evaluation of vitamin A toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1990**, *52*, (2), 183-202.

[95] Karthik, S.V.; Campbell-Davidson, D.; Isherwood, D., Carotenemia in infancy and its association with prevalent feeding practices. *Pediatric Dermatology*, **2006**, *23*, (6), 571-573.

[96] Abbott, B.D.; Harris, M.W.; Birnbaum, L.S., ETIOLOGY OF RETINOIC ACID-INDUCED CLEFT-PALATE VARIES WITH THE EMBRYONIC STAGE. *Teratology*, **1989**, *40*, (6), 533-553.

[97] Singh, V.K.; Beattie, L.A.; Seed, T.M., Vitamin E: tocopherols and tocotrienols as potential radiation countermeasures. *Journal of Radiation Research*, **2013**, *54*, (6), 973-988.

- [98] Herrmann, W.; Obeid, R. *Vitamins in the prevention of human diseases*. Walter de Gruyter: Berlin ; New York, **2011**.
- [99] Zingg, J.-M., Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*, **2007**, *28*, (5-6), 400-422.
- [100] Brigelius-Flohe, R.; Kelly, F.J.; Salonen, J.T.; Neuzil, J.; Zingg, J.M.; Azzì, A., The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2002**, *76*, (4), 703-716.
- [101] Colombo, M.L., An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol-Perspectives. *Molecules*, **2010**, *15*, (4), 2103-2113.
- [102] Tucker, J.M.; Townsend, D.M., Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2005**, *59*, (7), 380-387.
- [103] Traber, M.G.; Atkinson, J., Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, **2007**, *43*, (1), 4-15.
- [104] Aslam, A.; Misbah, S.A.; Talbot, K.; Chapel, H., Vitamin E deficiency induced neurological disease in common variable immunodeficiency: two cases and a review of the literature of vitamin E deficiency. *Clinical Immunology*, **2004**, *112*, (1), 24-29.
- [105] Corrigan, J.J.; Marcus, F.I., COAGULOPATHY ASSOCIATED WITH VITAMIN-E INGESTION. *Jama-Journal of the American Medical Association*, **1974**, *230*, (9), 1300-1301.
- [106] Urbanek, L.; Solichova, D.; Melichar, B.; Dvorak, J.; Svobodova, I.; Solich, P., Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, *573*, 267-272.
- [107] Krcmova, L.; Solichova, D.; Plisek, J.; Kasparova, M.; Sobotka, L.; Solich, P., Miniaturisation of solid phase extraction method for determination of retinol, alpha- and gamma-tocopherol in human serum using new technologies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2010**, *90*, (2), 106-114.
- [108] Plisek, J.; Kasparova, M.; Solichova, D.; Krcmova, L.; Kucerova, B.; Sobotka, L.; Solich, P., Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk. *Talanta*, **2013**, *107*, 382-388.
- [109] Kasparova, M.; Plisek, J.; Solichova, D.; Krcmova, L.; Kucerova, B.; Hronek, M.; Solich, P., Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk. *Talanta*, **2012**, *93*, 147-152.
- [110] Bliesner, M., D. *Validating Chromatographic Methods - A Practical Guide*. Wiley-Interscience: New Jersey, **2006**.
- [111] Kucerova, B.; Krcmova, L.; Solichova, D.; Plisek, J.; Solich, P., Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, **2013**, *36*, (14), 2223-2230.
- [112] Krcmova, L.; Urbanek, L.; Solichova, D.; Kasparova, M.; Vlckova, H.; Melichar, B.; Sobotka, L.; Solich, P., HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *Journal of Separation Science*, **2009**, *32*, (15-16), 2804-2811.
- [113] Citova, I.; Havlikova, L.; Urbanek, L.; Solichova, D.; Novakova, L.; Solich, P., Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, *388*, (3), 675-681.

- [114] Guiochon, G., Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1168*, (1-2), 101-168.
- [115] David, J.A.; Paksi, J.; Naito, H.K., Separation of lipoprotein (LP) fraction by the Beckman TL-100 table-top ultracentrifuge (UC). *Clinical Chemistry*, **1986**, *32*, (6), 1094-1094.

9. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ A PŘÍSPĚVKŮ

9.1. PRÁCE PUBLIKOVANÉ V ČASOPISECH

Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk

Kašparová M., Plíšek J., Solichová D., Krčmová L., Kučerová B., Hronek M., Solich P.
Talanta 93, 2012, p. 147-152 (citováno 2x, IF₂₀₁₂ – 3,498)

Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk

Plíšek J., Kašparová M., Solichová D., Krčmová L., Kučerová B., Sobotka L., Solich P.
Talanta 107, 2013, p. 382-388 (citováno 0x, IF₂₀₁₃ – 3,511)

Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography

Kučerová B., Krčmová L., Solichová D., Plíšek J., Solich P.
Journal of separation science 35 (14), 2013, p. 2223-2230 (citováno 2x, IF₂₀₁₃ – 2,594)

The effect of LDL-apheresis and rheohaemapheresis treatment on vitamin E

Solichová D., Bláha M., Aufartová J., Kujovská Krčmová L., Plíšek J., Honegrová B., Kasalová E., Lánská M., Urbánek L., Sobotka L.
Journal of Nutritional Science and Vitaminology 61, 2015, p. 105-112 (citováno 0x, IF₂₀₁₄ – 0,827)

Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis

Aufartová J., Bláha M., Kasalová E., Honegrová B., Červinková B., Kujovská Krčmová L., Plíšek J., Lánská M., Sobotka L., Solichová D.
Biomedical Papers 159 (3), 2015, p. 400-406 (citováno 0x, IF₂₀₁₄ – 1,200)

Web of Science 4. prosince 2015:

IF souhrnný: 11,630

Počet citací bez autocitací: 4

9.2. PŘEHLED POSTEROVÝCH SDĚLENÍ

Prezentující autor:

Application of modern stationary phases for determination of retinol and α -tocopherol in biological material by UHPLC

Kučerová B., Krčmová L., Plíšek J., Kašparová M., Solichová D., Solich P.

36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011), Budapest, Hungary, 19. – 23. 6. 2011

Stability of the evaporative residue of retinol and α -tocopherol extracts from human breast milk

Kučerová B., Plíšek J., Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Solich P.

Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications (IMA 2011), Chania, Crete, Greece, 18. – 22. 9. 2011

Stability of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk during its processing and storage in the Milk Bank

Kučerová B., Kasalová E., Plíšek J., Krčmová L., Straková H., Měřička P., Solichová D.

12th International Nutrition & Diagnostic Conference (INDC 2012), Praha, ČR, 27. 8. – 30. 8. 2012

Development of new HPLC method for determination of retinol, alpha- and gamma-tocopherol using High Resolution monolithic column for bioanalysis

Kučerová B., Krčmová L., Solichová D., Solich P.

39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2013), Amsterdam, Netherlands, 16. – 20. 6. 2013

Spoluautor:

Development and validation of method for retinol and -tocopherol analysis in breast milk by HPLC-DAD using core-shell technology

Plíšek J., Kašparová M., Vlčková H., Kučerová B., Krčmová L., Solichová D., Solich P.

36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011), Budapest, Hungary, 19. – 23. 6. 2011

New Way Of Sample Preparation Technique And Its Using in Clinical Research

Plíšek J., Kašparová M., Kučerová B., Krčmová L., Solichová D., Solich P.

Nordic Separation Science Society 6th Conference: Electromembrane Extraction, Riga, Latvia, 24. – 27. 8. 2011

Advantageous Combination of Ultra Fast Liquid Chromatography and New Column Technologies for Clinical Testing of Liposoluble Vitamins

Kašparová M., Plíšek J., Kučerová B., Krčmová L., Matysová L., Havlíková L., Solichová D.

Nordic Separation Science Society 6th Conference: Electromembrane Extraction, Riga, Latvia, 24. – 27. 8. 2011

LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia is not associated with any harmful changes in pro- and antioxidative balance

Bláha M., Kašparová M., Bláha V., Lánská M., Filip S., Plíšek J., Slanařová M., Svobodová I., Kučerová B., Solichová D.

International Society for Apheresis Congress 2011, Vienna, Austria 14. 9. - 17. 9. 2011, poster oceněný 1st poster prize

New monolithic stationary phases tested by UHPLC

Krčmová L., Kučerová B., Solichová D., Solich P.

The International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2012 (HPLC 2012), Anaheim, California, USA, 16. 6. - 21. 6. 2012

Importance of vitamin A, E and D monitoring in elderly

Aufartová J., Plíšek J., Krčmová L., Kasalová E., Červinková B., Kučerová B., Hegerová P., Dědková Z., Solichová D., Sobotka L., Solich P.

XXIX. Mezinárodní kongres Společnosti klinické výživy a intenzivní metabolické péče, Hradec Králové, ČR, 7. - 9. 3. 2013

Application of Modern Separation Tools in Clinical Research of Liposoluble Vitamins

Solichová D., Krčmová L., Plíšek J., Aufartová J., Kasalová E., Kučerová B., Solich P.

9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, 4. - 6. 9. 2013 – oceněný poster patřící mezi 12 nejlepších na konferenci

Modern Sample Preparation Tools for Clinical Research

Solichová D., Kujovská Krčmová L., Plíšek J., Aufartová J., Kasalová E., Červinková B., Honegrová B., Solich P., Sobotka L.

16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies – ExTech 2014, Chania, Crete, Greece, 25. – 28. 5. 2014

Modern Separation of Liposoluble Vitamins in Clinical Research

Solichová D., Kujovská Krčmová L., Plíšek J., Aufartová J., Kasalová E., Honegrová B., Solich P.

9th International Conference on Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications (IMA 2015), Kalamanta, Greece, 20. - 24. 10. 2015

9.3. PŘEDNÁŠKY PREZENTOVANÉ NA KONFERENCÍCH

Prezentující autor:

Stability of retinol and α -tocopherol in human breast milk

Kučerová B., Plíšek J., Hrůšová E., Solichová D., Solich P

2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR, 31. 1. - 1. 2. 2012

Monitoring of alpha-tocopherol and retinol in patients treated by extracorporeal elimination of lipoproteins

Kučerová B., Plíšek J., Solichová D., Bláha M., Sobotka L., Solich P.

3. Postgraduální & 1. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR, 29. - 30. 1. 2013

Development of new HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha- and gamma-tocopherol using High Resolution monolithic column for bioanalysis

Honegrová B., Kujovská Krčmová L., Solichová D., Solich P.

4. Postgraduální & 2. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR, 28. - 29. 1. 2014

Spoluautor:

Advantages of monolithic columns in combination with modern technologies for HPLC analysis in clinical research

Krčmová L., Solichová D., Kašparová M., Plíšek J., Kučerová B., Solich P.

11th International Nutrition & Diagnostic Conference (INDC 2011), Brno, ČR, 28. 8. - 31. 8. 2011

Determination of retinol and alpha-tocopherol in biological fluids by UFLC and HPLC with various modern sample preparation techniques

Krčmová L., Solichová D., Kašparová M., Plíšek J., Kučerová B., Sobotka L., Solich P.

Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications (IMA 2011), Chania, Crete, Greece, 18. – 22. 9. 2011

HPLC method for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk using core-shell technology

Plíšek J., Kašparová M., Kučerová B., Solichová D., Solich P.

2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR, 31. 1. -1. 2. 2012

Extracorporeal techniques connected to modern analytical methods in clinical research

Krčmová L., Solichová D., Bláha M., Bláha V., Kašparová M., Plíšek J., Kučerová B., Hrušová E., Solich P.

12th International Nutrition & Diagnostic Conference (INDC 2012), Praha, ČR, 27. 8. – 30. 8. 2012

Effect of pasteurization and storage on α -tocopherol and retinol in human breast milk

Kasalová E., Honegrová B., Solichová D., Solich P.

4. Postgraduální & 2. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR, 28. - 29. 1. 2014

9.4. SPOLUÚČAST NA ŘEŠENÝCH GRANTECH

Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NS/9743: Patogeneze malnutrice při renálním selhání a vliv léčebné intervence

Hlavní řešitel: prof. MUDr. Vladimír Bláha, CSc.

Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NT/13566: Tkáňové trauma a pooperační stres u pacientek s chirurgicky léčenými časnými stádii karcinomu endometria

Hlavní řešitel: prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.

Hlavní řešitel ve Fakultní nemocnici HK: doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.

Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NT/14265: Využití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů pro klinickou praxi

Hlavní řešitel: RNDr. Lenka Krčmová Kujovská, Ph.D.

Spoluřešitel grantu FRVŠ 121/2013/G6: Optimalizace extrakce na pevné fázi pro chromatografické stanovení vitamínů A a E v biologickém materiálu – jako úloha do praktického cvičení

Hlavní řešitel: Mgr. Eva Kasalová

10. PŘÍLOHY

10.1.PŘÍLOHA I. RAPID SAMPLE PREPARATION PROCEDURE FOR DETERMINATION OF RETINOL AND ALPHA-TOCOPHEROL IN HUMAN BREAST MILK

Kašparová M., Plíšek J., Solichová D., Krčmová L., Kučerová B., Hronek M., Solich P.
Talanta 93, 2012, p. 147-152 (citováno 2x, IF₂₀₁₂ – 3,498)



Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and α -tocopherol in human breast milk

Markéta Kašparová^{a,b}, Jiří Plíšek^{a,b}, Dagmar Solichová^{b,*}, Lenka Krčmová^{a,b}, Barbora Kučerová^{a,b}, Miloslav Hronek^c, Petr Solich^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^c Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2011

Received in revised form 27 January 2012

Accepted 31 January 2012

Available online 7 February 2012

Keywords:

Human breast milk

Retinol

α -Tocopherol

LLE

Sample preparation

Monolithic column

ABSTRACT

The liposoluble vitamins (retinol and α -tocopherol) concentration in human breast milk is of a cardinal knowledge especially for nutrition of prematurely born. It enables the feeding optimization of these important micronutrients for preterm infants.

The novel rapid liquid–liquid extraction procedure for human breast milk investigation was developed and validated according to FDA guidelines. The recovery of retinol was 82–90% measured at three concentration levels 1.0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{mol/L}$, for α -tocopherol 92–109% at concentration levels 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$. The repeatability of extraction procedure expressed as relative standard deviation was 3.26% for retinol and 4.79% for α -tocopherol.

Developed extraction procedure was applied on 120 human breast milk samples. The separation of vitamins was completed using advantages of a monolithic column which accomplished demands of acceleration made by modern bio-analytical HPLC methodology. The analytes of interest were detected by diode-array detector at wavelengths 325 nm for retinol and 290 nm for α -tocopherol.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The World Health Organization recommends full breastfeeding for the first 6 months of life. Milk is the sole source of liquids, nutrition, vitamins, minerals and immunity oligosaccharides during this time. Concentrations of breast milk constituents are influenced by several factors including stage of lactation, breastfeeding routine, age and others. The liposoluble vitamins concentration in human breast milk is of a cardinal knowledge especially for nutrition of prematurely born. Therefore rapid, uncomplicated and inexpensive sample preparation and quantification procedure for human breast milk investigation is demanded.

The protective role of α -tocopherol, the major fat soluble antioxidant of the body, is the best achieved at plasma concentration observed in adults [1]. Connections between α -tocopherol deficiency and higher risk of oxidants stress [2,3], haematological [4] and neuromuscular [5] diseases are well known. Many events leading to overproduction of free radicals may easily induce oxidative

stress in the earliest phases of human life [6,7]. An effort to minimize free radical production and promote the development of adequate antioxidant systems through an adequate nutritional strategy is the main task of modern neonatology. Prematurity is associated with protracted oxidative stress [8,9] and mother's milk helps to reduce the consequences by providing protective substance [10].

Retinol is involved in the regulation and promotion of growth and differentiation of epithelial cells and the cells of many tissues (skin, mucous membranes, blood vessel walls and the cornea) therefore the need for retinol is critical during periods of rapid growth and tissue development [11]. It also maintains the integrity of respiratory tract epithelial cells [12,13]. Retinol is also essential to ensure a good functioning of the adaptive immunity, deficiency diminishes antibody-mediated response and consequent changes in mucosal epithelial regeneration [14]. Blood concentrations below 0.70 $\mu\text{mol/L}$ have been considered deficient in premature infants and concentrations below 0.35 $\mu\text{mol/L}$ indicate severe deficiency and depleted liver reserves.

Milk concentrations of major constituents such as fat and protein can differ substantially. The total lipid content increases significantly with time of lactation from 1.99 ± 0.25 g/dL in colostrum up to 3.89 ± 0.28 g/dL in mature milk [15]. Protein content of colostrum, transitional and mature human milk differs from 1.88 ± 0.4 g/dL to 1.35 ± 0.3 g/dL, respectively. Statistical variation

Abbreviations: AOAC, association of official analytical chemists; FDA, food and drug administration; LLE, liquid–liquid extraction; RSD, relative standard deviation; SD, standard deviation; t_R , retention time of analyte.

* Corresponding author. Tel.: +420 495832429; fax: +420 495834841.

E-mail address: solich@lfhk.cuni.cz (D. Solichová).

0039-9140/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.talanta.2012.01.065

($P < 0.05$) was observed also with effect of diurnality or nocturnality [16]. Therefore sample preparation procedure has to be robust and effective at major constituent removal (saponification and deproteinization). To complicate the situation even more, also the concentrations of vitamins and other micronutrients can be highly variable. Retinol [17] and α -tocopherol [18] concentrations decrease from colostrums (5–7 $\mu\text{mol/L}$ and 22.3–44.2 $\mu\text{mol/L}$) to transitional milk (3–5 $\mu\text{mol/L}$ and 10.4–16.3 $\mu\text{mol/L}$) and finally to mature milk (1.4–2.6 $\mu\text{mol/L}$ and 7.2–10.9 $\mu\text{mol/L}$). The vitamin levels in human breast milk and vitamin supplementation were investigated many times [19–23] in different countries.

During last 5 years several approaches for retinol and α -tocopherol determination were published but HPLC/UHPLC is dominant [24–27]. The aim of modern analytical method is to accomplish demand of acceleration. In comparison with classical particle columns the usage of a monolithic column enables shortening of analysis because of better mass transfer properties ensured by monolithic skeleton. The structure of monoliths favors high-speed separations while maintaining low back pressure.

Liquid–liquid extraction (LLE) is still frequently used for sample treatment although in the last 10 years there is an obvious tendency to substitute it by modern extraction procedures as solid phase extraction (SPE), microextraction by packed sorbent (MEPS) or even to skip the sample pretreatment. Adequate conditions must be applied to free up retinol and α -tocopherol from milk matrix components and lipophilic milieu (lipoproteins, fat droplets) [28], which most create competitive conditions for organic extraction solvent. Enzymatic [29] or supercritical fluid extraction [30] has been described nevertheless classical extraction by *n*-hexane after saponification by basic condition [31–34] or without saponification [35,36] was utilized many times for a sample treatment.

Various samples (mainly with higher fat content) necessitate saponification. Completing of fat digestion depends mainly on applied time and temperature. The determination of liposoluble vitamins in milk is often realized after lipid elimination (saponification) [26,37]. A complete saponification process takes overnight at room temperature as used by traditional methods [38,39], but increasing temperature to 80 °C [40,41] enables shortening of time up to 30 min. Association of Official Analytical Chemists' (AOAC) International provides fully validated reference methods for retinol [42] and α -tocopherol [43] in which saponification takes place at 70 °C and for 25 or 30 min. Necessity of saponification, which is in principle additional step and therefore source of errors during sample treatment, was tested several times.

The objective of this work was to develop and validate appropriate extraction procedure for retinol and α -tocopherol from human breast milk. The procedure was expected to meet the demands of modern analytical procedure: simplicity, accessibility, robustness and specificity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standards of retinol and DL- α -tocopherol were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic).

Reagent water was purified by reverse osmosis and filtration Ultrapure water system, Goro (Prague, Czech Republic). Methanol, gradient HPLC-grade used as a mobile phase and *n*-hexane were purchased from Scharlau Chemie (Sentmenat, Spain). Absolute ethanol and acetonitrile gradient grade for liquid chromatography were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Potassium hydroxide–pellets, pure Ph. Eur., NF was purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany) and L-ascorbic

acid purris p.a. from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Hydrochloric acid 35% p.a. was obtained from Penta (Prague, Czech republic).

Stock solutions of retinol and α -tocopherol were prepared as follows. Retinol stock solution was prepared at the concentration 2 mmol/L in methanol and then diluted to the calibration solutions. α -Tocopherol standard was firstly dissolved in *n*-hexane (2 mmol/L), consecutive dilutions were made by methanol.

Solutions of potassium hydroxide at concentrations 5, 10 and 15 mol/L and L-ascorbic acid (0.1 mol/L) were prepared by dissolving weighted amount of substance in distilled water.

Hydrochloric acid 1 mol/L was prepared by dilution of concentrated (35%) acid using distilled water. Distilled water pH values (6.2, 5.2, 4.2 and 3.2) were adjusted by 1 mol/L hydrochloric acid. Changes were monitored by pH meter.

2.2. Instrumentation

Orbital shaker LabDancer V IKA (Staufen, Germany) was utilized for stirring before sample deproteinization as well as saponification and the horizontal laboratory shaker LT1 Kavalier (Votice, Czech Republic) for extraction procedure. Thermo block, Transsonic Ultrasonic Cleaning Units TP 680 DP Elma (Singen, Germany) and thermostat Stericell BMT (Brno, Czech Republic) were utilized for heating during saponification. Centrifuge 5810-R Eppendorf (Prague, Czech Republic) accommodated with Swing-bucket Rotor A–4–62 was used for separation of *n*-hexane and aqueous layer during liquid–liquid extraction. The laboratory vacuum evaporator Concentrator 5301 Eppendorf (Hamburg, Germany) was used for evaporation of organic layer after extraction. pH meter Argus χ Sentron (Roden, Netherlands) was utilized for pH adjusting.

Target analytes retinol and α -tocopherol were quantified on the HPLC device Prominence Shimadzu (Kyoto, Japan) composed by Rack changer/C autosampler for microtitrate plates, Degasser DGU-20A5, Column Oven CTO – 20 AC, Diode array detector SPD – M20A and Communication bus module CBM-20A.

2.3. Sample pretreatment

Samples of human breast milk were obtained from University Hospital Hradec Kralove. The University Hospital ethical committee approved the protocol of this study.

Milk samples were stored frozen at –28 °C. Before the extraction material was left to thaw and homogenized by constant mixing at water bath warmed up to 37 °C. Homogenized volume of human breast milk was partitioned to obtain representative analytical sample.

2.4. HPLC determination

Liposoluble vitamins retinol and α -tocopherol were measured by HPLC method [44], which was recently optimized for biological material analysis in Research laboratory of Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital Hradec Kralove. Separation of vitamins was performed using the Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm monolithic column Merck (Darmstadt, Germany). As the mobile phase 100% methanol was used at the flow rate of 2.5 mL/min. The DAD detection of retinol and α -tocopherol was carried out at 325 and 295 nm, respectively. Limit of detection and limit of quantification were 0.13 and 0.27 $\mu\text{mol/L}$ for retinol, for α -tocopherol 0.09 and 0.19 $\mu\text{mol/L}$ [44].

Table 4
Influence of pH on the extraction.

pH of water	6.2	5.2	4.2	3.2
Retinol $c \pm SD^a$ (D^b)	1.1 \pm 0.2 (84)	1.4 \pm 0.3 (100)	1.1 \pm 0.1 (78)	1.1 \pm 0.1 (81)
α -Tocopherol $c \pm SD^a$ (D^b)	11.6 \pm 1.1 (93)	12.4 \pm 1.0 (100)	10.9 \pm 0.7 (88)	10.8 \pm 0.6 (88)

^a Measured concentration of vitamins \pm standard deviation, $n = 4$.

^b Percentage decrease of concentration.

Table 5
Validation of the extraction process.

		Retinol				α -Tocopherol			
Recovery	c^a ($\mu\text{mol/L}$)	1.0	2.5	5.0	2.5	5.0	10.0		
	recovery (%)	86	82	90	109	95	92		
	% RSD	10	4	7	0.5	2	2		
Repeatability	$c \pm SD^b$ ($\mu\text{mol/L}$)	1.24 \pm 0.04				7.7 \pm 0.4			
	% RSD	3				5			
Precision	$c \pm SD^c$ ($\mu\text{mol/L}$)	0.80 \pm 0.08				6.3 \pm 0.4			
	% RSD	10				7			
		1 ^f	2 ^g	3 ^h	4 ⁱ	1 ^f	2 ^g	3 ^h	4 ⁱ
Inter-day repeatability	$c \pm SD$ ($\mu\text{mol/L}$)	0.78 \pm 0.04	0.77 \pm 0.07	0.61 \pm 0.05	0.61 \pm 0.03	6.0 \pm 0.4	5.0 \pm 0.3	5.2 \pm 0.3	5.4 \pm 0.5
	c_d^d ($\mu\text{mol/L}$)	–	0.01	0.17	0.18	–	0.6	0.7	0.5
	D^e (%)	–	1.07	22.0	22.6	–	9.5	11.8	9.0
	% RSD	5	7	14	14	6	8	8	8

^a Concentration of vitamins which were used for milk samples spiking ($n = 6$).

^b Average concentration of vitamins \pm standard deviation ($n = 6$).

^c Average concentration of vitamins \pm standard deviation ($n = 30$).

^d Decrease of concentration ($\mu\text{mol/L}$) correlated to value of day 1.

^e Percentage decrease of concentration.

^f Average values and standard deviation calculated from 6 samples.

^g Average values calculated from 12 samples.

^h Average values calculated from 18 samples.

ⁱ Average values calculated from 24 samples.

Average concentration of α -tocopherol was $7.7 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ (5% RSD). Repeatability of both vitamins fulfills FDA recommended criteria (% RSD $\leq 15\%$).

Inter-day repeatability was determined during 4 consecutive days. 25 mL of pasteurized and frozen human breast milk was warmed up to 37°C and pipetted under constant shaking (to obtain aliquot homogeneous samples) into the 1.5 mL eppendorf tubes. Six samples were processed by the extraction procedure and measured. Obtained results correspond to the values day 1. The rest of aliquots was stored (-28°C) and determined by HPLC in subsequent days (days 2, 3 and 4). Obtained concentrations of retinol and α -tocopherol are summarized in Table 5.

Inter-day repeatability was evaluated by calculation of % RSD of measured concentrations. Standard deviation was correlated to the measured concentration of day 1 and number of samples for calculation has increased from 6 (day 1) to 12, 18 and finally 24 (day 4). Repeatability of both vitamins meets recommendation of FDA, nevertheless α -tocopherol showed stable values (6–8% RSD). On the contrary the retinol values showed relevant increasing tendency of % RSD corresponding to decrease of concentration.

Table 6
Changing of retinol concentration during lactating stages.

Month postpartum	1–2	3–4	5–6	9–12
Retinol $c \pm SD^a$ ($\mu\text{mol/L}$)	1.6 \pm 1.0	1.1 \pm 0.9	0.8 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4
t -Test paired (p^b)		0.432591	0.037633	0.010787
α -Tocopherol $c \pm SD$ ($\mu\text{mol/L}$) ^a	9.2 \pm 3.3	8.7 \pm 3.9	8.4 \pm 3.5	9.3 \pm 3.1
t -Test paired (p^b)		0.724082	0.666137	0.504903

^a Concentrations of measured vitamins \pm standard deviation ($n = 12$).

^b Statistical evaluation.

3.2.3. Precision

Interpersonal precision was investigated by two different analysts during one day. Each of them extracted 15 individual samples of breast milk. The % RSD of all measured concentrations ($n = 30$) for retinol ($0.80 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$) was 10% and for α -tocopherol ($6.3 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) it was 7%.

3.3. Method application

Randomized group of 27 women (age 29 ± 4 years) at different lactating stages (1–2, 3–4, 5–6 and 9–12 months postpartum) was selected for the screening of vitamins. The samples about 25 mL were stored maximally 2 years at -86°C than the whole volume was warmed up to laboratory temperature and consequently pasteurized. Homogeneous aliquots pipetted under constant shaking into the 1.5 mL eppendorf tubes were stored till measurement at -28°C .

The differences among samples of 12 women originated from four lactating stages were tested by statistical software NCSS (Kaysville, USA), non-parametric paired t -test (Wilcoxon) was used. The results of analyses are shown in Table 6. Concentrations of retinol ($n = 12$) proved statistical differences at 5%

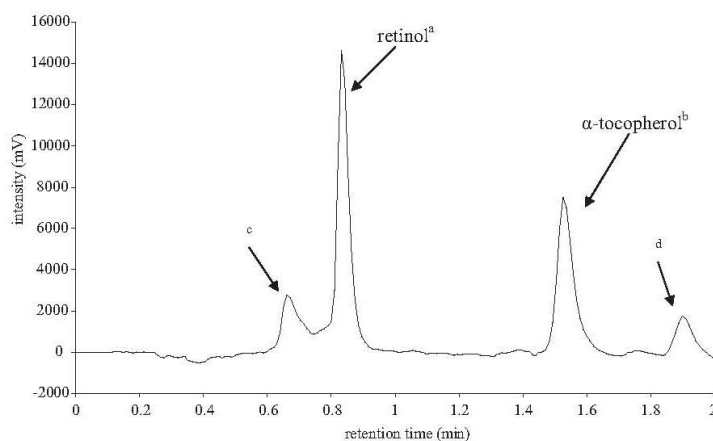


Fig. 1. Chromatogram of real sample human breast milk (lactating stage: 4 months). ^aRetinol ($t_R = 0.83$ min, $c = 1.17$ $\mu\text{mol/L}$, detected at 325 nm). ^b α -Tocopherol ($t_R = 1.52$ min, $c = 21.22$ $\mu\text{mol/L}$ detected at 295 nm). ^{c,d}Peaks of impurity. Void time (t_0) was measured in retention time 0.59 min.

significance among stages 1–2/5–6 and 1–2/9–12 on the contrary of α -tocopherol ($n = 12$). A typical chromatogram of retinol and α -tocopherol in real sample of human breast milk (lactating stage—3 months postpartum) is depicted in Fig. 1.

4. Conclusion

Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and α -tocopherol in human breast milk was developed and validated. Extraction recovery of both vitamins fulfils FDA recommended criteria (retinol $86 \pm 4\%$ and α -tocopherol $99 \pm 10\%$) as well as repeatability (retinol 1.24 ± 0.04 $\mu\text{mol/L}$, RSD 3% and α -tocopherol 7.7 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$, RSD 5%). Carrying out of the extraction process has only a little workmanship requirements on a technician. Preparation of 10 samples is possible to complete during 90 min.

HPLC separation was performed using the monolithic column the Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm and 100% methanol as the mobile phase at a flow rate of 2.5 mL/min were utilized for the determination of retinol and α -tocopherol. The detection was carried out at 325 and 295 nm, respectively. The time of analysis was 2.0 min.

The newly developed extraction method was used for analysis of real breast milk samples. Randomized group of 27 women was selected for retinol and α -tocopherol human breast milk screening. The study group ($n = 12$) implied mothers at different lactating stages (1–2, 3–4, 5–6 and 9–12 months postpartum). Concentrations of retinol proved statistical differences at 5% significance among stages 1–2/5–6 and 1–2/9–12 on the contrary of α -tocopherol.

According to FDA guidelines, the newly developed extraction procedure was evaluated as suitable for analysis of human breast milk.

Acknowledgment

This work was supported by Grant Agency of Charles University in Prague (GAUK) project No 124809/2011 and project SVV-2012-265-002.

References

[1] G.R. Gutcher, W.J. Raynor, P.M. Farrell, *Am. J. Clin. Nutr.* 40 (1984) 1078–1089.

[2] J.K. Friel, S.M. Martin, M. Langdon, G.R. Herzberg, G.R. Buettner, *Pediatr. Res.* 51 (2002) 612–618.

[3] J.M. Davis, R.L. Auten, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15 (2010) 191–195.

[4] F.A. Oski, L.A. Barness, *J. Pediatr.* 70 (1967) 211–220.

[5] H.M. Nitowsky, J.T. Tildon, S. Levin, H.H. Gordon, *Am. J. Clin. Nutr.* 10 (1962) 368–378.

[6] O.D. Saugstad, *Biol. Neonatol.* 88 (2005) 228–236.

[7] R.F. Grasso, C.C. Quattrocchi, S. Piciucchi, G. Perrone, F. Salvinelli, C. Rabbitti, B.B. Zobel, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 1803–1805.

[8] G. Buonocore, S. Perrone, M. Longini, P. Vezzosi, B. Marzocchi, P. Paffetti, R. Bracci, *Pediatr. Res.* 52 (2002) 46–49.

[9] O.M. Pitkänen, M. Hallman, *Semin. Neonatol.* 3 (1998) 199–205.

[10] A. Ledo, A. Arduini, M.A. Asensi, J. Sastre, R. Escrig, M. Brugada, M. Aguar, P. Saenz, M. Vento, *Am. J. Clin. Nutr.* 89 (2009) 210–215.

[11] B.D. Benoist, J. Martinez, T. Goodman, *Food Nutr. Bull.* 22 (2001) 213–245.

[12] E. Gitto, S. Pellegrino, P. Gitto, I. Barberi, R.J. Reiter, *J. Pineal Res.* 46 (2009) 128–139.

[13] B.A. Darlow, P.J. Graham, *Cochrane Datab. Syst. Rev.* (2007), CD000501.

[14] C.B. Stephensen, *Annu. Rev. Nutr.* 21 (2001) 167–192.

[15] R.A. Ehrenkranz, B.A. Ackerman, C.M. Nelli, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3 (1984) 755–758.

[16] C.L.S. Lopez, A. Hernandez, A.B. Rodriguez, M. Rivero, C. Barriga, J. Cubero, *Nutr. Hosp.* 26 (2011) 511–514.

[17] G.F. Combs, *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 3rd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston, 2008.

[18] E.R. Boersma, P.J. Offringa, F.A.J. Muskiet, W.M. Chase, I.J. Simmons, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 1197–1204.

[19] A. Antonakou, A. Chiou, N.K. Andrikopoulos, C. Bakoula, A.L. Matalas, *Eur. J. Nutr.* 50 (2011) 195–202.

[20] O. Tokusoglu, N. Tansug, S. Aksit, G. Dinc, E. Kasirga, C. Ozcan, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59 (2008) 166–174.

[21] A.L. Webb, S. Aboud, J. Furtado, C. Murrin, H. Campos, W.W. Fawzi, E. Villamor, *Eur. J. Clin. Nutr.* 63 (2009) 332–339.

[22] L. Garcia, K. Ribeiro, K. Araujo, J. Pires, G. Azevedo, R. Dimenstein, *J. Hum. Nutr. Diet.* 23 (2010) 529–534.

[23] R. Dimenstein, J.C.D. Dantas, A.C.P. Medeiros, L.R.D. Cunha, *Arch. Latinoam. Nutr.* 60 (2010) 235–239.

[24] P. Sadilek, D. Satinsky, M. Ot'apka, R. Sladkovsky, P. Solich, *Curr. Anal. Chem.* 5 (2009) 311–315.

[25] A. Khan, M.I. Khan, Z. Iqbal, Y. Shah, L. Ahmad, D.G. Watson, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 2339–2347.

[26] B. Chauveau-Duriot, M. Doreau, P. Nozriere, B. Graulet, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 777–790.

[27] D. Siluk, R.V. Oliveira, M. Esther-Rodriguez-Rosas, S. Ling, A. Bos, L. Ferrucci, I.W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 1001–1007.

[28] F.J. Ruperez, D. Martin, E. Herrera, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 45–69.

[29] Y. Liu, M.J. Xu, L.M. Canfield, *J. Nutr. Biochem.* 9 (1998) 178–183.

[30] H. Berg, C. Turner, L. Dahlberg, L. Mathiasson, *J. Biochem. Biophys. Methods* 43 (2000) 391–401.

[31] M. Kamao, N. Tsugawa, Y. Suhara, A. Wada, T. Mori, K. Murata, R. Nishino, T. Ukita, K. Uenishi, K. Tanaka, T. Okano, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 859 (2007) 192–200.

[32] E. Kondyli, M.C. Katsiari, L.P. Voutsinas, *Food Chem.* 100 (2007) 226–230.

[33] M.S. Havemose, M.R. Weisbjerg, W.L.P. Bredie, H.D. Poulsen, J.H. Nielsen, *J. Dairy Sci.* 89 (2006) 1970–1980.

[34] M. Zahar, D.E. Smith, *J. Dairy Sci.* 73 (1990) 3402–3407.

- [35] C. Molto-Puigmartí, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4388–4394.
- [36] M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 132–137.
- [37] O. Korchazhkina, E. Jones, M. Czauderma, S.A. Spencer, J. Kowalczyk, Acta Chromatogr. 16 (2006) 48–57.
- [38] S. Albala-Hurtado, S. Novella-Rodriguez, M.T. Veciana-Nogues, A. Marine-Font, J. Chromatogr. A 778 (1997) 243–246.
- [39] G. Brubacher, W. Müller-Mulot, D.A.T. Southgate, *Methods for the Determination of Vitamins in Foods*, Elsevier Science Publisher, London, 1985.
- [40] A. Escriva, M.J. Esteve, R. Farre, A. Frigola, J. Chromatogr. A 947 (2002) 313–318.
- [41] M. Strobel, F. Heinrich, H.K. Biesalski, J. Chromatogr. A 898 (2000) 179–183.
- [42] L.B. Thompson, K.J. Schimpf, L.A. Stiner, D.J. Schmitz, J. AOAC Int. 93 (2010) 1523–1529.
- [43] C.J. Blake, J. AOAC Int. 90 (2007) 897–910.
- [44] L. Krcmova, D. Solichova, J. Plisek, M. Kasparova, L. Sobotka, P. Solich, Int. J. Environ. Anal. Chem. 90 (2010) 106–114.
- [45] D.M. Bliesner, *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide*, Wiley, Hoboken, NJ, 2006.

10.2.PŘÍLOHA II. APPLICATION OF CORE-SHELL TECHNOLOGY FOR DETERMINATION OF RETINOL AND ALPHA-TOCOPHEROL IN BREAST MILK

Plíšek J., Kašparová M., Solichová D., Krčmová L., Kučerová B., Sobotka L., Solich P.
Talanta 107, 2013, p. 382-388 (citováno 0x, IF₂₀₁₃ – 3,511)



Application of core–shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk

Jiří Plíšek^{a,b}, Markéta Kašparová^a, Dagmar Solichová^b, Lenka Krčmová^{a,b,*}, Barbora Kučerová^{a,b}, Luboš Sobotka^{b,c}, Petr Solich^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b III. Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^c Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2012

Received in revised form

16 January 2013

Accepted 19 January 2013

Available online 8 February 2013

Keywords:

Alpha-tocopherol

Breast milk

Core–shell technology

Monolithic column

Retinol

ABSTRACT

Breast milk is a main source of fat-soluble vitamins for newborns and it is needful to monitor the nutritional status prior to its application. In this work a novel, high-throughput and low-cost method for monitoring of retinol and alpha-tocopherol in breast milk was developed, validated and compared with reference method using monolithic column.

For this purpose five various porous shell and monolithic columns were tested on the basis of relationship between HETP and linear mobile phase velocity, analysis time and consumption of solvents. Finally the core–shell analytical column Kinetex C₁₈ (2.6 μm, 100 Å, 100 × 4.6 mm) was chosen as the best and optimal values of flow rate, injection volume and temperature of analysis were established.

The detection of retinol and alpha-tocopherol was carried out at 325 and 295 nm, respectively by diode array detector. The LOD 0.004 μmol/L and 0.078 μmol/L, the LOQ 0.012 μmol/L and 0.182 μmol/L for retinol and alpha-tocopherol, respectively were calculated. The validation data showed good linearity, repeatability of retention time with RSD 0.22% and 0.12%, repeatability of peak area with RSD 6.94% and 1.75%, recovery 114.1–116.3% and 99.0–108.6% for retinol and alpha-tocopherol, respectively. Moreover, the newly developed method substantially decreased the solvent consumption by about 263 mL per 100 samples with the total time of analysis 1.75 min in comparison with analysis time 1.80 of the reference method.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidative stress, defined as a disturbance in the balance between the production of reactive oxygen species (free radicals) and antioxidant defences leading to tissue injury [1], plays an important role in the pathogenesis of numerous degenerative or chronic diseases such as atherosclerosis, arthritis, neurodegenerative disorders, coronary heart disease, allergy or cancer [2–9]. Of the non-enzymatic antioxidants, fat-soluble antioxidant vitamins represent an important class that includes all-trans-retinol and alpha-tocopherol [10].

Maternal breast milk must supply enough retinol to meet the needs for growth and for the building up of the liver reserves

during the suckling period to ensure adequate retinol status of the infant after weaning. Concentration level of retinol in breast-milk is correlated significantly with the levels in the plasma of mothers and infants [11]. Retinol plays roles in cell–cell communication, cellular differentiation, and regulation of cell growth and apoptosis. Recently, it was proved that very low plasma retinol and RBP concentrations are associated with night blindness (two point mutations I41N and G75D on the RBP gene) [12] or xerophthalmia [13], the progression of normal to mild cognitive impairment to Alzheimer's disease [14].

Alpha-tocopherol is another important antioxidant and protective factor, especially for infants born prematurely. It represents one of the most abundant forms of vitamin E in plasma and breast milk [15]. Preterm infants may be especially prone to develop clinical symptoms such as hemolytic anemia, characterized by an increased susceptibility of red cells to oxygen due to an insufficient supply of alpha-tocopherol [16]. Furthermore, infants can tend to retrolental fibroplasias, intraventricular hemorrhage and bronchopulmonary dysplasia as a result of alpha-tocopherol deficiency. Because of the lower alpha-tocopherol concentrations in plasma, the preterm infant has a higher requirement for this

Abbreviations: DAD, diode array detector; HETP, Height Equivalent to a Theoretical Plate; R, recovery; RBP, retinol-binding protein; R_s, peak resolution; T_f, tailing factor

* Corresponding author at: Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic. Tel.: +420 495 833 372; fax: +420 495 834 841.

E-mail address: lenkkrcmova@seznam.cz (L. Krčmová).

0039-9140/\$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.031>

vitamin than the full-term infant. The tocopherol content of human milk depends on many factors, such as the stage of lactation and maternal diet [17].

The transfer of fat-soluble vitamins via the placenta is limited and plasma levels are usually low in newborn babies. Colostrum, rich in fat-soluble vitamins, is one important source for newborn or preterm infants [16] and that is why it is needful to monitor concentrations of vitamins before its application.

Several methods have been proposed for the measurement liposoluble vitamins levels. HPLC, using ultraviolet/visible (UV/Vis) or fluorescence detection and particle or monolithic columns, are currently used to measure retinol and alpha-tocopherol in different matrices [2,4,13,17,18]. Clinical laboratories have considerable interest in utilization the new methods with time- and cost-reduction, as permitted, among other things development of new stationary phases.

During last few years new brands of porous shell columns were being commercialized: Halo (Advanced Materials Technology, DE, USA) in 2006, Poroshell (Agilent, Little River, DE, USA), Ascentis Express (Supelco, Bellefonte, USA) and Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, USA) in 2009 [19] and four next generation columns were released in 2011, namely: Accucore (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Nucleoshell (Macherey-Nagel, Düren, Germany), SunShell (Sunniest, Marl, Germany) and Aeris (Phenomenex, Torrance, CA, USA) [20–23].

Monolithic column consist of a single rod of porous material with several unique features in terms of permeability and efficiency. These materials were originally developed by Hjerten et al., Svec and Frechet, Tanaka and Nakanishi during the 1990s [24]. Commercial silica monolith columns are the Chromolith (Merck KgGa, Darmstadt, Germany) and Onyx (Phenomenex, Torrance, California) based upon technology licensed from Merck. The 1st monolith generation has been sold as Chromolith Performance columns by Merck since 2000, and the 2nd generation was announced at the HPLC 2011 conference in Budapest to be introduced to the market as Chromolith High-Resolution columns [25,26]. The silica monolith columns have a bimodal pore size distribution; therefore they have a higher permeability than columns packed with particles having the same size as the skeleton elements of these monolithic columns and allow higher mobile phase velocities to achieve high efficiency or high speed [18,27–29]. The special porous character of the monolithic column allows relatively high flow rates (1–9 mL/min) while keeping the backpressure low. Due to the favorable properties of monolithic materials, the risk of destruction and damage of the column by movement of the sorbent inside the column is eliminated and reliability as well as reproducibility of the analysis are improved [18]. The kinetic efficiency of commercially available the 1st generation monolith columns is comparable to columns packed with 3–4 μm particles [27].

With traditional fully porous 3 μm and 5 μm particles, efficiency decreases significantly as flow rate increases. Speeding up the analysis by increasing the flow rate is, in most cases, accompanied by loss of resolution and sensitivity. Smaller fully porous sub-2 μm particles provide faster chromatographic separations at low HETP but require higher pressure capable instrumentation. Apparently these features have triggered the explosion of interest in the use of small particles and short columns to improve the speed of separation [30].

Another alternative to improve separation efficiencies and speed without reducing particle size is the use of superficially porous particles, also termed porous shell particles. Technology of porous shell particles offers the ultra-high efficiency of sub-3 μm and sub-2 μm particles without generating excessive column backpressure and without updating HPLC instrumentation. Analytes spend less time diffusing into and out of the pores as they

travel through the column. This shorter diffusion path allows for faster mass transfer [31]. The commercialization of porous shell particles presents a new option for HPLC bioanalysis. The 2.7 μm particles of Ascentis Express columns consist of 1.7 μm nonporous solid silica inner core surrounded by 0.5 μm porous silica layer [27,32–34]. The core-shell technology of Kinetex columns produces the 2.6 μm particles, which consist of 1.9 μm nonporous core and 0.35 μm porous silica layer. This technology is using sol-gel processing techniques that incorporate nano-structuring technology; a durable, homogeneous porous shell is grown on a solid silica core [27,35]. As a result Kinetex columns provide roughly 3 \times the efficiency of 5 μm fully porous particles and 2 \times the efficiency of 3 μm fully porous particles without the need for specialized, high pressure instrumentation. A major benefit of the shell particles is the small diffusion path 0.5 μm for Ascentis Express and 0.35 μm for Kinetex. In theory, decreasing the thickness of the porous layer influence a decrease of the C term in the van Deemter plot, which is the cause of different results obtained during analysis [36].

The main purpose of this work was to develop a novel, high-throughput and low-cost method for monitoring of retinol and alpha-tocopherol in the breast milk. Great emphasis was placed on reducing the analysis time and consumption of mobile phase. The advantages and disadvantages of monolithic and porous-shell separation technologies were examined. The separation method was validated and together with pre-separation liquid-liquid extraction procedure was used for determination of liposoluble vitamins in the breast milk.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and columns

The monitored analytes DL-all-rac-tocopherol, purity $\geq 96\%$ and retinol, purity $\geq 99\%$ were purchased from Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic). Ethanol absolute for analysis from MERCK (Darmstadt, Germany), potassium hydroxide pellets pure Ph. from AppliChem (Chemos, Prague, Czech Republic), L-ascorbic acid from Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic) and distilled water GORO (Prague, Czech Republic) were needed for the extraction process. n-Hexan multisolvent HPLC grade ASC UV-vis from Scharlau (Sentmenat, Spain) and methanol super gradient from LAB-SCAN analytical sciences (Lach:ner, Neratovice, Czech Republic) were needed for the preparation of standard solutions.

Chromolith Performance RP-18e 100 mm \times 4.6 mm and 50 mm \times 4.6 mm were purchased from MERCK (Darmstadt, Germany), Kinetex C₁₈ core-shell columns (100 Å, size of shell particles 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm and 50 mm \times 4.6 mm) were purchased from Phenomenex (Torrance, USA) and Ascentis Express C₁₈ fused-core columns (100 Å, 2.7 μm , 100 mm \times 4.6 mm and 50 mm \times 4.6 mm) were purchased from Supelco (Bellefonte, USA).

2.2. Instrumentation and software

All measurements were performed using the HPLC set Prominence LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with Diode array detector SPD-M20A with deuterium lamp, wavelength range 190–800 nm and flow cell with optical path length 10 mm and volume 10 μL , Fluorescence detector RF-10 AXI, Rack changer/C—autosampler for microtiter plates, Autosampler SIL/20 AC with injection volume range 1–100 μL , Degasser DGU-20A5, two Pumps LC20-AB with flow rate setting range 0.1–10 mL/min, Column oven CTO-20 AC with temperature setting range 4–85 °C and Communication bus module CBM-20 A. The whole

HPLC system was controlled by LabSolution—LCsolution v. 1.25 SP1

Lab Dancer (IKA WERKE, Staufen, Germany) for quick mixing between working steps, Laboratory shaker LT-1 (Kavalier, Sázava, Czech Republic) for horizontal mixing, Transsonic Ultrasonic Cleaning Units TP 680 DP (Elma, Germany), Thermostat Stericell 55 (BMT, Brno, Czech Republic) for heating during saponification and Centrifuge Eppendorf 5810-R (Hamburg, Germany) with Swing-bucket Rotor A-4-62 for separation of organic and aqueous layer were used during liquid–liquid extraction procedure of liposoluble vitamins from breast milk.

2.3. Preparation of standard solutions and samples

Stock solutions of retinol and alpha-tocopherol with concentration 2 mmol/L were prepared by dissolving in methanol and n-hexane, respectively. Calibration solutions of retinol were subsequently diluted from stock solution by methanol to concentrations 7.0, 4.9, 2.45, 0.98, 0.294 and 0.0588 $\mu\text{mol/L}$. Calibration solutions of alpha-tocopherol were subsequently diluted from stock solution by methanol to concentrations 50.0, 35.0, 17.5, 7.0, 2.1 and 0.42 $\mu\text{mol/L}$. The calibration curve was created out of six concentration levels. Retinol and alpha-tocopherol solutions were stored at -25 and $+4$ $^{\circ}\text{C}$, respectively.

Sample preparation procedure of breast milk consisted of deproteinization, saponification and liquid–liquid extraction steps carried out in one screw top glass tube. Ethanol was used for deproteinization of 500 μL breast milk (in ratio 4:1, v-v). 1 mL of 0.1 mol/L of ascorbic acid was added before second step of sample preparation to avoid oxidation of vitamins. Saponification effect of 1 mL of potassium hydroxide with concentration 10 mol/L was optimized by controlled conditions (30 min, 80 $^{\circ}\text{C}$ and protected from light). After cooling down to laboratory temperature vitamins were extracted by 2 mL of n-hexane and contemporary 5 min of vigorous shaking. The extraction was supported by 1 mL of distilled water added into the mixture. The organic and water layer were separated by centrifugation (10 min, 3220g, 4 $^{\circ}\text{C}$). 1500 μL of organic phase was evaporated and the residue was dissolved in 375 μL of methanol mobile phase [37]. All samples were taken from Milk bank of University Hospital in Hradec Králové (Czech Republic).

3. Chromatographic conditions

3.1. Reference method employing monolithic column

Separation of vitamins was performed using a monolithic column Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm. As the mobile phase 100% methanol was used at the flow rate 2.5 mL/min and column pressure 7.4 MPa (1069 PSI). The column oven CTO-20 AC was utilized to set temperature of analytical column at 25 $^{\circ}\text{C}$. The injection volume was 20 μL . The DAD detection of retinol and alpha-tocopherol was carried out at 325 nm and 295 nm, respectively. The total time of analysis was 1.8 min [18,43].

3.2. New method employing core-shell column

Separation of vitamins was performed using a Kinetex C₁₈ (100 Å, 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm). As the mobile phase 100% methanol was used at the flow rate 1.5 mL/min and column pressure 12.5 MPa (1816 PSI). The column oven CTO-20 AC was utilized to set temperature of analytical column at 49 $^{\circ}\text{C}$. The injection volume was 5 μL . The DAD detection of retinol and alpha-tocopherol was carried out at 325 nm and 295 nm, respectively. The total time of analysis was 1.75 min.

4. Results and discussion

4.1. Parameters of system suitability test

The method validation was performed according to the 5th edition of European Pharmacopoeia and Validating chromatographic methods—a practical guide by David M. Bliesner including Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation (Food and Drug Administration—FDA) and also Q2 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (The Tripartite International Conference on Harmonization—ICH) and Modern HPLC for Practicing Scientist by Michael W. Dong [38–42].

The calculated values for expression of the column efficiency such as number of theoretical plates (N), Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP), tailing factor (T_f), peak resolution (R_s), separation factor (α) are summarized in Table 1.

4.2. Comparison of columns

Different chromatographic conditions, summarized in Table 2, were applied on five columns under study. Data obtained during columns testing were compared with validation parameters of previously developed method using monolithic column Chromolith Performance RP-18e, 100 mm \times 4.6 mm (Merck, Darmstadt, Germany) [18,43]. Two ranges of flow rate were chosen due to the difference of stationary phases. For Chromolith Performance higher range of flow rate from 0.9 to 2.5 mL/min was elected. For porous shell columns Ascentis Express and Kinetex lower range of flow rate from 0.5 to 2.0 mL/min was elected due to the high pressure generated at higher flow rate. Mobile phase composition, injection volume 20 μL and analysis temperature 25 $^{\circ}\text{C}$ remained unchanged. Short analysis time, low consumption of solvent, satisfactory parameters of system suitability played a major role for the evaluation of the columns (Table 1 and Figs. 1–4). Separation column Kinetex C₁₈ (100 Å, 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) with flow rate 1.5 mL/min was chosen for further testing (Fig. 5). Injection volume in the range of 1 to 20 μL was tested as a next parameter. The injection was four times decreased from 20 μL to 5 μL and consequently the LOD

Table 1
Comparison of system suitability tests.

Compound	Chromolith RP-18e (100 \times 4.6 mm) ^a		Kinetex C ₁₈ (100 \times 4.6 mm) ^b	
	Retinol	Alpha-tocopherol	Retinol	Alpha-tocopherol
V_i (μL)	20		5	
T ($^{\circ}\text{C}$)	25		49	
F (mL/min)	2.5		1.5	
t_R (min)	0.81	1.46	0.87	1.50
A	61,070	25,526	24,422	10,753
H	26,118	7984	10,382	4007
N	30,098.5	52,94	32,65	74,62
HETP (μm)	33.25	19	31	13
T_f	1.68	1.52	1.75	1.42
R_s	1.4	3.5	2.6	4.9
α	2.1		1.4	
W (min)	0.17	0.20	0.12	0.13
t_A (min)	1.80		1.75	
V_S (mL)	450		263	

V_i : injection volume (μL), T : temperature ($^{\circ}\text{C}$), F : flow rate (mL/min), t_R : retention time (min), A : peak area, H : peak height, N : number of theoretical plates, HETP: Height Equivalent to a Theoretical Plate (μm), T_f : tailing factor, R_s : peak resolution, α : separation factor, W : width of peak at baseline (min), t_A : time of analysis (min), V_S : consumption of solvent (mL)/100 samples.

^a Reference method with monolithic column [43].

^b Developed method with core-shell column.

Table 2
Characteristics of stationary phases and chromatographic conditions.

Separation column	Chromolith ^a	Chromolith ^b	Ascentis ^b Express C ₁₈		Kinetex C ₁₈ ^b	
	RP-18e	RP-18e	100 × 4.6 mm	50 × 4.6 mm	100 × 4.6 mm	50 × 4.6 mm
Column dimension	100 × 4.6 mm	50 × 4.6 mm	100 × 4.6 mm	50 × 4.6 mm	100 × 4.6 mm	50 × 4.6 mm
Macropore size (μm)	2	–	–	–	–	–
Mesopore size (nm)	13	–	–	–	–	–
Particle size (μm)	–	–	2.7	–	2.6	–
Porous shell (μm)	–	–	0.5	–	0.35	–
Solid core (μm)	–	–	1.7	–	1.9	–
Average pore size (Å)	130	–	90	–	100	–
Surface area (m ² /g)	300	–	150	–	200	–
Temperature stability (°C)	45	–	60	–	60	–
Pressure stability (MPa)	20	–	60	–	60	–
pH stability	2.0–7.5	–	2.0–9.0	–	1.5–10	–
Injection volume (μL)	20	–	20	–	1–20	20
Temperature (°C)	25	–	25	–	25–55	25
Mobile phase	100% Methanol	–	100% Methanol	–	100% Methanol	–
Flow rate (mL/min)	2.5	0.9–2.5	0.5–2.0	–	0.5–2.0	–
Column pressure	7.4 MPa (1069 PSI)	0.8–3.2 MPa (113–464 PSI)	4.8–18.2 MPa (703–2633 PSI)	2.6–10.7 MPa (374–1557 PSI)	5.0–20.0 MPa (725–2900 PSI)	2.9–11.9 MPa (422–1723 PSI)
Time of analysis (min)	1.80	1.06–3.17	2.61–8.98	1.37–4.7	1.81–6.4	1.02–3.34
Detection (nm)	295 nm for alpha-tocopherol and 325 nm for retinol					

^a Reference method with Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm) [43].
^b Tested monolithic and porous shell columns.

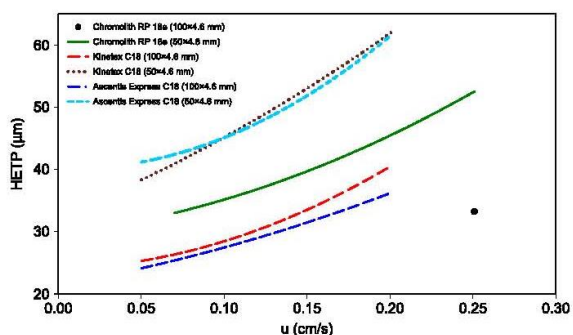


Fig. 1. Van Deemter plot of retinol comparison of five HPLC columns (HETP vs. *u* linear mobile phase velocity). Black point represents reference method with monolithic column Chromolith RP 18e 100 mm × 4.6 mm for comparison with the others.

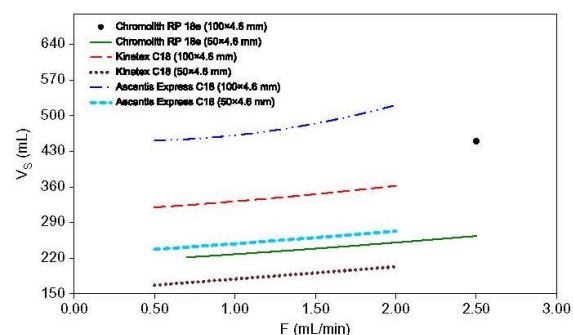


Fig. 3. Graph expressing the dependence of solvent consumption on flow rate in 100 measured samples. Black point represents reference method with monolithic column Chromolith RP 18e 100 mm × 4.6 mm for comparison with the others.

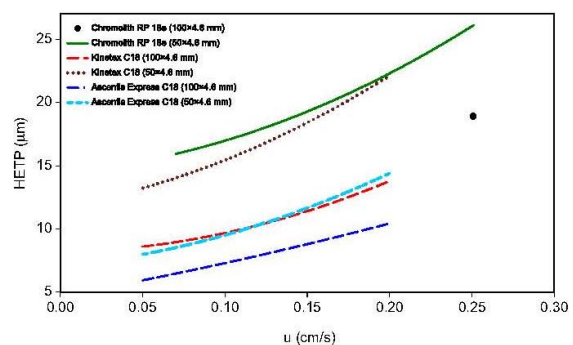


Fig. 2. Van Deemter plot of alpha-tocopherol comparison of five HPLC columns (HETP vs. *u* linear mobile phase velocity). Black point represents reference method with monolithic column Chromolith RP 18e 100 mm × 4.6 mm for comparison with the others.

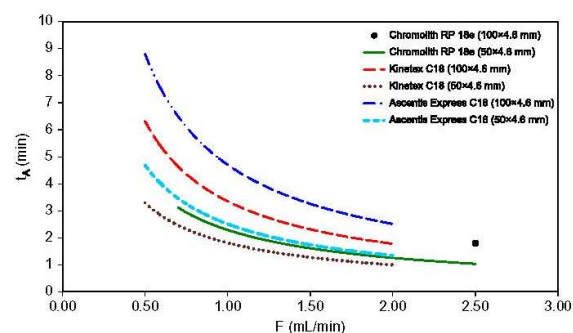


Fig. 4. Graph expressing the dependence of analysis time on flow rate. Black point represents reference method with monolithic column Chromolith RP 18e 100 mm × 4.6 mm for comparison with the others.

0.004 μmol/L, the LOQ 0.012 μmol/L and the LOD 0.078 μmol/L, the LOQ 0.182 μmol/L for retinol and alpha-tocopherol, respectively were calculated. Reduction of injection did not have a negative

effect on the limits in comparison with the reference method (Table 3). The analysis temperature range from 25 °C to 55 °C was tested as a last step. Increasing of the temperature up to 49 °C

positively affected back pressure which was decreased from 2234 PSI (15.4 MPa) to 1740 PSI (12.0 MPa) (Fig. 6). As the mobile phase 100% methanol was used and the detection of retinol and alpha-tocopherol was carried out at 325 and 295 nm, respectively by diode array detector (Table 2).

4.3. Method validation

Validation of method using core-shell column technology was carried out by calculating the following parameters: linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification.

Linearity was expressed as the confidence limit around the slope of the regression line and established for retinol and alpha-tocopherol. Six concentration levels were measured six times in the range of 0.0558–7.0 $\mu\text{mol/L}$ for retinol and 0.42–50.0 $\mu\text{mol/L}$ for alpha-tocopherol using Kinetex C_{18} (100 Å, 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm) and calibration curve was constructed for both analytes. The resulting plot slope (a), intercept (b) and

determination coefficient (R^2) were calculated from the regression equation using Microsoft Excel 2003. Linear regression equations and determination coefficients obtained from software are shown in Table 3.

Accuracy was expressed as the closeness of agreement between a true value and an actual value found. Accuracy of the method was calculated as the recovery determined from three measurements of three levels of spiked breast milk (0.92, 1.91, 3.87 $\mu\text{mol/L}$ of retinol standard and 7.29, 15.29, 28.61 $\mu\text{mol/L}$ of alpha-tocopherol standard).

Precision was expressed as the closeness of agreement between a series of measurements obtained from multiple aliquots of a homogenous sample under prescribed conditions. Repeatability was expressed as the relative standard deviation (RSD) of peak area and retention time calculated from data which were obtained by analyzing of six samples of human milk.

Limit of detection (LOD) was the lowest amount of analyte in a sample that could be detected but not necessarily quantitated as

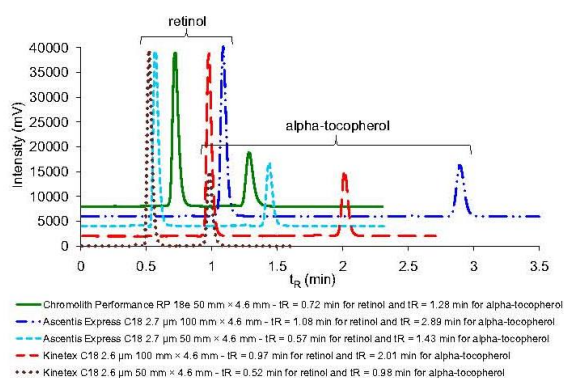


Fig. 5. Comparison of columns under chromatographic conditions: injection volume 20 μl , flow rate 1.5 mL/min, mobile phase 100% methanol, analysis temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, detection 295 nm for alpha-tocopherol and 325 nm for retinol.

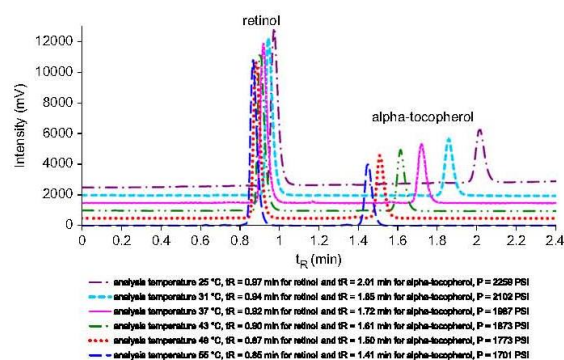


Fig. 6. Evaluation of different temperatures under chromatographic conditions: Kinetex C_{18} 2.6 μm 100 mm \times 4.6 mm, injection volume 5 μl , flow rate 1.5 mL/min, mobile phase 100% methanol, detection 295 nm for alpha-tocopherol and 325 nm for retinol.

Table 3
Comparison of validation parameters for Kinetex C_{18} and Chromolith Performance RP-18e columns.

Compound	Chromolith RP-18e (100 \times 4.6 mm) ^a		Kinetex C_{18} (100 \times 4.6 mm) ^b	
	Retinol	Alpha-tocopherol	Retinol	Alpha-tocopherol
Calibration range ($\mu\text{mol/L}$)	0.25–10.00	0.5–50	0.0558–7.0	0.42–50.0
Regression equation	$y = 24,488.31x + 7277.149$	$y = 1380.7x - 85.139$	$y = 10,479.78x - 140.03$	$y = 566.89x - 17.86$
Determination coefficient R^{2c}	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999
LOD ($\mu\text{mol/L}$)	0.13	0.09	0.004	0.078
LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	0.27	0.19	0.012	0.182
Repeatability (% RSD)				
Of t_R	—	—	0.32 ^d	0.19 ^d
Of peak area	—	—	0.25 ^d	0.98 ^d
Of t_R	0.41 ^e	0.83 ^e	0.22 ^f	0.12 ^f
Of peak area	5.65 ^e	5.51 ^e	6.94 ^f	1.75 ^f
Accuracy % R (% RSD)				
Level 1	93.9 (5.65) ^g	73.4 (5.51) ^g	116.3 (1.87) ^h	99.0 (2.12) ^h
Level 2	—	—	115.2 (3.43) ^h	103.8 (3.05) ^h
Level 3	—	—	114.1 (1.51) ^h	108.6 (1.14) ^h

^a Validation parameters of reference method with monolithic column [43].

^b Validation parameters of developed method with core-shell column.

^c Linearity was measured in six concentration levels.

^d RSD of retention time and peak area repeatability of standard calibration solution (retinol $c = 0.98 \mu\text{mol/L}$ and alpha-tocopherol $c = 7.0 \mu\text{mol/L}$).

^e Retention time and peak area repeatability of lyophilized human serum [43].

^f Retention time and peak area repeatability of breast milk measured six times.

^g Accuracy of chromsystems control serum, $n = 3$ [43].

^h Accuracy of spiked breast milk, $n = 3$, each level measured in triplet. R: recovery.

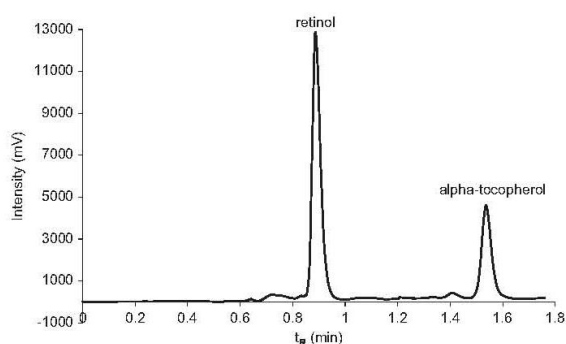


Fig. 7. Chromatogram of retinol ($t_R=0.88$ min, $c=2.63$ $\mu\text{mol/L}$) and alpha-tocopherol ($t_R=1.53$ min, $c=20.36$ $\mu\text{mol/L}$) extracted from breast milk and analyzed by Kinetex C_{18} column (2.6 μm , 100 \AA , 100 mm \times 4.6 mm) and chromatographic conditions: flow rate 1.5 mL/min, injection volume 5 μL , temperature 49 $^\circ\text{C}$, mobile phase 100% methanol, detection 295 nm for alpha-tocopherol and 325 nm for retinol, total time of analysis 1.75 min.

an exact value. LOD were based on signal-to-noise ratio (3:1) and expressed as the concentration of analytes. Limit of quantification (LOQ) was the lowest amount of analyte in sample that could be quantitatively determined with suitable precision and accuracy. LOQ were generally calculated from a determination of signal-to-noise ratio (10:1) and expressed as the concentration of analytes.

There was a significant improvement in repeatability and recovery after liquid–liquid extraction from breast milk and the limits for retinol and alpha-tocopherol RSD < 15% and recovery $100 \pm 25\%$ were fulfilled. All results of method validation are shown in Table 3 [38,40].

4.4. Method application

The newly developed HPLC method using Kinetex C_{18} (100 \AA , 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm) column was applied for determination of retinol and alpha-tocopherol in samples of breast milk in order to monitor the nutritional status prior to application for newborn (Fig. 7). Moreover, the method can be employed for determination of liposoluble vitamins in various biological matrices such as serum, cholesterol fractions and erythrocyte membrane for monitoring of antioxidant activity in patients with atherosclerosis and during anticancer therapy.

5. Conclusion

The main idea of this work was to develop a novel HPLC method for determination of liposoluble vitamins retinol and alpha-tocopherol in breast milk with better separation parameters, more-over low-cost, in comparison with reference method using monolithic column [18,43]. Great emphasis was placed on reducing analysis time and mobile phase consumption.

Five selected columns with monolithic and core–shell stationary phases, Chromolith Performance RP-18e 50 mm \times 4.6 mm, Kinetex C_{18} core–shell columns (100 \AA , size of shell particles 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm and 50 mm \times 4.6 mm) and Ascentis Express C_{18} fused-core columns (100 \AA , 2.7 μm , 100 mm \times 4.6 mm and 50 mm \times 4.6 mm) were tested and compared with Chromolith Performance RP-18e 100 mm \times 4.6 mm column.

Using core–shell technology improved the method validation parameters and also the consumption of sample and organic solvents were reduced if compared with the reference method using monolithic column [43]. Kinetex C_{18} (100 \AA , 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm) column with flow rate 1.5 mL/min of 100% methanol was

finally chosen for this analysis. The temperature was increased from 25 $^\circ\text{C}$ to 49 $^\circ\text{C}$, which had a positive effect on the pressure. The injection volume from 20 μL to 5 μL and mobile phase consumption for 100 samples batch from 450 to 263 mL were decreased in comparison with the reference method using monolithic column Chromolith Performance RP-18e (100 mm \times 4.6 mm). Calibration ranges for retinol and alpha-tocopherol were extended towards lower concentration values being from 0.056 to 7.0 $\mu\text{mol/L}$ and from 0.42 to 50.0 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Employing the liquid–liquid extraction of vitamins from breast milk brought significant improvement in the repeatability and recovery and helped to fulfill the limits demanded by FDA.

The newly developed HPLC method was used for analysis of retinol and alpha-tocopherol in 50 real samples of breast milk.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support of Charles University in Prague—Project SVV 2012-265-002, Grant Agency of Charles University Project number 124809/2011, PRVOUK P37/12 and Project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization (00179906).

References

- [1] D.J. Betteridge, *Metabolism* 49 (2000) 3–8.
- [2] J. Karpinska, B. Mikoluc, R. Motkowski, J. Piotrowska-Jastrzebska, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 232–236.
- [3] Q. Su, K.G. Rowley, K. O'Dea, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 729 (1999) 191–198.
- [4] A. Khan, M.I. Khan, Z. Iqbal, Y. Shah, L. Ahmad, D.G. Watson, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 2339–2347.
- [5] W.A. Pryor, *Free Radical Biol. Med.* 28 (2000) 141–164.
- [6] M.E. Gotz, G. Kunig, P. Riederer, M.B. Youdim, *Pharmacol. Ther.* 63 (1994) 37–122.
- [7] L.J. Roberts 2nd, J.A. Oates, M.F. Linton, S. Fazio, B.P. Meador, M.D. Gross, Y. Shyr, J.D. Morrow, *Free Radical Biol. Med.* 43 (2007) 1388–1393.
- [8] J.M. Zingg, *Mol. Aspects Med.* 28 (2007) 400–422.
- [9] D.C. Schwenke, *J. Nutr. Biochem.* 9 (1998) 424–445.
- [10] M.I. Khan, A. Khan, Z. Iqbal, L. Ahmad, Y. Shah, *Chromatographia* 71 (2010) 577–586.
- [11] M.A. Dijkhuizen, F.T. Wieringa, C.E. West, Muherdiyantiningsih, Muhilal, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2001) 786–791.
- [12] C. Folli, S. Vigiore, M. Busconi, R. Berni, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 1017–1022.
- [13] M. Strobel, F. Heinrich, H.K. Biesalski, *J. Chromatogr. A* 898 (2000) 179–183.
- [14] S.M. Jung, K. Lee, J.W. Lee, H. Namkoong, H.K. Kim, S. Kim, H.R. Na, S.A. Ha, J.R. Kim, J. Ko, J.W. Kim, *Neurosci. Lett.* 436 (2008) 153–157.
- [15] V.B. De Azeredo, N.M. Trugo, *Nutrition* 24 (2008) 133–139.
- [16] F.J. Schweigert, K. Bathe, F. Chen, U. Buscher, J.W. Dudenhausen, *Eur. J. Nutr.* 43 (2004) 39–44.
- [17] M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 132–137.
- [18] L. Urbanek, D. Solichova, B. Melichar, J. Dvorak, I. Svobodova, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* 573–574 (2006) 267–272.
- [19] F. Gritti, I. Leonardis, J. Abia, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3819–3843.
- [20] G. Guiochon, F. Gritti, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1915–1938.
- [21] O. Nunez, H. Gallart-Ayala, C.P. Martini, P. Lucci, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298–323.
- [22] S. Fekete, E. Olah, J. Fekete, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 57–71.
- [23] S. Fekete, R. Berký, J. Fekete, J.L. Veuthey, D. Guilleme, *J. Chromatogr. A* 1236 (2012) 177–188.
- [24] D. Guilleme, J. Ruta, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1069–1082.
- [25] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 77–90.
- [26] K. Hormann, T. Mullner, S. Bruns, A. Holtz, U. Tallarek, *J. Chromatogr. A* 1222 (2012) 46–58.
- [27] E. Olah, S. Fekete, J. Fekete, K. Ganzler, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3642–3653.
- [28] G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101–168. (discussion 100).
- [29] A. De Villiers, F. Lynen, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3431–3442.
- [30] X. Wang, W.E. Barber, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 139–151.
- [31] N. Manchon, M. D'Arrigo, A. Garcia-Lafuente, E. Guilleme, A. Villares, A. Ramos, J.A. Martinez, M.A. Rostagno, *Talanta* 82 (2010) 1986–1994.
- [32] W. Song, D. Pabbisetty, E.A. Groeber, R.C. Steenwyk, D.M. Fast, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 491–500.

- [33] A. Abraham, M. Al-Sayah, P. Skrdla, Y. Berezniński, Y. Chen, N. Wu, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 131–137.
- [34] E.R. Badman, R.L. Beardsley, Z. Liang, S. Bansal, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 878 (2010) 2307–2313.
- [35] F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5069–5083.
- [36] S. Fekete, J. Fekete, Talanta 84 (2011) 416–423.
- [37] M. Kasparová, J. Plíšek, D. Solichová, L. Krčmová, B. Kucerová, M. Hronek, P. Solich, Talanta 93 (2012) 147–152.
- [38] D.M. Bliesner, Validating Chromatographic Methods A Practical Guide, Wiley-Interscience, New Jersey, 2006.
- [39] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, European Pharmacopoeia 5.0 1, 2005, 69–73.
- [40] D.W. Dong, Modern HPLC for Practicing Science, Wiley-Interscience, New Jersey, 2006.
- [41] The Tripartite International Conference on Harmonization Quality Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073381.pdf>>, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073384.pdf> (downloaded on 12.07.2011).
- [42] Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, May 2001, <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>> (downloaded on 12.07.2011).
- [43] L. Krčmová, D. Solichová, J. Plíšek, M. Kašparová, L. Sobotka, P. Solich, Int. J. Environ. Anal. Chem. 90 (2010) 106–114.

10.3.PŘÍLOHA III. COMPARISON OF A NEW HIGH- RESOLUTION MONOLITHIC COLUMN WITH CORE-SHELL AND FULLY POROUS COLUMNS FOR THE ANALYSIS OF RETINOL AND ALPHA-TOCOPHEROL IN HUMAN SERUM AND BREAST MILK BY ULTRA-HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Kučerová B., Krčmová L., Solichová D., Plíšek J., Solich P.

Journal of separation science 35 (14), 2013, p. 2223-2230 (citováno 2x, IF₂₀₁₃ – 2,594)

Barbora Kučerová^{1,2}
Lenka Krčmová^{1,2}
Dagmar Solichová²
Jiří Plíšek^{1,2}
Petr Solich¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic
²III. Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Received March 4, 2013
Revised April 23, 2013
Accepted April 24, 2013

Research Article

Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and α -tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography[†]

The reduction of analysis time, cost, and improvement of separation efficiency are the main requirements in the development of high-throughput assay methods in bioanalysis. It can be achieved either by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) using stationary phases with small particles ($<2\ \mu\text{m}$) at high back pressures or by using opposite direction—monolithic stationary phases with low back pressures. The application of new types of monolithic stationary phases for UHPLC is a novel idea combining these two different paths. The aim of this work was to test the recently introduced second-generation of monolithic column Chromolith[®] HighResolution for UHPLC analysis of liposoluble vitamins in comparison with core-shell and fully porous sub- $2\ \mu\text{m}$ columns with different particle sizes, column lengths, and shapes. The separation efficiency, peak shape, resolution, time of analysis, consumption of mobile phase, and lifetime of columns were calculated and compared. The main purpose of the study was to find a new, not only economical option of separation of liposoluble vitamins for routine practice.

Keywords: Bioanalysis / Core-shell / High-resolution monolith / LC / Liposoluble vitamins
DOI 10.1002/jssc.201300242

1 Introduction

In clinical practice there is an increasing demand on the performance of bioanalytical methodologies suitable for routine analysis. Such factors as time consumption and total costs of analysis are important. For that reason, there is a strong attraction to novel analytical approaches like ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC), which promises very fast analysis with low consumptions of sample and mobile phase. On the other hand, there are also enormous demands on chromatographic columns to be highly efficient, selective, and resistant.

One of the critical parameters in routine bioanalytical laboratories is column lifetime. Column lifetime is influenced by the pH and flow rate of the mobile phase, oven temperature, sample purity, and number of injections. The lifetime of the column can be monitored using chromatographic param-

eters such as resolution (R_{ij}), number of theoretical plates (N), tailing factor (T_f), capacity factor (k), and relative retention (α). Changes of these parameters indicate the degradation of the column. A gradual increase in pressure over time is a normal sign of column aging [1]. A comparison of column properties with respect to clinical and economic aspects of analysis is crucial for the selection of appropriate analytical strategies.

A common way of how to improve the performance of LC led through the reduction of the particle diameter of the stationary phase. Starting with $10\ \mu\text{m}$ irregular particles in the 1970s, $5\ \mu\text{m}$ spherical particles in the 1980s, and $3.5\ \mu\text{m}$ in the 1990s, the minimal particle diameter is nowadays less than $2\ \mu\text{m}$ [2]. The reduction of the particle diameter resulted in an increase of efficiency, resolution, sensitivity, and speed. These benefits enhance the back pressure that exceeds the pressure limits of HPLC instrumentation [3].

In 2004, the first UHPLC system resistant to high pressures up to 100 MPa was developed by Waters (Milford, USA) [4]. The sensitivity increase for UHPLC is estimated to be two to three times higher than with HPLC separations, depending on the detection technique used [5]. Since 2004, many UHPLC systems have been introduced by leading manufacturers [6].

Correspondence: RNDr. Lenka Krčmová, University Hospital Hradec Králové, III. Internal Gerontometabolic Clinic, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic and Faculty of Pharmacy Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: lenkakrajmovova@seznam.cz
Fax: +420 495 834 841

Abbreviation: UHPLC, ultra-high-performance liquid chromatography

[†]This paper is included in the virtual special issue Monoliths available at the Journal of Separation Science website.

Recently, a huge effort has been focused on the development of new types of UHPLC/HPLC stationary phases such as fused-core particles (Ascentis Express, Supelco) and core-shell particles (Kinetex, Phenomenex). Fused-core technology was originally introduced by Kirkland in the 1990s [7]. Core-shell or fused-core particles are characterized by a solid nonporous core coated with a porous layer with a shell volume typically 60–75% of the particle volume and a distribution of particle sizes much narrower than that of standard fully porous particles [8]. The high separation efficiency of core-shell particles is a result of a faster analyte mass transfer from the mobile phase into and out of the porous layer of the particle [9]. This technology became commercially available in 2007 under various trademarks: Halo from Advanced Materials Technology (Wilmington, USA), Ascentis from Supelco (Bellefonte, USA), and Kinetex from Phenomenex (Torrance, USA) [10].

In comparison with conventional stationary phases, which consist of individual particles of defined size binder, monolithic columns form a single piece of porous material that completely fills the interior of the separation column. Classic 3–5 micron particle columns exhibit excellent separation efficiency, but the decreasing size of the sorbent increases the back pressure, so that the maximum flow rate is limited. The porous character of the monolith allows high flow rates while keeping the back pressure low [11]. The biggest advantages of monolithic columns compared to conventional particle-filled columns are their hydrodynamic properties [12]. Macropores (with size of around 2 μm) provide a fast convective flow of the mobile phase through the monolith, and greatly accelerate the mass transfer between mobile and stationary phases, mesopores (with size of about 13 nm) provide a large surface of the monolith, and thus high separation efficiency [13, 14]. Silica rod columns have been available since 2000 from Merck (Darmstadt, Germany) [9].

In 2011, the next generation of monolithic columns, Chromolith[®] HighResolution RP 18e, 100 \times 4.6 mm Merck (Darmstadt, Germany) was introduced into the market. This new column differs from classic monolith with size of pores—the macropore size is smaller (1.15 μm). The skeleton diameter should improve the peak shape. The mesopore size is 15 nm, the specific surface area is 250 m^2/g , and the separation efficiency can reach up to 200 000 theoretical plates/meter [15]. The porous silica structure of Chromolith HighResolution is much more homogeneous than that of the first generation. Chromolith HighResolution columns are much improved regarding homogeneity, which is reason for the higher separation efficiency. Cabrera compared RP chromatographic separation of four tocopherols on a 3- μm -porous-particle-packed column and on the new monolithic column. The separation efficiency and time of analysis were better with the Chromolith HighResolution column [16].

In this work, different analytical columns were tested for the determination of retinol and α -tocopherol, which are liposoluble vitamins that have an effect as antioxidants to help to remove free radicals away from the human body and thus prevent tumorous transformation of cells. Retinol, also

known as vitamin A, is an essential nutrition factor that plays a fundamental role in supporting growth, reproduction, and embryonic development. It helps to regulate cell differentiation and proliferation and maintains an important function in the immune system. α -Tocopherol, known as vitamin E, is the major liposoluble antioxidant in the human body that protects the lipid parts of cell membrane, blood fats, cholesterol, and other fatty substances against oxidation. A decrease of α -tocopherol levels causes a higher possibility of oxidative stress generation manifested in all organs. It is also essential for the normal structure and function of tissues [17]. It is considered to be a protective factor against cardiovascular diseases, cancer, age-related macular degradation, central neurodegenerative diseases, and diabetes mellitus [18].

Methods published for the analysis of retinol and α -tocopherol in biological and food samples use RP-HPLC [19–23] mostly with UV or diode-array detection. Only a few methods for the determination of these analytes by UHPLC can be found in the literature [24–28]. Citová et al. [24] compared the determination of the same analytes in human serum by conventional HPLC with the first UHPLC system. A C18 RP sub-2 μm particle stationary phase and UV detection were used for separation and detection, respectively. The time of analysis was 2 min. Molto-Puigmarti et al. [25] published the determination of tocopherols in human colostrum and milk. The target analytes were separated in 1.6 min and a precolumn was used to protect the sub-2 μm column.

In our laboratory, several HPLC methods for the determination of retinol and α -tocopherol in biological material were developed, published, and used. First Urbánek et al. [29] developed and published a fast HPLC method using the monolithic Chromolith[®] (Merck) column for vitamin separation in human serum. Two vitamins were separated in 2 min with 100% methanol as the mobile phase. The injection volume was 50 μL , and diode-array detection was used. Later this method was transformed and revalidated to an HPLC system that allowed the use of microplates instead of vials. The extraction procedure was miniaturized, γ -tocopherol was monitored, and the injection volume was reduced to 20 μL [30]. The most recently developed method by Plíšek et al. [31] used core-shell technology for the separation of target vitamins in breast milk. The analysis time was 1.75 min with a small consumption of mobile phase and excellent LODs and LOQs.

The aim of this study was to examine the possible application of the new second-generation monolithic column Chromolith[®] HighResolution for the separation of retinol and α -tocopherol in a biological matrix using UHPLC in comparison with core-shell and fully porous sub-2 μm chromatographic columns with different particle sizes, column lengths, and shapes.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Retinol and DL- α -tocopherol were supplied by Fluka Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic). HPLC-grade methanol

and *n*-hexane for the preparation of standard solutions and ethanol for the denaturation of samples of breast milk were obtained from Merck. Ethanol denatured with 5% of methanol for the deproteination of serum was obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). Methanol HPLC Super Gradient was supplied by Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic) and used as the mobile phase.

2.2 Chromatographic system

The analyses were performed using a UHPLC system Nexera, Shimadzu (Kyoto, Japan) composed of Rack changer II as the autosampler for the microtiter plates, a degasser (DGU-20A3), an autosampler (SIL/30 AC) with an injection volume range 0.1–50.0 μ L, two LC30-AD pumps with a flow-rate setting range 0.0001–3 mL/min with a pressure range up to 130 MPa and from 3 to 5 mL/min with 80 MPa pressure, a column oven (CTO-20 AC) with a temperature setting range 4–85°C, a fluorescence detector (RF-20AXS), and a communication bus module (CBM-20A). The whole UHPLC system was controlled by LabSolution software version 5.30 SP1.

A sample preparation technique was developed using an orbital shaker (LabDancer V, IKA, Staufen, Germany) for quick mixing between working steps, a laboratory shaker (LT-1, Kavalier, Sázava, Czech Republic) for horizontal mixing, an Eppendorf centrifuge (5810-R, Hamburg, Germany) for the separation of the organic and aqueous layers, and an Eppendorf concentrator (5301, Hamburg, Germany) for evaporation of the hexane layer for the liquid–liquid extraction procedure of liposoluble vitamins from human serum and breast milk.

2.3 Chromatographic conditions

C18 columns filled with different types of particles—core-shell, fully porous particles, and monolithic columns—were tested (see Fig. 1).

Kinetex columns were purchased from Phenomenex (Torrance, USA). The new Chromolith HighResolution column was a generous gift from Merck. Acquity columns were purchased from Waters (Milford, USA). A column Shim-pack was a generous gift from Shimadzu (Kyoto, Japan).

Based on our previous experience [29–31], 100% methanol was used as the mobile phase. The columns were

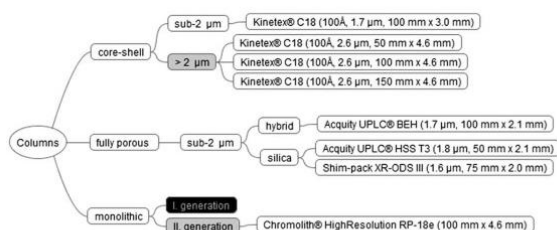


Figure 1. Summary of compared columns: , suitable for ultra high performance liquid chromatography (UHPLC); , suitable for HPLC and UHPLC; and suitable for HPLC.

tested at different flow rates and oven temperatures. The injection volume was decreased from 5 to 1 μ L. To improve the sensitivity and selectivity of the method, fluorescent detection was used. The excitation and emission wavelengths were 325 and 480 nm for retinol and 295 and 330 nm for α -tocopherol.

2.4 Preparation of standard solutions

Stock solutions of retinol and α -tocopherol standards were prepared as follows: a 1 mmol/L retinol solution was prepared by dissolving in methanol. The α -tocopherol standard was first dissolved in *n*-hexane (2 mmol/L) and then diluted by methanol to get 0.5 mmol/L stock solutions. The concentrations of the working standard solution were 2.5 μ mol/L for retinol and 12.5 μ mol/L for α -tocopherol and were prepared by diluting in methanol. These standard solutions were stored at -25°C (retinol) and 4°C (α -tocopherol). The stability of the stock and working solutions was six months.

2.5 Preparation of biological samples

The study protocol was approved by the Institutional Ethical Committee of the University Hospital Hradec Králové and all patients signed an informed consent. Blood samples were from patients of III. Internal Gerontometabolic Clinic and samples of breast milk were provided from the Milk Bank of the University Hospital Hradec Králové.

2.5.1 Serum

Serum samples were prepared according to Ref. [29]. Blood samples were drawn from the peripheral vein after 12 h of overnight fasting. The samples were then centrifuged ($1600 \times g$, 10 min, 16°C) and the serum was separated. By using a liquid–liquid extraction procedure, 500 μ L of serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5% methanol (500 μ L, 5 min, 4°C). Then 2500 μ L of *n*-hexane was added to this mixture and extracted for 5 min by a vortex apparatus. After centrifugation ($3220 \times g$, 10 min, 0°C), the aliquot (2000 μ L) of the clean extract was separated and evaporated in a vacuum evaporator (45°C). The residue was dissolved in 400 μ L of methanol and analyzed by UHPLC using the external standard calibration.

2.5.2 Human breast milk

Samples of human breast milk were processed according to reference [32]. Milk samples were stored frozen at -28°C . Before the extraction, the material was left to thaw and homogenized by constant mixing in a water bath at 37°C . The first step of the sample preparation was deproteination by adding 2000 μ L of cold ethanol into the 500 μ L of human breast milk. The addition of 1000 μ L of ascorbic acid was employed to protect both compounds against oxidation during the saponification. Saponification was carried out by using

1000 μL of 10 M potassium hydroxide at 80°C in darkness for 30 min. After the extraction of retinol and α -tocopherol into 2000 μL of *n*-hexane with vigorous shaking, the organic and water layers were separated by centrifugation ($3220 \times g$, 10 min, 4°C). Then 1500 μL of the organic layer was removed and evaporated in a vacuum evaporator (45°C). Before UHPLC analysis, the evaporative residue was dissolved in 375 μL of methanol.

3 Results and discussion

Our many years of experience in the HPLC analysis of retinol and α -tocopherol in biological material by using monolithic [33–37] and particular columns [38–40] for the routine analysis of samples from large groups of patients resulted in the question of the possibility to use a new monolithic column as the stationary phase a UHPLC system rather than stationary phases designed for UHPLC. For this purpose, columns of a second-generation high-resolution monolith, core-shell, and fully porous particles of different lengths, diameters, and particle sizes were tested with a UHPLC system under various conditions. The concentration of a standard mixture solution used during testing columns was 2.5 $\mu\text{mol/L}$ for retinol and 12.5 $\mu\text{mol/L}$ for α -tocopherol. These values correspond to the usual concentrations of the tested analytes in breast milk and human serum [41]. For the selection of a suitable column, the following parameters played an important role: separation efficiency, resolution, time of analysis, consumption of the mobile phase, and the lifetime of the column. Additionally the cost of analysis was also a criterion.

Column efficiency was determined according to the United States Pharmacopeia as the number of theoretical plates by the equation: number of theoretical plates (N) = $16 \times (R_t/W)^2$, where R_t is the retention time and W is the width of the peak. The peak resolution was calculated according to the equation: resolution (R_{ij}) = $2 \times (R_{ij} - R_{i+1})/(W_i + W_{i+1})$, where R_{ij} and R_{i+1} are the retention times of α -tocopherol and retinol, respectively, and W is the width of the appropriate peak.

For all tested columns, 100% of methanol as the mobile phase and an injection of 1 μL were used. The mo-

bile phase was chosen based on our experience with previously developed and published methods [29–31, 34]. Since a UHPLC system was used, the injection volume was reduced to 1 μL , which allows possible multiple injections from one small-volume microtitration well.

Each column was tested using various flow rates to the maximum operating pressure of each tested column (maximum pressure recommended by supplier) with regard to mobile-phase consumption.

The first comparison of the obtained data was done according to the best efficiency. The efficiency is calculated as the number of theoretical plates per meter because of the different lengths of the tested columns. The conditions and measured values are shown in Table 1. Columns were tested at different temperatures (25 and 50°C) except where the maximum recommended operating temperature for the Acquity and Shim-pack columns was 45°C. In Table 1, the separation conditions with the best separation efficiency for each tested column were included. Figure 2 shows chromatograms of standard solutions of retinol and α -tocopherol analytes.

The peak shapes of retinol and α -tocopherol were calculated for all tested columns. The best peak shapes of target analytes was achieved using two columns—Chromolith HighResolution and Kinetex with dimensions of 150×4.6 mm filled with 2.6 μm particles (see Fig. 2). These columns were found to be the best for both analytes.

Although the separation efficiency was high, the analysis time was longer than 3 min for the most of the tested columns. The analysis time is important in routine high-throughput bioanalytical practice. Therefore, for the next comparison of column parameters, the results of measurements with analysis times <2 min were used to shorten the currently used method [30]. The summary of the column parameters in order to shorten the time is shown in Table 2.

The shortest analysis was achieved by the Kinetex column filled with 2.6 μm particles, length and diameter size 50×4.6 mm at flow rate 1.5 mL/min at 25°C. This column fulfilled the criterion of a very small consumption of the mobile phase. The column efficiency provided acceptable results, however, the resolution and peak shape for α -tocopherol did not provide excellent results in comparison with the other columns.

Table 1. Conditions and results of separation corresponding to the best efficiency for each column

Column	Flow rate (mL/min)	T (°C)	Operating pressure (psi)	Retinol		α -Tocopherol	
				R_t (min)	N/m	R_t (min)	N/m
Kinetex C18 (2.6 μm , 100×4.6 mm)	0.5	50	720	2.62	89 650	4.54	148 740
Kinetex C18 (2.6 μm , 150×4.6 mm)	1.0	50	2 077	1.97	93 307	3.21	134 093
Chromolith HR RP-18e (100×4.6 mm)	1.5	50	991	1.25	82 910	1.90	131 870
Kinetex C18 (2.6 μm , 50×4.6 mm)	0.5	50	499	1.43	59 720	2.32	101 000
Shim-pack XR-ODS III (1.6 μm , 75×2.0 mm)	0.3	45	4 259	1.25	18 240	2.84	65 396
Kinetex C18 (1.7 μm , 100×3.0 mm)	0.3	50	1 441	1.98	38 730	3.19	62 310
Acquity HSS T3 (1.8 μm , 50×2.1 mm)	0.3	45	1 577	0.97	20 740	1.83	43 740
Acquity BEH (1.7 μm , 100×2.1 mm)	0.3	50	5 228	1.42	16 760	2.34	37 880

T , temperature (°C); R_t , retention time (min); N/m , number of theoretical plates per meter; HR, HighResolution.

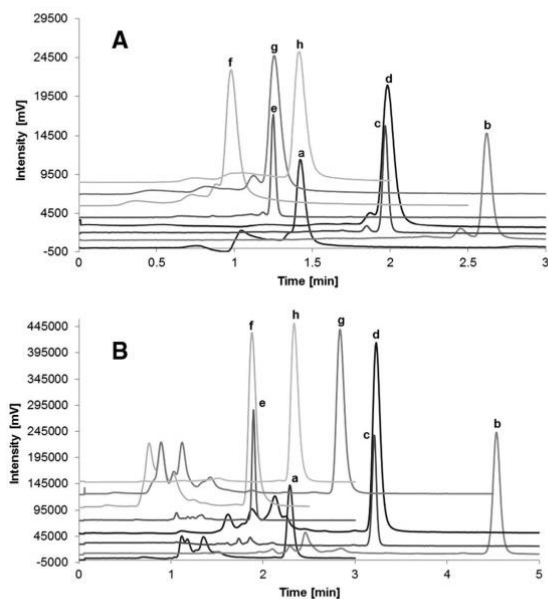


Figure 2. Chromatogram of separation using different flow rates corresponding to the best efficiency for standard solution of retinol (A) and α -tocopherol (B): (a) Kinetex C18 (2.6 μ m, 50 \times 4.6 mm), (b) Kinetex C18 (2.6 μ m, 100 \times 4.6 mm), (c) Kinetex C18 (2.6 μ m, 150 \times 4.6 mm), (d) Kinetex C18 (1.7 μ m, 100 \times 3.0 mm), (e) Chromolith HighResolution RP-18e (100 \times 4.6 mm), (f) Acquity HSS T3 (1.8 μ m, 50 \times 2.1 mm), (g) Shim-pack XR-ODS III (1.6 μ m, 75 \times 2.0 mm), (h) Acquity BEH (1.7 μ m, 100 \times 2.1 mm).

Unexpected results were achieved with fully porous sub-2 μ m particle columns. Although the time of analysis was shorter than 2 min and the consumption of the mobile phase was considerably lower, the separation efficiency and peak

shape were not as good as those of columns packed with 2.6 μ m particles. Because of this fact, the dead volume of the system was calculated. It was found that the total dead volume is 6.88 μ L (without semi-microcell in the detection system—14 μ L). This value is in the typical range of such UHPLC systems [42].

Very good results comparable with core-shell columns were achieved with the new monolithic column Chromolith HighResolution. This column has excellent efficiency, peak shape, and time of analysis with a low consumption of the mobile phase, typical of this type of column. Comparable results were achieved for Kinetex (2.6 μ m, 100 \times 4.6 mm) and Chromolith HighResolution (100 \times 4.6 mm) columns. The chosen columns provided comparable mobile-phase consumption, time of analysis, and tailing factor. The monolithic column achieved a better separation efficiency, especially for retinol.

Finally the Kinetex column of dimensions 100 \times 4.6 mm and particle size 2.6 μ m and the Chromolith HighResolution column of dimensions 100 \times 4.6 mm were chosen for further measurements and comparison. The repeatability of the injection of the standard solution, serum, and samples of breast milk were tested. The repeatability was expressed as the RSD of the peak area and retention time. The repeatability was calculated for ten injections. The repeatability of the retention time of the standard solution and samples of serum and breast milk did not exceed 0.5% for both columns. The area repeatability of the Chromolith HighResolution column was <1% and that of the Kinetex column was <2%. According to the normally cited requirement, the % RSD of the injection repeatability should not exceed 2.0% in bioanalysis [43]. Both of compared columns comply with this limit. The separation of retinol and α -tocopherol in serum (A) and breast milk (B)

Table 2. Conditions and results with time of analysis <2 min

Column and conditions	Retinol		α -Tocopherol		R_{ij}	V_S (mL)	T_A (min)	Operating pressure (psi)
	N/m	T_f	N/m	T_f				
Kinetex C18 (2.6 μ m, 50 \times 4.6 mm) 1.5 mL/min 25°C	44 500	1.092	98 580	1.161	9.41	2.83	1.22	1 949
Kinetex C18 (2.6 μ m, 50 \times 4.6 mm) 1.0 mL/min 50°C	49 180	1.029	87 680	1.258	6.74	1.35	1.35	1 013
Kinetex C18 (2.6 μ m, 100 \times 4.6 mm) 2.5 mL/min 25°C	43 280	1.107	90 920	1.063	14.43	3.60	1.44	4 701
Kinetex C18 (2.6 μ m, 100 \times 4.6 mm) 2.0 mL/min 50°C	46 680	1.120	93 740	1.057	10.98	3.00	1.50	2 927
Kinetex C18 (2.6 μ m, 150 \times 4.6 mm) 2.5 mL/min 25°C	60 620	1.091	108 100	1.065	18.26	5.83	1.93	6 814
Kinetex C18 (2.6 μ m, 150 \times 4.6 mm) 2.5 mL/min 50°C	54 240	1.077	91 427	1.038	12.59	4.83	1.53	5 398
Kinetex C18 (1.7 μ m, 100 \times 3.0 mm) 1.1 mL/min 25°C	24 500	1.278	63 690	1.288	10.62	1.58	1.44	7 077
Kinetex C18 (1.7 μ m, 100 \times 3.0 mm) 0.9 mL/min 50°C	24 040	1.215	44 400	1.420	6.77	1.19	1.32	4 300
Chromolith HR RP-18e (100 \times 4.6 mm) 3.0 mL/min 25°C	52 400	1.109	97 260	1.048	13.04	4.47	1.49	2 532
Chromolith HR RP-18e (100 \times 4.6 mm) 2.5 mL/min 50°C	58 400	1.105	90 340	1.062	9.24	3.5	1.40	1 748
Acquity HSS T3 (1.8 μ m, 50 \times 2.1 mm) 0.7 mL/min 25°C	13 813	1.350	42 720	1.340	7.25	0.95	1.36	4 636
Acquity HSS T3 (1.8 μ m, 50 \times 2.1 mm) 0.5 mL/min 45°C	17 600	1.320	38 860	1.450	6.37	0.72	1.43	2 613
Shim-pack XR-ODS III (1.6 μ m, 75 \times 2.0 mm) 1.1 mL/min 45°C	14 917	1.360	39 969	1.353	8.18	1.74	1.58	10 025
Acquity BEH (1.7 μ m, 100 \times 2.1 mm) 0.9 mL/min 25°C	12 517	1.261	27 487	1.183	8.12	1.44	1.60	10 402
Acquity BEH (1.7 μ m, 100 \times 2.1 mm) 0.7 mL/min 50°C	10 687	1.344	30 232	1.318	5.79	0.96	1.37	6 997

N/m , number of theoretical plates per meter; T_f , tailing factor; R_{ij} , resolution; V_S , consumption of mobile phase per analysis; HR, HighResolution; T_A : time of analysis. Each value is average of three measurements.

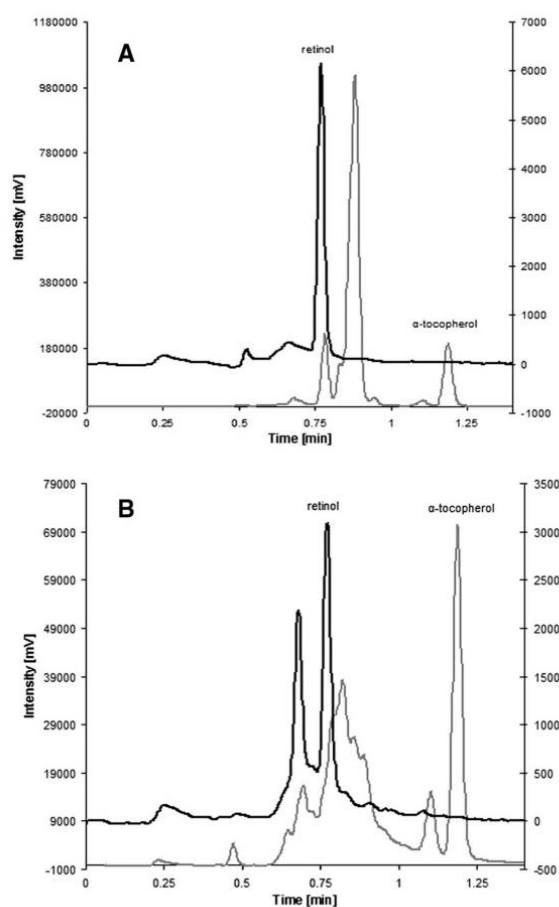


Figure 3. Separation of retinol and α -tocopherol in serum (A) and breast milk (B) using the Chromolith HighResolution column (100×4.6 mm), ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) separation conditions: injection volume $1 \mu\text{L}$, 100% methanol as a mobile phase with flow rate 2.5 mL/min at 50°C . Gray line; excitation 295 nm, emission 330 nm. Black line; excitation 325 nm, emission 480 nm.

using the Chromolith HighResolution column is shown in Fig. 3.

The LOD was calculated as triple the S/N. The LOQ was calculated as the S/N ratio multiplied by 10 [43]. The LOD and LOQ achieved by the Chromolith HighResolution are compared with previously developed methods in Table 3. The LOD of retinol and α -tocopherol for the Kinetex column (100×4.6 mm) with a particle size $2.6 \mu\text{m}$ (not included in Table 3) was 2.46 and 5.74 nmol/L , respectively. The LOQ concentrations are 8.19 nmol/L for retinol and 19.14 nmol/L for α -tocopherol. A comparison of the measured parameters with previously developed methods used in our laboratory is shown in Table 3.

Back pressure during the analysis is an important factor for the lifetime of column. Although the maximum pressure of the tested columns is high, high flow rates of the

mobile phase were not tested because retinol was eluted in the dead volume of the system and a decrease of separation efficiency was observed. The influence of the flow rate on the back pressure for different tested columns is shown in Fig. 4. The new Chromolith HighResolution monolithic column can operate with a high flow rate without a significant increase of the back pressure. These properties are conferred by the unique porous structure of monolithic columns. Core-shell columns with small particles ($<3 \mu\text{m}$) are made for UHPLC systems operating under high pressure.

Based on all preliminary results, the Chromolith High-Resolution column of dimensions 100×4.6 mm was finally chosen for the new method of simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum and human breast milk as it gives excellent results in comparison with the other tested columns. UHPLC parameters: the injection volume was set at $1 \mu\text{L}$, 100% of methanol was used as the mobile phase at a flow rate of 2.5 mL/min with a column-oven temperature 50°C . Under these conditions the retention times of retinol and α -tocopherol were 0.77 and 1.19 min, respectively, which resulted in a total time of analysis of 1.4 min and a mobile-phase consumption of 3.5 mL per analysis. The higher consumption of mobile phase is compensated for by the longer lifetime and lower price of the column in comparison with the other tested columns. Based on our practical experience, the monolithic column allows > 1000 repetitions of analysis of retinol and α -tocopherol in biological material [20, 24, 30] without any loss of performance. This fact is because of the monolithic silica structure and the absence of column frits. The number of injections of biological material on columns packed with core-shell and fully porous particles without losing separation efficiency were lower [16, 44], which is usually caused by blockage of the frits with small pore sizes. In this case, it is often necessary to use a precolumn cartridge.

4 Conclusion

UHPLC as a modern separation technique was used for the investigation of the possible application of the new second-generation monolithic Chromolith[®] HighResolution column in bioanalysis. The analytes used for experiments were retinol and α -tocopherol, liposoluble vitamins routinely determined in various biomatrices. The monolithic column was compared with various other columns typically used in UHPLC such as core-shell columns, Kinetex[®], and fully porous columns filled with sub- $2 \mu\text{m}$ particles. The separation efficiency, time of analysis, peak shape, resolution factor, consumption of the mobile phase, lifetime of the column, and cost efficiency were the calculated parameters.

Chromolith[®] HighResolution (100×4.6 mm) and core-shell column Kinetex (100×4.6 mm, particle size $2.6 \mu\text{m}$) columns were finally tested for two types of biological materials, breast milk and human serum. Both columns showed reproducible results with possible usage in clinical area. We

Table 3. Comparison of measured parameters with previously developed methods used in our laboratory

Method	Urbánek et al. [29]		Krčmová et al. [30]		Plišek et al. [31]		This work	
	Chromolith RP-18e (100 × 4.6 mm)		Chromolith RP-18e (100 × 4.6 mm)		Kinetex C18 (2.6 μm, 100 × 4.6 mm)		Chromolith HR RP-18e (100 × 4.6 mm)	
Compound	Retinol	α-Tocopherol	Retinol	α-Tocopherol	Retinol	α-Tocopherol	Retinol	α-Tocopherol
V_i (μL)	50		20		5		1	
MP	100% methanol		100% methanol		100% methanol		100% methanol	
FR (mL/min)	2.5		2.5		1.5		2.5	
T (°C)	25		25		49		50	
N			2 213	3 936	3 265	7 462	5 840	9 034
HETP (μm)			45.1	28.3	31.0	13.0	17.1	11.1
T_f			1.198	1.524	1.750	1.420	1.062	1.105
W (min)			0.21	0.20	0.12	0.13	0.04	0.05
LOD (nmol/L)	20.0	100.0	130.0	90.0	4.0	78.0	2.3	6.4
LOQ (nmol/L)	70.0	300.0	270.0	190.0	12.0	182.0	7.7	21.4
T_A (min)	1.8		1.8		1.75		1.4	
V_S (mL)	450		450		263		350	

V_i , injection volume (μL); MP, mobile phase; FR, flow rate (mL/min); T , temperature (°C); N , number of theoretical plates; HETP, high equivalent to a theoretical plate (μm); T_f , tailing factor; W , width of peak at baseline (min); T_A , time of analysis; V_S , consumption of solvent (mL)/100 samples; HR, high resolution.

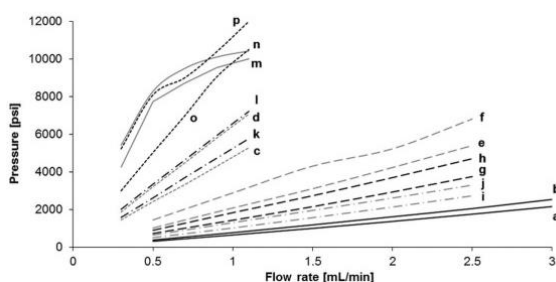


Figure 4. Comparison of back pressure of all tested columns: (a) Chromolith high resolution (HR) RP-18e (100 × 4.6 mm) 50°C; (b) Chromolith HR RP-18e (100 × 4.6 mm) 25°C; (c) Kinetex C18 (1.7 μm, 100 × 3.0 mm) 50°C; (d) Kinetex C18 (1.7 μm, 100 × 3.0 mm) 25°C; (e) Kinetex C18 (2.6 μm, 150 × 4.6 mm) 50°C; (f) Kinetex C18 (2.6 μm, 150 × 4.6 mm) 25°C; (g) Kinetex C18 (2.6 μm, 100 × 4.6 mm) 50°C; (h) Kinetex C18 (2.6 μm, 100 × 4.6 mm) 25°C; (i) Kinetex C18 (2.6 μm, 50 × 4.6 mm) 50°C; (j) Kinetex C18 (2.6 μm, 50 × 4.6 mm) 25°C; (k) Acquity HSS T3 (1.8 μm, 50 × 2.1 mm) 45°C; (l) Acquity HSS T3 (1.8 μm, 50 × 2.1 mm) 25°C; (m) Shim-pack XR-ODS III (1.6 μm, 75 × 2.0 mm) 45°C; (n) Shim-pack XR-ODS III (1.6 μm, 75 × 2.0 mm) 25°C; (o) Acquity BEH (1.7 μm, 100 × 2.1 mm) 50°C; (p) Acquity BEH (1.7 μm, 100 × 2.1 mm) 25°C.

found that the new second-generation monolithic column is comparable and even better in set parameters than other tested UHPLC columns in this separation.

The application of the new monolithic stationary phases in combination with recently developed simple extraction procedures allowed us to improve routine laboratory throughput and economy.

It should also be mentioned that the application of monoliths in combination with UHPLC is a new direction that connects the advantages of both. From our experience, monoliths

bring to UHPLC a new economical possibility without analytical compromise, especially in the case of bioanalysis.

The publication is cofinanced by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic, TEAB, project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235. The authors also acknowledge financial support from the Charles University in Prague (Project UNCE 204026/2012 and project SVV 267 002). This project was supported also by MH CZ – DRO (UHHK, 00179906). The authors would like to express their thanks to Dr. Egidijus Machtejevas (Product Management Analytical Chromatography, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for providing new high-resolution monolithic columns and Shimadzu for the kind donation of a Shim-pack column.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Dolan, J. W., *Lc Gc Europe* 2011, 24, 629–632.
- [2] Wu, N. J., Clausen, A. M., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1167–1182.
- [3] Plumb, R., Mazzeo, J. R., Grumbach, E. S., Rainville, P., Jones, M., Wheat, T., Neue U. D., Smith, B., Johnson, K. A., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1158–1166.
- [4] Plumb, R., Castro-Perez, J., Granger, J., Beattie, I., Joncour, K., Wright, A., *Rapid Commun. Mass Sp.* 2004, 18, 2331–2337.
- [5] Swartz, M. E., *Lc Gc North America* 2005, 8–14.
- [6] Novakova, L., Matysova, L., Solich, P., *Talanta* 2006, 68, 908–918.
- [7] Kirkland, J. J., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1239–1245.

- [8] Gritti, F., Guiochon, G., *Chem. Eng. Sci.* 2011, 66, 3773–3781.
- [9] Kortz, L., Helmschrodt, C., Ceglarek, U., *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399, 2635–2644.
- [10] Guillaume, D., Ruta, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 1069–1082.
- [11] Miyabe, K., Guiochon, G., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 853–873.
- [12] Peters, E. C., Petro, M., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Anal. Chem.* 1997, 69, 3646–3649.
- [13] Svec, F., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 747–766.
- [14] Cabrera, K., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 843–852.
- [15] Hormann, K., Mullner, T., Bruns, S., Holtzel, A., Tallarek, U., *J. Chromatogr. A* 2012, 1222, 46–58.
- [16] Cabrera, K., *Lc Gc North America* 2012, Supplement S, 56–60.
- [17] Song, W. O., Beecher, G. R., Eitenmiller, R. R., *Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins*, Wiley, New York 2000.
- [18] Brigelius-Flohe, R., Kelly, F. J., Salonen, J. T., Neuzil, J., Zingg, J. M., Azzi, A., *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76, 703–716.
- [19] Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Papadoyannis, I. N., *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 1375–1382.
- [20] Krcmova, L., Urbanek, L., Solichova, D., Kasparova, M., Vlckova, H., Melichar, B., Sobotka, L., Solich, P., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2804–2811.
- [21] Karppi, J., Nurmi, T., Olmedilla-Alonso, B., Granado-Lorencio, F., Nyssonena, K., *J. Chromatogr. B* 2008, 867, 226–232.
- [22] Khan, A., Khan, M. I., Iqbal, Z., Shah, Y., Ahmad, L., Watson, D. G., *J. Chromatogr. B* 2010, 878, 2339–2347.
- [23] Semeraro, A., Altieri, I., Patriarca, M., Menditto, A., *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 1209–1215.
- [24] Citova, I., Havlikova, L., Urbanek, L., Solichova, D., Novakova, L., Solich, P., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 675–681.
- [25] Molto-Puigmarti, C., Castellote, A. I., Lopez-Sabater, M. C., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 4388–4394.
- [26] Paliakov, E. M., Crow, B. S., Bishop, M. J., Norton, D., George, J., Bralley, J. A., *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 89–94.
- [27] Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Perez-Sacristan, B., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 1389–1393.
- [28] Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Noziere, P., Graulet, B., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 777–790.
- [29] Urbanek, L., Solichova, D., Melichar, B., Dvorak, J., Svobodova, I., Solich, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, 573, 267–272.
- [30] Krcmova, L., Solichova, D., Plisek, J., Kasparova, M., Sobotka, L., Solich, P., *Int. J. Environ. An. Chem.* 2010, 90, 106–114.
- [31] Plisek, J., Kasparova, M., Solichova, D., Krcmova, L., Kucerova, B., Sobotka, L., Solich, P., *Talanta* 2013, 107, 382–388.
- [32] Kasparova, M., Plisek, J., Solichova, D., Krcmova, L., Kucerova, B., Hronek, M., Solich, P., *Talanta* 2012, 93, 147–152.
- [33] Urbanek, L., Krcmova, L., Solichova, D., Melichar, B., Opletalova, V., Solich, P., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2485–2493.
- [34] Melichar, B., Kalabova, H., Krcmova, L., Urbanek, L., Hyspler, R., Malirova, E., Solichova, D., *Anticancer Res.* 2007, 27, 4397–4401.
- [35] Melichar, B., Krcmova, L., Kalabova, H., Holeckova, P., Kasparova, M., Plisek, J., Hyspler, R., Studentova, H., Solichova, D., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2010, 56, 222–226.
- [36] Melichar, B., Dvorak, J., Kalabova, H., Hyspler, R., Krcmova, L., Kasparova, M., Urbanek, L., Solichova, D., *Scan. J. Clin. Lab. Inv.* 2010, 70, 180–187.
- [37] Holeckova, P., Krcmova, L., Kalabova, H., Kasparova, M., Plisek, J., Pala, M., Vitek, P., Solichova, D., Zedulova, M., Studentova, H., Melichar, B., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2012, 82, 77–84.
- [38] Blaha, V., Solichova, D., Cernohorsky, D., Bratova, M., Vyroubal, P., Zadak, Z., *J. Pharmaceut. Biomed.* 2000, 22, 563–572.
- [39] Solichova, D., Juraskova, B., Blaha, V., Bratova, M., Kusalova, M., Zdansky, P., Zadak, Z., *J. Pharmaceut. Biomed.* 2001, 24, 1157–1162.
- [40] Musil, F., Zadak, Z., Solichova, D., Hyspler, R., Kaska, M., Sobotka, L., Manak, J., *Nutrition* 2005, 21, 118–124.
- [41] Combs, G. F., *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Elsevier Academic Press, San Diego 2008.
- [42] Fekete, S., Olah, E., Fekete, J., *J. Chromatogr. A* 2012, 1228, 57–71.
- [43] Bliesner, M. D., *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide*, Wiley-Interscience, New Jersey 2006.
- [44] Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2007, 1168, 101–168.

10.4.PŘÍLOHA IV. THE EFFECT OF LDL-APHERESIS AND RHEOHAEMAPHERESIS TREATMENT ON VITAMIN E

Solichová D., Bláha M., Aufartová J., Kujovská Krčmová L., Plíšek J., Honegrová B., Kasalová E., Lánská M., Urbánek L., Sobotka L.

Journal of Nutritional Science and Vitaminology 61, 2015, p. 105-112 (citováno 0x, IF₂₀₁₄ - 0,827)

The Effect of LDL-Apheresis and Rheohaemapheresis Treatment on Vitamin E

Dagmar SOLICHOVÁ¹, Milan BLÁHA², Jana AUFARTOVÁ^{1,3}, Lenka Kujovská KRČMOVÁ^{1,3,*}, Jiří PLÍŠEK^{1,3}, Barbora HONEGROVÁ³, Eva KASALOVÁ^{1,3}, Miriam LÁNSKÁ², Lubor URBÁNEK⁴ and Luboš SOBOTKA¹

¹3rd Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital Hradec Králové and Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic

²4th Internal Clinic-Haematology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital Hradec Králové, Czech Republic

³Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Czech Republic

⁴Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Sciences, Palacky University & Institute of Experimental Botany, AS CR v.v.i., Olomouc, Czech Republic

(Received June 26, 2014)

Summary Lipid apheresis (extracorporeal lipoprotein elimination) is administered to patients with familial hypercholesterolemia who fail to respond to standard therapy. The nature of the treatment process raises the suspicion that it decreases not only cholesterol but also antioxidants. A group of 12 patients (average age 47 ± 17 y, 4 homozygous and 8 heterozygous individuals) with familial hypercholesterolemia treated by LDL-apheresis or rheohaemapheresis for 3–12 y was included in the study. In addition to cholesterol and triacylglycerol levels, vitamin E and vitamin A and also other markers of antioxidant activity were investigated. Nevertheless, the most important determined parameter was the vitamin E/cholesterol ratio in serum and lipoproteins. The results indicate that both extracorporeal elimination methods are effective and suitable ways to treat severe familial hypercholesterolemia, as the LDL fraction of cholesterol decreased by approximately 77% and 66% following LDL-apheresis and rheohaemapheresis, respectively. In addition, the serum vitamin E decreased by 54% and 57% and the decrease of the serum vitamin A was approximately 20%. However, the main marker of antioxidant capacity, vitamin E/cholesterol ratio, in the serum, VLDL and LDL significantly increased. The increase of vitamin E levels in the erythrocyte membranes of 2% following LDL-apheresis and a significant increase of 4% following rheohaemapheresis were confirmed. The presented results indicate that LDL-apheresis and rheohaemapheresis can be considered to be safe procedures according to the antioxidant capacity of the serum, VLDL and LDL lipoprotein fractions and the erythrocyte membrane.

Key Words vitamin E, LDL-apheresis, rheohaemapheresis, familial hypercholesterolemia

A complete change in lifestyle, a strict diet and intensive combined pharmacotherapy (HMG CoA reductase inhibitors are the most important components) are necessary for patients with familial hypercholesterolemia (FH) and provide excellent results in most patients. Unfortunately, these measures are not sufficient for all patients (1–6). Homozygous FH patients usually fail to show any response to pharmacotherapy. LDL-apheresis has become the standard treatment for individuals homozygous for FH (7–9). In homozygous FH, statins provide a range of responses, decreasing the plasma LDL anywhere from 0% to 48%, with an average of approximately 15% for receptor-negative individuals and approximately 26% for receptor-defective individuals (5). LDL-apheresis could be offered to treat symptomatic coronary heart disease in individuals who are het-

erozygous FH and whose LDL remains high (>160 mg/dL, 4.2 mmol/L) or decreases by $<40\%$ in response to maximal medical treatment (1).

Term LDL-apheresis was originally used in 1981 by Stoffel et al. (10) as an immunoadsorption elimination extracorporeal method (10). Nowadays, “LDL-apheresis” or “lipoprotein apheresis” is used for all types of extracorporeal eliminations of cholesterol. In our study we used a modification of the Stoffel and Borberg LDL-apheresis-immunoadsorption method and also double filtration plasmapheresis (the primary filter is replaced by a centrifugal separator), which additionally eliminates fibrinogen and has an influence on rheological properties. For our study we will use for the first mentioned method the term “LDL-apheresis” and for the second mentioned method the term “rheohaemapheresis.”

LDL-apheresis is an invasive and relatively expensive but safe procedure (11, 12); it decreases cholesterol radically but it is also troubling to the patient’s standard

*To whom correspondence should be addressed.
E-mail: LenkaKrcmova@seznam.cz

of living. Human LDL particles contain several types of antioxidants, which are important for the regulation of lipid oxidation (13). The treatment process is assumed to decrease not only cholesterol but also important antioxidants, such as vitamin E and vitamin A (7, 13–16). Additionally, other active compounds, such as enzymes, can be affected by certain methods of extracorporeal lipoprotein elimination. Superoxide dismutase (SOD) eliminates very reactive peroxide radicals and forms hydrogen peroxide with oxygen. Glutathione peroxidase (GP_x) ensures detoxification peroxides (17, 18). Malondialdehyde (MDA) is a biomarker that is formed by the lipid peroxidation of unsaturated fatty acids (18).

Antioxidant defence systems, such as enzymes or vitamins, protect the host directly and indirectly against the damaging influence of oxidants (19–22).

The antioxidant/radioprotective activity of α -tocopherol is thought to be associated with its ability to scavenge reactive oxygen species via its phenolic group (23). By controlling the production of free radicals, vitamin E affects free radical-mediated signal transduction events and ultimately modulates the expression of genes that are regulated by free radical signalling (24). Alternately, high concentrations of vitamin E can serve as a prooxidant (25).

Vitamin E is rapidly transferred from chylomicrons to plasma lipoproteins that it binds to non-specifically; it is then taken up by the liver and incorporated into nascent VLDL (with selectivity in favour of α -tocopherol over the γ -tocopherol), and then secreted by the liver. Vitamin E is also spontaneously transferred to apolipoprotein B-containing lipoproteins, including VLDL, LDL and HDL. Therefore, plasma tocopherols are distributed among these three lipoprotein types, with the more abundant LDL and HDL comprising the major carriers of vitamin E (24, 26, 27). For this reason, we investigated the levels of vitamin E in each lipoprotein fraction to more accurately assess pathophysiological processes. The aim of the present work was to evaluate the acute effect of extracorporeal elimination on the levels of vitamins E (α -tocopherol) and A (retinol) of hypercholesterolemic patients who received extracorporeal lipoprotein elimination treatments for a long term (3–12 y). The cholesterol, triacylglycerols (TAG), vitamin E, and vitamin E/cholesterol ratios in serum and the lipoprotein fractions were measured in groups of patients before and after extracorporeal lipoprotein elimination. Additionally, vitamin E was monitored in the erythrocyte membrane, which was considered to be a model of the cell membrane. Moreover, the erythrocyte levels of SOD, GP_x and serum level of MDA were analysed as markers of antioxidant activity and lipid peroxidation, respectively.

METHODS

Blood samples were collected before and after extracorporeal elimination was undertaken. The study protocol was approved by the Ethical Committee of University Hospital in Hradec Králové. Informed consent was obtained from all participants. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki.

The blood was drawn before being rinsed. The blood samples were first centrifuged (2,000 $\times g$, 10 min, 4°C) and then the serum was separated and analysed immediately or frozen at -20°C until analysis. Lipoprotein fractions were prepared from fresh serum using a gradient ultracentrifugation technique, with the addition of a sodium chloride solution of a determined density and 0.1% EDTA to avoid oxidation of the lipoproteins during ultracentrifugation. The serum lipoproteins were separated into very low-density lipoprotein (VLDL, $d < 1.006$), low-density lipoprotein (LDL, $d < 1.063$) and high-density lipoprotein (HDL, $d > 1.063$) fractions using an OPTIMA MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (28).

Patient group. A group of 12 patients received long-term treatments: 7 men and 5 women. The average age was 47 ± 17 y (range, 21–63; median 52 y). The patients included 4 individuals who were homozygous for FH and 8 heterozygous (all heterozygotes were undergoing secondary prevention, with atherosclerotic complications, such as myocardial infarction, bypass, and arterial desobliteration). The MedPed criteria were applied to the patients (29) using cut-offs for total cholesterol and LDL-cholesterol levels above the 95 percentile within the Czech population (30), age, and family history. Furthermore, DNA-based evidence of a mutation in the low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene was the criterion for homozygous FH. None of the patients had a mutation in the Apo-B gene. All patients were treated with high-dose statins, 1 patient in combination with fenofibrate, 2 patients in combination with bile-acid sequestrants, and 10 patients in combination with ezetimibe. The maximally tolerated doses of rosuvastatin or atorvastatin were chosen. Patients with increased levels of fibrinogen were treated by rheohaemapheresis in order to normalize this parameter.

The patients have been regularly treated with LDL-apheresis or rheohaemapheresis for 3–12 y (average, 7 ± 3 ; range, 2–11; median, 7 y). Both procedures were carried out at an accredited facility, the Blood Cell Separator Centre, University Hospital in Hradec Králové, Czech Republic, using standardised methods and by experienced personnel.

LDL-apheresis technique. Plasma separation was performed using a Cobe-Spectra continuous centrifugal separator or Optia separator (Terumo BCT, Lakewood, CO). An automatic adsorption-desorption device (Adasorb, Medicap, Ulrichstein, Germany) was used to control the repeated fillings and washings of Lipopak 400[®] adsorbers (Pocard, Moscow, Russia). In two patients, Lipocollect adsorbers (Medicollect, Rimbach, Germany) were used for 32–54 mo. Initially, our target LDL-cholesterol level after the procedure was below 1 mmol/L; currently, a more effective rate of below 0.5 mmol/L has been applied. Normal values are 1.5–3.36 mmol/L.

Rheohaemapheresis technique. Plasma was collected using a Cobe-Spectra or Optia separator (Terumo BCT) following high-speed centrifugation. The plasma were then run through a “second stage” filter (Evaflux 4A or 5A, Kuraray, Tokyo, Japan) with ethylene-vinyl alcohol

hollow fibres with a hole size of 0.04 μm . Further, we used a CF-100 (Infomed, Geneva, Switzerland), which regulated inflow of plasma into the filter. The plasma flow was continuous, anticoagulation was carried out using heparin and ACD-A (Baxter, Munich, Germany), and the basic volume of processed plasma was 1.5 times the body volume, as calculated by the computer of the Cobe or Optia separator.

Analytical determination of retinol and α -tocopherol in serum, lipoprotein fractions and erythrocyte membrane. The method used in this study for the analysis of retinol and α -tocopherol in the serum and lipoprotein fractions was modified from the method previously published by Urbánek et al. and is briefly described below (31).

In the liquid-liquid extraction (LLE) procedure, 500 μL of serum was deproteinised using cold ethanol with 5% of methanol. Then, *n*-hexane was added to this mixture and extracted using a vortex apparatus. After centrifugation, an aliquot of the clean extract was separated and evaporated in a concentrator. The residue was dissolved in 400 μL of methanol and analysed using a Prominence HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The separation of retinol and α -tocopherol was performed using the Chromolith Performance RP-18e monolithic column (Merck, Darmstadt, Germany). The detection of retinol and α -tocopherol was carried out at 325 and 295 nm, respectively, using a diode array detector.

The level of α -tocopherol in the erythrocyte membrane was analysed using a modified HPLC method previously published by Solichová et al. (32). A Chromolith Performance RP-18e monolithic column, 100 \times 4.6 mm (Merck) with the same sample pretreatment that was applied prior to HPLC analysis was used for the chromatographic separation.

Analytical determination of cholesterol and triacylglycerols. The serum cholesterol and TAG were determined using a MODULAR analyser (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) with commercially available kits according to the manufacturer's instructions. The same methods were used to evaluate the cholesterol and TAG levels in the lipoprotein fractions.

Analytical determination of enzymes. The erythrocyte glutathione peroxidase was determined spectrophotometrically using a commercial kit (Ransel, Randox, Crumlin, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions and the elimination of absorbance at a wavelength of 340 nm (Cobas Mira, Roche, Basel, Switzerland).

The serum malondialdehyde was measured as a red complex with thiobarbituric acid at 485, 532 and 560 nm using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman, Palo Alto, CA).

Superoxide dismutase was determined spectrophotometrically using a commercial kit (Ransod, Randox) according to the manufacturer's instructions and the elimination of absorbance at a wavelength of 505 nm (Secomam, Ales, France).

Statistical analysis. The NCSS 2007 software (Kaysville, UT) was used to perform statistical evaluations of the changes in each measured parameter

before and after extracorporeal elimination therapy. The evaluations were performed using the un-parametrical Mann-Whitney *U* and Wilcoxon Signed-Rank tests. Statistical significance was based on $p \leq 0.05$.

RESULTS

Cholesterol and triacylglycerols

The decreases in the cholesterol levels are presented in Table 1. These results indicate that both extracorporeal elimination methods are effective and suitable treatments, as the cholesterol decreased with both methods in the low-density lipoprotein (LDL) fraction by approximately 77% and 66% for LDL-apheresis and rheohaemapheresis, respectively. Cholesterol was measured for both methods in the various lipoprotein fractions. Levels in the very low-density lipoprotein (VLDL) fraction decreased by 68% and 66%. Levels in the high-density lipoprotein (HDL) fraction exhibited lower decreases relative to those of the other fractions, by 33% and 39% for apheresis and rheohaemapheresis, respectively.

The first three measurements and the last three measurements of the monitored period were compared, and no significant differences were observed for either extracorporeal elimination method. The means of the first and last three measurements of cholesterol levels were 5.86 ± 1.32 mmol/L and 5.60 ± 1.35 mmol/L, respectively.

Triacylglycerols (TAG) exhibited decreases in the serum and in the VLDL and LDL fractions in both methods. The initial levels decreased by approximately half (48–58%). Conversely, the level of TAG in HDL increased during LDL-apheresis by 16%, but this increase was not significant. Rheohaemapheresis decreased the level of TAG in the HDL fraction by 27%. All of the results for cholesterol and TAG are presented in Table 1.

Vitamin E

Both methods of extracorporeal lipoprotein elimination significantly decreased the levels of vitamin E in the serum and all lipoprotein fractions (Table 1). The decreases in the serum were by 54% and 57%, respectively. The levels in the various lipoprotein fractions exhibited decreases that ranged from 36–73%. However, decreases in the vitamin E/cholesterol ratio were not observed in the serum or in the VLDL and LDL fractions, which showed significant increases that ranged from 5–61%. There was only a significant decrease (1–6%) of the vitamin E/cholesterol ratio in the HDL fraction. These results are presented in Table 2.

The results (Table 1) confirmed a slight increase in the level of vitamin E in erythrocyte membranes of 2% during LDL-apheresis (not significant), as well as a significant increase of 4% during rheohaemapheresis.

Vitamin A and other metabolites

Both methods of extracorporeal lipoprotein elimination significantly decreased the levels of vitamin A in the serum (Table 1). The total decrease in this vitamin was approximately 20%.

The erythrocyte superoxide dismutase and erythrocyte glutathione peroxidase did not exhibit any significant changes. Similar results were observed for serum

Table 1. Levels of target analytes in serum, lipoprotein fractions and erythrocytes before and after extracorporeal elimination treatment.

Target analytes	Group	n*	Before procedure		After procedure		Statistical significance
			Average	SD	Average	SD	
Cholesterol-serum (mmol/L)	AP	155	5.34	1.27	1.73	0.89	<i>p</i> <0.0001
	RH	144	5.07	1.42	1.96	0.56	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	299	5.21	1.34	1.84	0.76	<i>p</i> <0.0001
Cholesterol-VLDL (mmol/L)	AP	160	1.03	0.50	0.33	0.27	<i>p</i> <0.0001
	RH	146	1.09	0.53	0.37	0.17	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	306	1.06	0.51	0.35	0.23	<i>p</i> <0.0001
Cholesterol-LDL (mmol/L)	AP	160	3.12	0.92	0.72	0.35	<i>p</i> <0.0001
	RH	147	2.86	0.98	0.97	0.44	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	307	2.99	0.96	0.84	0.42	<i>p</i> <0.0001
Cholesterol-HDL (mmol/L)	AP	160	1.01	0.33	0.68	0.22	<i>p</i> <0.0001
	RH	148	0.99	0.44	0.60	0.19	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	308	1.00	0.39	0.64	0.21	<i>p</i> <0.0001
TAG-serum (mmol/L)	AP	156	1.94	1.42	0.81	0.73	<i>p</i> <0.0001
	RH	145	2.28	1.64	1.17	0.69	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	301	2.20	1.54	0.98	0.73	<i>p</i> <0.0001
TAG-VLDL (mmol/L)	AP	160	1.35	1.22	0.57	0.61	<i>p</i> <0.0001
	RH	146	1.62	1.31	0.84	0.57	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	306	1.48	1.27	0.70	0.61	<i>p</i> <0.0001
TAG-LDL (mmol/L)	AP	160	0.38	0.15	0.18	0.19	<i>p</i> <0.0001
	RH	147	0.43	0.16	0.22	0.14	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	307	0.40	0.16	0.20	0.17	<i>p</i> <0.0001
TAG-HDL (mmol/L)	AP	160	0.12	0.07	0.14	0.19	0.940813
	RH	148	0.15	0.09	0.11	0.06	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	308	0.13	0.08	0.12	0.14	<i>p</i> <0.0001
Vitamin E-serum (μ mol/L)	AP	159	27.00	7.02	11.70	3.36	<i>p</i> <0.0001
	RH	144	25.36	8.59	11.69	3.77	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	303	26.22	7.83	11.71	3.56	<i>p</i> <0.0001
Vitamin E-VLDL (μ mol/L)	AP	159	8.88	5.98	3.28	2.49	<i>p</i> <0.0001
	RH	146	9.07	5.54	3.68	1.98	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	305	8.97	5.77	3.47	2.25	<i>p</i> <0.0001
Vitamin E-LDL (μ mol/L)	AP	158	12.54	3.03	3.37	1.22	<i>p</i> <0.0001
	RH	144	10.97	4.38	3.90	1.67	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	302	11.79	3.82	3.62	1.47	<i>p</i> <0.0001
Vitamin E-HDL (μ mol/L)	AP	160	6.80	2.41	4.34	1.71	<i>p</i> <0.0001
	RH	146	5.96	2.10	3.48	1.36	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	306	6.40	2.30	3.93	1.61	<i>p</i> <0.0001
Vitamin E-ery (μ mol/L)	AP	154	3.54	1.47	3.62	1.45	0.128334
	RH	140	3.02	1.36	3.15	1.35	0.002414
	AP+RH	294	3.29	1.44	3.39	1.42	0.001683
Vitamin A-serum (μ mol/L)	AP	158	1.57	0.50	1.23	0.43	<i>p</i> <0.0001
	RH	145	1.81	0.50	1.46	0.41	<i>p</i> <0.0001
	AP+RH	303	1.69	0.51	1.34	0.43	<i>p</i> <0.0001
MDA-serum (μ mol/L)	AP	108	0.61	0.44	0.57	0.29	0.636777
	RH	40	0.69	0.41	0.73	0.24	0.256012
	AP+RH	151	0.62	0.43	0.61	0.29	0.252002
SOD-ery (U/gHb)	AP	78	1857.04	786.84	1878.26	734.43	0.423970
	RH	27	1958.67	692.09	1993.10	906.20	0.838187
	AP+RH	108	1874.80	756.30	1900.70	775.30	0.489416
GP _x -ery (U/gHb)	AP	73	40.36	11.77	41.05	12.34	0.161705
	RH	26	40.70	12.86	40.60	13.14	0.647540
	AP+RH	102	40.63	11.91	41.01	12.35	0.572619

AP: LDL-apheresis, RH: rheohaemapheresis, ery: erythrocytes.

* Number of pair measurements.

Table 2. Ratios of vitamin E and cholesterol in serum and lipoprotein fractions before and after extracorporeal elimination treatment.

Vitamin E/cholesterol (10 ⁻³) in	Group	n*	Before procedure		After procedure		Statistical significance
			Average	SD	Average	SD	
Serum	AP	149	5.73	6.92	9.25	13.33	p<0.0001
	RH	142	5.11	1.29	6.22	2.74	p<0.0001
	AP+RH	291	5.43	5.03	7.77	9.03	p<0.0001
VLDL	AP	155	8.62	3.42	10.49	5.22	p<0.0001
	RH	144	8.42	2.58	10.41	3.75	p<0.0001
	AP+RH	299	8.50	3.09	10.45	4.57	p<0.0001
LDL	AP	155	4.29	1.45	5.02	1.55	p<0.0001
	RH	143	3.97	1.74	4.17	1.25	p<0.0001
	AP+RH	298	4.14	1.60	4.61	1.47	p<0.0001
HDL	AP	157	6.85	2.05	6.46	1.65	0.028095
	RH	146	6.11	1.49	6.05	3.12	0.007528
	AP+RH	303	6.49	1.84	6.26	2.47	p<0.0001

AP: LDL-apheresis, RH: rheohaemapheresis.

* Number of pair measurements.

malondialdehyde, which was monitored as a marker for the oxidative degradation or lipoperoxidation of cellular membranes (Table 1).

DISCUSSION

The lipid-soluble vitamin E (tocopherols) antioxidants, including α - and γ -tocopherol, are an important front line defense (33). We have confirmed that patients treated using extracorporeal methods undergo a significant decrease in their vitamin E levels in serum and lipoprotein fractions. However, this decrease was partly expected due to the disposition of the treatment methods. It is supposed that vitamin E has suppressive effects on atherosclerosis through antioxidant action (14). A reactive oxygen species attack can lead to a major depletion of antioxidants such as vitamin E (33). Vitamin E is essential, along with cholesterol, for the structural stability of membranes (34, 35). Indeed, a relation between the vitamin E content and resistance against oxidation of LDL has not been demonstrated, unless vitamin E was supplemented (36). This vitamin partially controls lipid peroxidation and oxidative stress-related disease including end-storage renal disease (37). Vitamin E-coated membranes are proved to increase vitamin E levels in plasma and therefore scavenge reactive oxygen species and reduce oxidative stress (37). Circulating tocopherol is well known to be distributed among all classes of lipoproteins, and between lipoproteins and red blood cell membranes (38, 39). For this reason, we observed the vitamin E/cholesterol ratios in the serum and in the various lipoprotein fractions. Antioxidant activity was not heavily affected, which was confirmed by examining the ratios of vitamin E/cholesterol, which significantly increased in the serum and the VLDL and LDL fractions and slightly decreased in the HDL fraction. Furthermore, we determined the levels of vitamin E in the erythrocyte membranes, as this vitamin is almost exclusively located in membranes (24). Wang and Quinn investigated rat

plasma and reported that the levels reached a maximum after 48 h, and the liver was the main organ in which the vitamin had been accumulated. The levels in the kidney, heart, muscle and brain continued to increase throughout a 6-wk period (40).

In addition, erythrocytes are the major cellular component of blood, and erythrocyte membrane fluidity can be affected by diseases associated with oxidative stress (41). A study by Rajasekaran et al. proposed that the regulation of α -tocopherol levels in membranes is critically important to maintain the erythrocyte membrane structure and function (42). Recently, it has been hypothesized that α -tocopherol partitions into domains of membranes that are rich in polyunsaturated phospholipids, amplifying the concentration of the vitamin where it is most needed (43). The presented results indicated that vitamin E in erythrocytes did not change after LDL-apheresis and showed only a slight increase (although it was significant) after rheohaemapheresis. These results were also expected, as mentioned above.

Vitamin A is an important micronutrient that has an unusually wide range of vital biological functions (e.g., morphogenesis, vision, embryonic development, reproduction, immune function) in the mammalian system (44). In healthy individuals, plasma vitamin A is maintained within a narrow range (0.88–2.76 $\mu\text{mol/L}$ in adults; typically approximately half that in newborn infants) despite widely varying intakes of vitamin/provitamin A. Vitamin A levels are significantly reduced, although not below the normal value, during extracorporeal lipoprotein elimination.

Ascorbate administration can be useful to lower the levels of hydrogen peroxide and proinflammatory mediators in patients undergoing apheresis (45). It was also initially hypothesized that ascorbic acid may decrease lipoprotein(a) concentrations; however, a study in 100 healthy people did not confirm this hypothesis (46). Though ascorbic acid proved strong scavenging H_2O_2

activity, in our study, we focused only on fat soluble vitamins.

Oxidation of LDL and the formation of lipid hydroperoxides are now widely accepted as a crucial step in atherogenesis. One important decomposition product of lipid hydroperoxides is MDA, which is derived from unsaturated fatty acids carrying more than two double bonds (47, 48). However, according to observation of Schettler et al. (48) no difference between hyperlipidemic patients undergoing LDL-apheresis and coronary heart disease patients not undergoing extracorporeal treatment was confirmed. Nevertheless, an increased concentration in both patients groups has been claimed (48).

The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GP_x) work together to remove reactive oxygen species from the cell in order to prevent oxidation of biological material. The enzyme SOD reduces the superoxide anion to hydrogen peroxide, which is further reduced to water by the actions of glutathione peroxidase. Exposure to fluoride induces increased lipid peroxidation measured as malondialdehyde by altering the activity of antioxidant enzymes: SOD, CAT, and GP_x (49–51). The major function of GP_x is to reduce soluble hydrogen peroxide and alkyl peroxides (52). GP_x uses glutathione as the hydrogen donor, and produces GSSG (glutathione disulfide) and water (53). Under normal physiological conditions the pathways of SOD and GP_x are complemented by the additional hepatocellular antioxidants, glutathione (GSH), vitamin E and ascorbate (49, 50).

Protection against toxic effects of oxygen radicals is represented by antioxidant enzymes such SOD and GP_x. SOD seems to be the first line of defence against oxygen radicals generated by phagocytes. Schettler et al. (48) suppose that no critical concentration of oxygen radicals is achieved during LDL-apheresis process, since SOD activity is not affected. GP_x is a selenoprotein that reduces lipid and other organic hyperperoxides including peroxide. In agreement with our findings, GP_x was not affected by LDL apheresis. However, Schettler et al. (48) observed a decrease of selenium plasma concentration and explained it by partial removal of LDL, since LDL particles play an important role in selenium transportation in plasma.

According to our results, there were significant decreases in the serum vitamin E and lipoproteins. However, the vitamin E/cholesterol ratios significantly increased or slightly decreased in the HDL fraction. These ratios provide the most important information regarding oxidative processes. Additionally, it was confirmed that the levels of vitamin E remained constant in the membranes. The vitamin A levels were significantly reduced, but not below the baseline value. The other measured compounds, such as the serum MDA, erythrocyte SOD, and erythrocyte GP_x were not significantly affected by the LDL-apheresis or rheohaemapheresis processes.

The presented results indicate that, based on the serum oxidation activity of the lipoprotein fractions and

the erythrocyte membrane, LDL-apheresis and rheohaemapheresis can be considered to be safe procedures for the treatment of familial hypercholesterolemia.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Markéta Drastíková, Iveta Svobodová and Martina Slanařová for excellent technical assistance. The authors gratefully acknowledge the financial support of IGA MH CZ, No. NT 13475-4/2012, NT 14037-2013 and NT14265-3/2013. The publication is co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic. Project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0061, project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization 00179906 and PRVOUK 37/12.

REFERENCES

- 1) Civeira F. 2004. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **173**: 55–68.
- 2) Watts GE, Sullivan DR, Poplawski N, van Bockxmeer F, Hamilton-Craig I, Clinton PM, O'Brien R, Bishop W, Georgie P, Barter PJ, Bates T, Burnett JR, Coakley J, Davidson P, Emery J, Martin A, Farid W, Freeman L, Geelhoed E, Juniper A, Kidd A, Koster K, Krass I, Livingston M, Maxwell S, O'Leary P, Owaimrin A, Redgrave TG, Reid N, Southwell L, Suthers G, Tonkin A, Toalet S, Trent R. 2011. Familial hypercholesterolaemia: A model of care for Australasia. *Atheroscler Suppl* **12**: 221–263.
- 3) Kaya H, Helvacı MR, Ustun I, Gokce C, Celik M, Ucar E. 2012. P-47 LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia (FH). *Transfus Apher Sci* **47** (Suppl 1): S43.
- 4) Farnier M, Bruckert E. 2012. Severe familial hypercholesterolemia: current and future management. *Arch Cardiovasc Dis* **105**: 656–665.
- 5) Raal FJ, Santos RD. 2012. Homozygous familial hypercholesterolemia: Current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis* **223**: 262–268.
- 6) Bláha M, Vlčková H, Nováková L, Solichová D, Solich P, Lánská M, Malý J, Bláha V. 2011. Use of ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to demonstrate decreased serum statin levels after extracorporeal LDL-cholesterol elimination. *J Biomed Biotechnol* Article ID 912472 DOI:10.1155/2011/912472.
- 7) Bláha M, Cermanová M, Bláha V, Blažek M, Malý J, Široký O, Solichová D, Filip S, Řeháček V. 2007. Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Ther Apher Dial* **11**: 9–15.
- 8) Bláha M. 2003. Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Medica* **46**: 3–7.
- 9) Kusters DM, Hutten BA, McCrindle BW, Cassiman D, Francis GA, Gagné C, Gaudet D, Morrison KM, Langslet G, Kastalein JJ, Wiegman A. 2013. Design and baseline data of a pediatric study with rosuvastatin in familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* **7**: 408–413.
- 10) Stoffel W, Borberg H, Greve GV. 1981. Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *Lancet* **2**: 1005–1011.
- 11) De Castro-Orós I, Pociová M, Civeira F. 2010. The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet* **3**: 53–64.

- 12) Bláha V, Solichová D, Bláha M, Hyšpler R, Havel E, Vyrubal P, Žďánský P, Zadák Z. 2002. Interrelationship between fatty acid composition, lipid peroxidation and alpha-tocopherol consumption post-LDL-apheresis treatment evaluated by liquid chromatography and gas chromatography. *Anal Chim Acta* **467**: 125–132.
- 13) Upston JM, Terentis AC, Stocker R. 1999. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J* **13**: 977–994.
- 14) Preedy VR, Watson RR. 2007. Alpha-tocopherol in lipoprotein apheresis. In: *The Encyclopedia of Vitamin E* (Bláha V, Solichová D, Bláha M, Žďánský P, Zadák Z, eds), p 617–624. CAB International, Oxfordshire.
- 15) Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**: 595–603.
- 16) Blaha M, Rencova E, Langrova H, Studnička J, Blaha V, Rozsival P, Lanska M, Sobotka L. 2013. Rheohemapheresis in the treatment of nonvascular age-related macular degeneration. *Atheroscler Suppl* **14**: 179–184.
- 17) Weydert CJ, Cullen JJ. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* **5**: 51–66.
- 18) Lonn ME, Dennis JM, Stocker R. 2012. Actions of antioxidants in the protection against atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* **53**: 863–884.
- 19) Sies H, Stahl W, Sundquist AR. 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* **669**: 7–20.
- 20) Biesalski HK, Frank J. 1995. Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-/oxidative balance in the immune system. *Immun Infekt* **23**: 166–173.
- 21) Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* **62**: 1315S–1321S.
- 22) Wang X, Wu L, Aouffen M, Mateescu MA, Nadeau R, Wang R. 1999. Novel cardiac protective effects of urea: from shark to rat. *Br J Pharmacol* **128**: 1477–1484.
- 23) Singh AK, Gopu K. 2010. Synthesis and antioxidant properties of novel α -tocopherol glycoconjugates. *Tetrahedron Lett* **51**: 1180–1184.
- 24) Combs GE. 2008. Vitamin A and vitamin E. In: *The Vitamins*, p 95–143, 181–212. Elsevier, London.
- 25) Leshchinsky TV, Klasing KC. 2001. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poult Sci* **80**: 1590–1599.
- 26) Assogba U, Lepage S, Bruckert E, Bonnefont-Rousselot D, Dairou F, De Gennes JL, Delattre J. 1995. Blood antioxidants (vitamin E and β -carotene) in long-term low density lipoprotein apheresis. *Clin Chim Acta* **235**: 147–157.
- 27) Cauza E, Jansen M, Resch U, Dunky A, Derfler K, Winkhofer-Roob BM, Kostner K. 2004. Effects of LDL-immunoapheresis on plasma concentrations of vitamin E and carotenoids in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Apher* **19**: 174–179.
- 28) Naito HK. 1986. Lipoprotein separations using the TL-100 tabletop ultracentrifuge. *Application Note Beckman DS-693*.
- 29) Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN. 1993. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* **72**: 171–176.
- 30) Šamánek M, Urbanová Z. 1997. Cholesterol and triacylglyceride levels and their development. *Cas Lek Ces* **136**: 380–385.
- 31) Urbánek L, Solichová D, Melichar B, Dvořák J, Svobodová I, Solich P. 2006. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* **573-574**: 267–272.
- 32) Solichová D, Korecká L, Svobodová I, Musil F, Bláha V, Žďánský P, Zadák Z. 2003. Development and validation of HPLC method for the determination of alpha-tocopherol in human erythrocytes for clinical applications. *Anal Bioanal Chem* **376**: 444–447.
- 33) Gizi A, Papassotiriou I, Apostoloukou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I, Kalotychoy V, Goussetis E, Kattamis A, Rombos I, Kanavakis E. 2011. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cell Mol Dis* **46**: 220–225.
- 34) Brown KM, Morrice PC, Duthie GG. 1997. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and non-smokers: Dose response to vitamin E supplementation. *Am J Clin Nutr* **65**: 496–502.
- 35) Solichova D, Juraskova B, Blaha V, Bratova M, Kusalova M, Zdansky P, Zadak Z. 2001. Bioanalysis of age-related changes of lipid metabolism in nonagenarians. *J Pharm Biomed Anal* **24**: 1157–1162.
- 36) Kroon AA, Demacker PNM, Kleinvelde HA, Stalenhoef AFH. 1999. The rebound of lipoproteins after LDL-apheresis. Effects on chemical composition and LDL-oxidizability. *Atherosclerosis* **147**: 105–113.
- 37) Nakamura T, Kawagoe Y, Matsuda T, Takahashi Y, Sekizuka K, Ebihara I, Hikaru K. 2003. Effects of LDL apheresis and vitamin E-modified membrane on carotid atherosclerosis in hemodialyzed patients with arteriosclerosis obliterans. *Kidney Blood Press Res* **26**: 185–191.
- 38) Behrens WA, Madère LTR. 1985. Transport of α - and γ -tocopherol in human plasma lipoproteins. *Nutr Res* **5**: 167–174.
- 39) Ogihara T, Miki M, Kitagawa M, Mino M. 1988. Distribution of tocopherol among human plasma lipoproteins. *Clin Chim Acta* **174**: 299–306.
- 40) Wang X, Quinn PJ. 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* **38**: 309–336.
- 41) Sun Y, Ma A, Li Y, Han X, Wang Q, Liang H. 2012. Vitamin E supplementation protects erythrocyte membranes from oxidative stress in healthy Chinese middle-aged and elderly people. *Nut Res* **32**: 328–334.
- 42) Rajasekaran NS, Devaraj NS, Devaraj H. 2004. Modulation of rat erythrocyte antioxidant defense system by buthionine sulfoximine and its reversal by glutathione monoester therapy. *Biochim Biophys Acta* **1688**: 121–129.
- 43) Lauridsen C, Jensen SK. 2012. α -Tocopherol incorporation in mitochondria and microsomes upon supra-nutritional vitamin E supplementation. *Genes Nutr* **7**: 475–482.
- 44) Tiruvalluru M, Ananthmakula P, Ayyalasomayajula V, Nappanveetil G, Ayyagari R, Reddy GB. 2013. Vitamin A supplementation ameliorates obesity-associated retinal degeneration in WNIN/Ob rats. *Nutrition* **29**: 298–304.
- 45) Pignalosa O, Infante T, Napoli C. 2014. The use of therapeutic apheresis in cardiovascular disease. *Transfus Med*

- 24:** 68–78.
- 46) Parhofer GK. 2011. Lipoprotein(a): Medical treatment options for an elusive molecule. *Curr Pharm Design* **17:** 871–876.
- 47) Mellwing KP, Pulawski E, Horstkotte D, van Buuren F. 2012. Lipid apheresis: oxidative stress, rheology, and vasodilatation. *Clin Res Cardiol Suppl* **7:** 45–49.
- 48) Schettler V, Methe H, Staschinsky, Schuff-Werner P, Muller GA, Wieland E. 1999. The oxidant/antioxidant balance during regular low density lipoprotein apheresis. *Ther Apher* **3:** 219–226.
- 49) Yuan L, Kaplowitz N. 2009. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med* **30:** 29–41.
- 50) Valdivia A, Pérez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, Ikuta I, Jordán J. 2009. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J Physiol Biochem* **65:** 195–208.
- 51) Stawiarska-Pieta B, Zebracka M, Grzegorzak N, Helis A, Zalejska-Fiolka J, Birkner E, Bielec B. 2013. Influence of vitamin E on liver morphology and activity of carbohydrate enzymes of rats exposed to sodium fluoride. *Fluoride* **46:** 142–148.
- 52) Eroglu S, Pandir D, Uzun FG, Bas H. 2013. Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Biol Res* **46:** 33–38.
- 53) Orta B, Erkan M. 2014. Effects of vitamin C and antioxidant systems and steroidogenic enzymes in sodium fluoride-exposed TM4 sertoli cells. *Fluoride* **47:** 139–151.

10.5.PŘÍLOHA V. BLOOD LEVELS OF ANTIOXIDANTS DURING AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION TREATMENT BY RHEOHAEMAPHERESIS

Aufartová J., Bláha M., Kasalová E., Honegrová B., Červinková B., Kujovská Krčmová L.,
Plíšek J., Lánská M., Sobotka L., Solichová D.

Biomedical Papers 159 (3), 2015, p. 400-406 (citováno 0x, IF₂₀₁₄ – 1,200)

Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis

Jana Aufartova^c, Milan Blaha^b, Eva Kasalova^c, Barbora Honegrova^c, Barbora Cervinkova^c, Lenka Kujovska Krcmova^{a,c}, Jiri Plisek^c, Miriam Lanska^b, Lubos Sobotka^a, Dagmar Solichova^a

Aims. Rheohaemapheresis treatment influences rheological markers and most likely improves metabolism in affected retinal areas, resulting not only in absorption of soft drusen but also reduction or complete disappearance of drusenoid retinal pigment epithelium detachments. However, the character of the treatment process has raised suspicion that there is a decrease not only in cholesterol but also in antioxidants, such as vitamin E and vitamin A.

Methods. Twenty-three patients with the progressive dry form of age-related macular degeneration were each treated with 8 procedures of rheohaemapheresis. We measured levels of vitamin E (α -tocopherol), the vitamin E/cholesterol ratio in serum and lipoproteins (VLDL, LDL, HDL). Vitamin E in erythrocyte membrane and serum vitamin A (retinol) were also measured. These parameters were determined before and after rheohaemapheresis. Erythrocyte superoxide dismutase, erythrocyte glutathione peroxidase and serum malondialdehyde were analysed as markers of antioxidant activity and lipid peroxidation, respectively.

Results. In serum, the VLDL and LDL fraction ratios of vitamin E/cholesterol increased significantly. Additionally, the HDL fraction ratio showed an increase but this was not statistically significant. The patients showed no clinical signs of vitamin E deficiency, and their serum concentrations of vitamin E did not differ from normal values. The results show that rheohaemapheresis in addition to causing a significant reduction in atherogenic LDL cholesterol, may have favourable additive anti-atherogenic effects due to a relative increase in the content of vitamin E in the lipoprotein fractions.

Key words: rheohaemapheresis, age related macular degeneration, vitamin E, vitamin E/cholesterol ratio, antioxidants

Received: February 2, 2015; Accepted: May 15, 2015; Available online: June 12, 2015
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2015.028>

^a3rd Department of Internal Medicine – Metabolic Care and Gerontology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

^b4th Department of Internal Medicine - Hematology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague and University Hospital Hradec Kralove

^cDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove
Corresponding author: Lenka Kujovska Krcmova, e-mail: LenkaKrcmova@seznam.cz

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is a highly complex disease, with demographic, environmental and genetic risk factors¹. It affects the central region of the retina and choroid, which can result in loss of central vision². AMD is a bilateral disorder; choroidal neovascular membranes develop in more than one fourth (26%) of fellow eyes that are initially free of exudative AMD over a 5-year period³. AMD is also the leading cause of vision loss in the developed world, such as in Europe, the USA and Australia, among people older than 55/ 65 years old, accounting for up to 50% of all cases. Additionally, its prevalence is likely to increase as a consequence of increasing longevity²⁻⁶. The prevalence in adults is approximately 3% (ref.²). It is estimated that approximately 30% of adults older than the age of 75 years old have some signs of AMD and that approximately 10% of these patients demonstrate advanced or late stages of the disease⁷. A comparison of statistical data from the Czech Republic with those from other countries provided difficulties be-

cause in the Czech Republic, the limit for legal blindness is 1/60, while in other countries, it is 6/60 (ref.⁵).

Clinically, AMD appears in two forms - a non-exudative dry form and an exudative wet form - which in an individual patient can also represent stages of the disease. The non-exudative form involves a variety of presentations, including hard drusen, soft drusen, and geographic (areolar) atrophy of the retinal pigment epithelium (RPE). This non-exudative form of AMD accounts for 80-90% of AMD cases^{5,8}.

Greater intake of fish, nuts, and dark green, leafy vegetables has been associated with lower risk for AMD. An increase of intake of vegetable fat, mono- and polyunsaturated fatty acids, and linoleic acid was associated with increased risk for AMD (ref.⁷). The Age-Related Eye Disease Study (AREDS), a multi-centre, randomised, controlled clinical trial, demonstrated that oral supplementation with a combination of vitamin C, vitamin E, β -carotene, zinc oxide and cupric oxide in patients with intermediate or advanced AMD in one eye resulted in a 25% relative risk reduction of developing advanced AMD

in the other eye^{5,8}. A comparison with placebo demonstrated a statistically significant odds reduction for the development of advanced AMD with antioxidants plus zinc⁹. The US Veterans Administration's LAST (Lutein Antioxidant Supplementation Trial) study found that lutein supplementation, alone or in combination, significantly augmented macular pigment, improved near visual acuity and contrast sensitivity and demonstrated a lack of disease progression over the one-year study period. Gale et al. found that the serum concentration of zeaxanthin was significantly lower in individuals with AMD, compared to those without the disease. Serum concentrations of lutein and of lutein and zeaxanthin combined were also lower but not significantly¹⁰⁻¹².

Bláha et al. observed, after rheohaemapheresis (RH), not only absorption of soft drusen but also a reduction in or complete disappearance of drusenoid retinal pigment epithelium detachments (RPEDs). RH influenced rheological markers and most likely improved metabolism in the affected retinal areas, leading to the positive results⁸. RH results in a decrease in high-weight molecules, such as fibrinogen, immunoglobulins (mainly IgM), LDL cholesterol and other compounds. For this reason, the viscosity of the blood decreases, and the proportions of cytokines and adhesion molecules also change positively. Moreover, the deformability of erythrocytes decreases. Clinical studies on implementing RH in AMD have been guided by evidence-based medicine¹³.

However, the character of the treatment process has raised the suspicion that RH also causes a decrease in antioxidants, such as vitamin E and vitamin A.

METHOD

Patient group

From June 2008 to July 2011, twenty-three patients with the non-neovascular form of AMD were randomised. Patients were treated with 8 procedures of RH (9 men, 14 women, mean age 67 years old, range 41-85 years).

Patients admitted to the study had to have received a diagnosis of AMD in both eyes, including dry AMD in one or both eyes confirmed by fluorescein angiography and fundus photography. The exclusion criteria were retinal or choroidal disorders other than AMD, optic nerve disorders, glaucoma, conditions limiting examination of the fundus, and acute bleeding in the study eye. The general exclusion criteria for RH treatment were the usual exclusion criteria for extracorporeal circulation or therapeutic haemapheresis and the absence of peripheral veins suitable for establishing an extracorporeal circuit. Regarding randomisation, patients with the late-stage, high-risk, preangiogenic form of AMD with soft drusen, confluent soft drusen and DPEDs were assigned to RH therapy.

Rheohaemapheresis

The cascade method of plasma filtration was used as our modification of rheotherapy (named rheohaemapheresis by Borberg et al., 2006) (ref.¹⁴⁻¹⁷) (Fig. 1). After

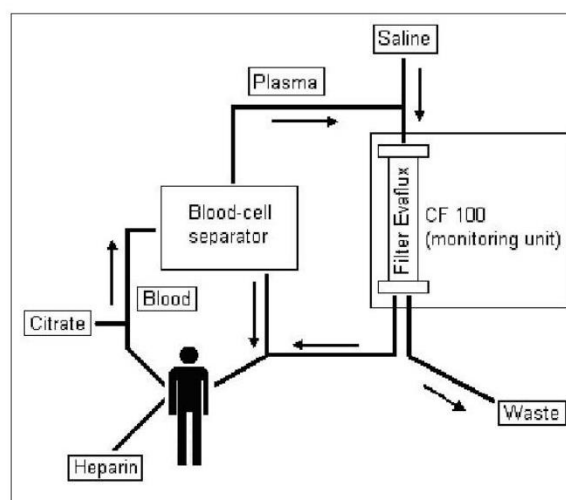


Fig. 1. Scheme of rheohaemapheresis with our modification.

plasma separation (blood-cell separator, Cobe-Spectra, Denver, CO, USA), the separated plasma was pumped through the rheofilter (Evaflex 4A, Kuraray, Japan) to remove high molecular weight rheologic factors. The time schedule of the study was the same as that of the largest published MIRA-1 study¹⁸, i.e., 2 procedures weekly and then a 14-day pause, with the procedure repeated four times. Altogether, 8 procedures were performed within 10 weeks, and 1 to 2 procedures were recently added after one year of follow-up, if needed (if suspicion or symptoms of disease progression were discovered). We treated 1.5 volumes of plasma in one session. Critical values were considered to be decrease in fibrinogen levels to less than 0.7 g/L. In these cases, the volume of filtered plasma was decreased (from 1.5 x body volume to 1 x body volume). The patients were required to have peripheral veins allowing for vascular access to establish the extracorporeal circuit. All of the filters and tubing systems for extracorporeal circulation were for a single use only.

Analytical determination of retinol and α -tocopherol in serum, lipoprotein fractions and erythrocyte membranes

The blood samples were collected before and after the extracorporeal elimination process. The study protocol was approved by the Ethics Committee of University Hospital in Hradec Králové. Informed consent was obtained from all of the participants. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki.

The blood samples were first centrifuged (2000 \times g, 10 min, 4 °C), and the serum was separated and analysed immediately or was frozen at -20 °C until analysis.

Lipoprotein fractions were prepared from fresh serum by a gradient ultracentrifugation technique, using saline solution with a determined density with 0.1% EDTA added to avoid oxidation of lipoproteins during ultracentrifugation.

Serum lipoproteins were separated into very low-density lipoprotein (VLDL $d < 1.006$), low-density lipoprotein (LDL $d < 1.063$) and high-density lipoprotein (HDL $d >$

Table 1. Levels of cholesterol and TAG in serum and lipoprotein fractions before and after RH treatment

Analyte	N	Before Average (\pm SD) mmol/L	After Average (\pm SD) mmol/L	Decreased by (%)	Statistical significance
Cholesterol-serum	66	4.25 (\pm 1.35)	1.78 (\pm 0.49)	58.12	0.001
Cholesterol-VLDL	66	0.81 (\pm 0.34)	0.30 (\pm 0.22)	62.96	0.001
Cholesterol-LDL	64	2.28 (\pm 0.71)	0.81 (\pm 0.29)	64.47	0.001
Cholesterol-HDL	66	1.02 (\pm 0.21)	0.64 (\pm 0.15)	37.26	0.001
TAG-serum	65	1.48 (\pm 0.64)	0.74 (\pm 0.44)	50.00	0.001
TAG-VLDL	65	0.93 (\pm 0.49)	0.48 (\pm 0.37)	48.39	0.001
TAG-LDL	64	0.35 (\pm 0.11)	0.17 (\pm 0.08)	51.43	0.001
TAG-HDL	65	0.13 (\pm 0.08)	0.09 (\pm 0.04)	30.77	0.001

Table 2. Levels of vitamin E in serum and lipoprotein fractions before and after RH treatment

Analyte	N	Before Average (\pm SD) μ mol/L	After Average (\pm SD) μ mol/L	Decreased by (%)	Statistical significance
Vit E-serum	68	22.23 (\pm 6.75)	11.00 (\pm 3.25)	50.52	0.001
Vit E-VLDL	66	6.31 (\pm 3.14)	2.56 (\pm 1.28)	59.43	0.001
Vit E-LDL	66	9.45 (\pm 3.45)	3.83 (\pm 1.34)	59.47	0.001
Vit E-HDL	67	6.45 (\pm 1.81)	3.88 (\pm 1.20)	39.85	0.001

1.063) fractions, using an OPTIMA MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) (ref.¹⁹).

The method used in this study for the analysis of vitamin A (retinol) and vitamin E (α -tocopherol) in serum and lipoprotein fractions was modified from the method previously published by Urbanek et al.²⁰

The level of α -tocopherol in erythrocyte membranes was analysed by the modified HPLC method previously published by Solichova et al.²¹

Analytical determination of cholesterol and triacylglycerols

Serum cholesterol and triacylglycerols (TAG) were determined on a MODULAR analyser (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) using commercially available kits, according the manufacturers' instructions. The same methods were used for the evaluation of cholesterol and TAG contents in the lipoprotein fractions.

Analytical determination of enzymes

Erythrocyte glutathione peroxidase (GPx) was determined spectrophotometrically using a commercial kit (Ransel, Randox, United Kingdom), according the manufacturer's instruction, with the elimination of absorbance at a 340 nm wavelength (Cobas Mira, Roche, Switzerland).

Serum malondialdehyde was measured as a red complex with thiobarbituric acid at 485, 532 and 560 nm using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman, Palo Alto, USA).

Erythrocyte superoxide dismutase was determined spectrophotometrically with a commercial kit (Ransod, Randox, United Kingdom) according the manufacturer's instructions, as the elimination of absorbance at a 505 nm wavelength (Secomam, Ales, France).

Statistical analysis

NCSS 2007 software (Kaysville, USA) was used for statistical evaluation of the changes in each measured parameter before and after extracorporeal elimination therapy. Evaluation was performed with the nonparametric Mann-Whitney U test and Wilcoxon's signed-rank test. Statistical significance was based on $P \leq 0.05$.

RESULTS

Cholesterol and triacylglycerols

Decreases in cholesterol levels are presented in Table 1. Cholesterol and TAG were measured in serum and different lipoprotein fractions, including VLDL, LDL and HDL fractions. The results are presented in Fig. 2.

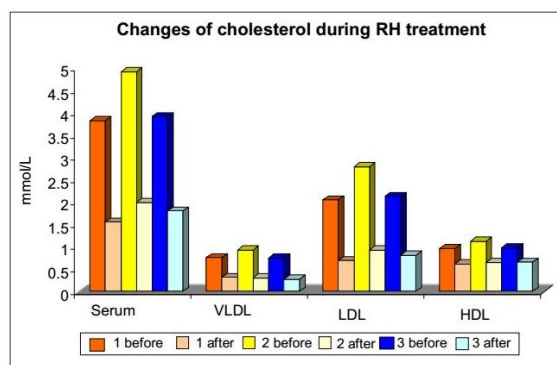


Fig. 2. Changes of cholesterol levels in serum and lipoproteins during RH treatment.

Table 3. Vitamin E/cholesterol ratios in serum and lipoprotein fractions before and after RH treatment

Vitamin E/ cholesterol ratio	N	Before Average (±SD) 10 ⁻³	After Average (±SD) 10 ⁻³	Increased by (%)	Statistical significance
Serum	65	5.42 (±1.23)	6.28 (±1.34)	15.87	0.001
VLDL	64	7.88 (±2.29)	9.80 (±5.09)	24.37	0.000309
LDL	57	4.16 (±0.99)	5.11 (±3.64)	22.84	0.000006
HDL	65	6.36 (±1.21)	6.48 (±4.12)	1.89	0.043457

Table 4. Levels of MDA, SOD and GPx before and after RH treatment

Analyte	N	Before Average (±SD)	After Average (±SD)	Statistical significance
Malondialdehyde (µmol/L)	50	0.48 (±0.41)	0.56 (±0.22)	0.002358
Superoxide dismutase (U/g Hb)	50	1595.78 (±729.02)	1505.74 (±676.66)	0.593154
Glutathione peroxidase (U/g Hb)	50	35.79 (±11.29)	34.46 (±10.20)	0.557875

Vitamin E

Levels of vitamin E before and after the procedure and its decreases in serum and lipoprotein fractions are presented in Table 2.

However, a decrease in the vitamin E/cholesterol ratio was not observed. In serum and in the VLDL and LDL fractions, the vitamin E/cholesterol ratio increased significantly in range, from 1.9% to 24.4%. In the HDL fraction, the ratio showed weak but statistically significant changes. The results are presented in Table 3.

The results of our study confirmed an increase (not statistically significant) in vitamin E levels in the membranes of 2% after rheohaemapheresis (Fig. 3).

Vitamin A

The average levels of vitamin A in serum before and after treatment were 1.56 ± 0.38 µmol/L and 1.22 ± 0.27 µmol/L, respectively. The results constitute a statistically significant decrease ($P = 0.001$). Nevertheless, the measured values after treatment were at physiological levels.

Other metabolites

During the rheohaemapheresis treatment, there were reductions observed in the levels of erythrocyte superoxide dismutase and erythrocyte glutathione peroxidase, but these changes were not statistically significant. The serum level of malondialdehyde after rheohaemapheresis increased significantly by 17%, as presented in Table 4 and also in Fig. 4.

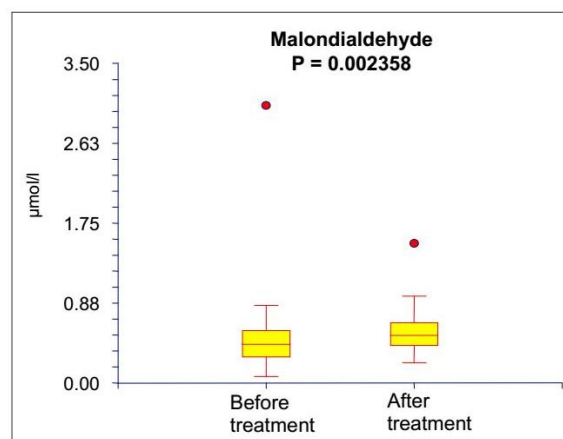
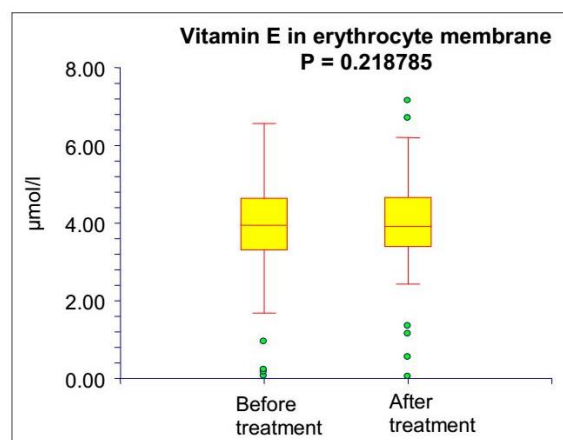
DISCUSSION

Until now, there have been no effective pharmacological therapies for the dry form of AMD that have been documented by multicentre, randomised, double-blind studies^{8,22}.

Cholesterol and triacylglycerols

An exactly defined spectrum of high molecular weight, rheologically relevant plasma proteins (i.e., LDL-cholesterol, lipoprotein) is removed by rheohaemaphere-

sis. As described above, this process can lead to sustained microcirculatory recovery and can significantly alter the natural course of this chronic disease. This process should improve the metabolic exchange between the RPE and

**Fig. 3.** Levels of MDA in serum before and after RH treatment.**Fig. 4.** Levels of vitamin E in erythrocyte membranes before and after RH treatment.

the choriocapillaris and the nutrition of RPED cells and of the neuroepithelium, reducing ischaemia and the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF and pigment epithelium-derived factor (PEDF) are regulated by tissue oxygenation. Expression of VEGF is induced by hypoxia, thus promoting neovascularisation, while PEDF is induced by increase of oxygen, thus inhibiting neovascularisation²³. However, optimal quantification of the surface structures of erythrocytes (e.g., stability and elongation), granulocytes (e.g., migration and penetration of the vessel wall), lymphocytes e.g., role of regulatory T cells), monocytes (e.g., migration and penetration of the vessel wall) and platelets (e.g., adhesion to endothelial cells) has not yet been achieved^{13,24}.

In this work, high molecular weight molecules, such as cholesterol and TAG, decreased by 31-65%.

Vitamin E

Antioxidant defence systems, such as enzymes or vitamins, protect the host directly and indirectly against the damaging influence of oxidants²⁵. Tocopherols react with free radicals, notably peroxy radicals, and with singlet molecular oxygen, which forms the basis of their function as antioxidants²⁶.

The term vitamin E covers 8 different forms (α -, β -, γ -, and δ -tocopherol and α -, β -, γ -, and δ -tocotrienol) (ref.²⁷), and in general, it is the major chain-breaking antioxidant of cellular membranes. α -tocopherol is the most active scavenger of free radicals and the most predominant tocopherol in the human retina and plasma²⁶.

There have been some studies reporting an association between high total vitamin E intake and the risk of late AMD or indistinct soft or reticular drusen and between higher intake of dietary α -carotene and the risk of neovascular AMD (ref.²⁸).

There has been much evidence supporting the concept that vitamin E protects against retinal oxidative damage, including that vitamin E deficiency results in retinal degeneration and that darkening, which results in increased vulnerability to retinal light damage, is associated with reduced ascorbate and vitamin E levels in the rat retina⁴.

AREDS demonstrated that supplementation with high-dose antioxidant supplements (vitamin C, vitamin E, and β -carotene) and zinc for an average of 6.3 years could reduce the risk of progression to advanced AMD in persons with intermediate AMD or advanced AMD in 1 eye. Nevertheless, AREDS could not determine whether the zinc and antioxidant combination could delay progression of early-stage AMD or could prevent the onset of AMD in persons at usual risk²⁹. However, there has been accumulating evidence that taking vitamin E or β -carotene supplements will not prevent or delay the onset of AMD, and some researchers have failed to demonstrate that vitamin E and selenium protect against photochemical damage to the retina^{4,26,29}.

The optimal combination of antioxidants has yet to be formulated, as has whether antioxidant therapy will be part of a multifaceted approach to the treatment of AMD (ref.³⁰). The results of 3 trials, enrolling primarily persons at usual risk, found little evidence that supplementation

with vitamin E for 4 to 6 years or with β -carotene for 10 years could materially reduce the risk of AMD; with a treatment duration of 10 years, the current findings extended these earlier findings by showing that very long-term supplementation with vitamin E alone was unlikely to have an important effect on AMD occurrence²⁹.

Vitamin E does not appear to have a specific carrier protein in the plasma. It is rapidly transferred from chylomicra to plasma lipoproteins, to which it binds non-specifically, whereupon it is taken up by the liver and is incorporated into nascent VLDL (with selectivity in favour of α -tocopherol over the γ -vitamer), which is secreted by the liver. Although the majority of triglyceride-rich VLDL remnants are returned to the liver, others are converted by lipoprotein lipase into LDL. It appears that, during this process, vitamin E also transfers spontaneously to apolipoprotein B-containing lipoproteins, including VLDL, LDL and HDL. Therefore, plasma tocopherols are distributed among these three lipoprotein classes, with the more abundant LDL and HDL classes comprising the major carriers of vitamin E (ref.³¹). Fasting blood levels of vitamin E, after multivariate adjustment, showed a weak negative association with AMD (ref.³¹). Lipid-standardised plasma α -tocopherol had significant inverse relationships with early and late AMD, representing a risk reduction in AMD of 82% for those in the highest quintile versus the lowest quintile, in a study by Delcourt et al.³².

However, Christen et al. reported that, in a large-scale, randomised trial of male US physicians, alternate-day use of 400 IU of vitamin E and/or daily use of 500 mg of vitamin C for 8 years had no appreciable beneficial or harmful effects on the risk of incident diagnosis of AMD (ref.³³).

Nevertheless, among the components of LDL investigated in this study, an increased vitamin E-to-cholesterol ratio was the strongest predictor of increased resistance of the lipoprotein to metal ion-dependent oxidation³⁴, which was why we examined the proportions of vitamin E and cholesterol in serum and in different lipoprotein fractions, and the results showed no decreases in the lipoprotein fractions.

In general, the highest accumulation of vitamin E is in the adipose tissue³⁵. In most non-adipose cells, vitamin E is localised almost exclusively in the membranes. Kinetic studies have indicated that such tissues have two pools of the vitamin: a labile, rapidly overturning pool; and a fixed, slowly overturning pool³¹.

Very important is the effect on the levels of vitamin E in membranes. As a model of the circumstances in membranes, erythrocyte membranes were selected. Erythrocytes are the major cellular component of the blood, and erythrocyte membrane fluidity can be affected by human diseases associated with oxidative stress. Free radicals are commonly formed in erythrocytes due to oxidation of haemoglobin. Erythrocyte membrane fluidity can thus be viewed as an indirect marker of oxidative stress³⁶. For this reason, we measured vitamin E levels in erythrocyte membranes and confirmed no decrease.

Vitamin A

Vitamin A exists in the following three oxidation states: an alcohol (retinol), an aldehyde (retinal), and an acid (retinoic acid) (ref.⁴). Retinol is essential for vision since it must be available in the retina as a precursor of 11-*cis*-retinal for the regeneration of rhodopsin.

In healthy individuals, plasma retinol is maintained within a narrow range (0.53 – 2.1 µmol/L in adults; typically approximately half of that in new-born infants) despite widely varying intakes of vitamin/provitamin A (ref.^{31,37}).

Vitamin A is also involved in the repair of cells that have been oxidatively damaged. Notably, in the retina, vitamin E is believed to protect vitamin A from oxidative degeneration⁴.

Nutritional treatment of retinal disease has proved at least partially successful in common retinitis pigmentosa (vitamin A), Bassen-Kornzweig disease (vitamins A, E, and K), and Sorsby fundus dystrophy (vitamin A) (ref.¹⁰). Nevertheless, regarding plasma retinol and AMD, the POLA study failed to detect a significant association⁴.

Other metabolites

Other compounds, such as malondialdehyde (MDA), in the serum and the enzymes erythrocyte superoxide dismutase (SOD) and erythrocyte glutathione peroxidase (GPx) were investigated as markers of antioxidant activity and lipid peroxidation in this study. MDA is a common lipid peroxidation product that accumulates in many pathophysiological processes, including AMD (ref.³⁸). Enzymes, superoxide dismutase and glutathione peroxidase demonstrated antioxidant activity⁴.

SOD catalyses the quenching of the superoxide anion to produce hydrogen peroxide and oxygen. No association could be detected between systemic SOD activity and AMD in the POLA study⁴. In every way, high levels of SOD were also associated with an increased risk of nuclear cataracts³⁹.

GPx uses glutathione as an electron donor to reduce organic hydroperoxides. The POLA study analysed the relationship between antioxidant enzymes and age-related macular disease and found out that higher plasma levels of GPx were significantly associated with a nine-fold increase in the prevalence of late AMD, but they were unassociated with early AMD. Delcourt et al. demonstrated a strong association of high levels of plasma GPx with age-related eye diseases. More data are needed at the biochemical and epidemiologic levels for a better understanding of these findings^{4,39}.

MDA is an abundant oxidation-specific epitope that accumulates in a number of oxidative stress-related diseases. Chou et al. recently demonstrated that 15% of all IgM natural antibodies bound to MDA adducts in mouse plasma⁴⁰. This observation illustrated the importance that the natural selection process of the innate immune system places on MDA. Recently, Weismann et al. identified complement factor H (CFH) as a major MDA-binding protein that could block both the uptake of MDA-modified proteins by macrophages and MDA-induced proinflammatory effects *in vivo* in mice³⁸.

As a summary of our study, we should mention that the levels of vitamin E in erythrocyte membranes did not decrease after rheohaemapheresis. These results suggest that tissue concentrations of vitamin E remained unchanged despite a reduction in the lipid carrier in the blood. In serum and lipoprotein fractions, vitamin E decreased. However, more informative data were obtained from the ratio of vitamin E to cholesterol in serum and in various lipoprotein fractions, in which the relative content of vitamin E even improved significantly. The monitored patients did not show any clinical signs of vitamin E deficiency, and their serum concentrations of vitamin E did not differ from normal values.

CONCLUSION

In conclusion, the level of serum vitamin A statistically decreased but not to less than physiological levels. Serum malondialdehyde significantly increased, and erythrocyte superoxide dismutase and erythrocyte glutathione peroxidase were not statistically significantly involved in rheohaemapheresis processes.

Rheohaemapheresis did not result in a negative antioxidant balance. On the contrary, the results show that rheohaemapheresis might have had favourable additive anti-atherogenic effects due to the relative increase in content of vitamin E in the lipoprotein fractions, in addition to causing a significant reduction in atherogenic LDL.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge Hana Langrová, Eva Rencová for unique patient's group design, Markéta Drastíková, Iveta Svobodová and Martina Slanařová for their excellent technical assistance. The authors also would like to acknowledge the PRVOUK 37/12 programme, IGA grant NT/14037-3/2013 and the Project (Ministry of Health, Czech Republic) for Conceptual Development of Research Organisation MH-CZ-DRO (UHHK, 00179906).

The publication is co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic. Project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0061.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

1. Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progr Retin Eye Res* 2009;28(1):1-18.
2. Khandhadia S, Cipriani V, Yates JRW, Lotery AJ. Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology* 2012;217(2):127-46.
3. Ciulla TA, Danis RP, Harris A. Age-Related Macular Degeneration: A Review of Experimental Treatments. *Surv Ophthalmol* 1998;43(2):134-46.
4. Beatty S, Koh HH, Henson D, Boulton M. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45(2):115-34.

5. Ernest J, Fišer I, Kolář P. Věkem podmíněná makulární degenerace. Praha: Česká vitreoretinální společnost; 2007. 1st ed., Praha, Preventivní program VPMD, Česká vitreoretinální společnost; 2007. in Czech
6. Kishan AU, Modjtahedi BS, Martins EN, Modjtahedi SP, Morse LS. Lipids and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2011;56(3):195-213.
7. Prasad PS, Schwartz SD, Hubschman JP. Age-related macular degeneration: Current and novel therapies. *Maturitas* 2010;66(1):46-50.
8. Bláha M, Rencova E, Langrova H, et al. Rheohaemapheresis in the treatment of nonvascular age-related macular degeneration. *Atheroscler Suppl* 2013;14(1):179-84.
9. AREDS report no. 8. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss. *Arch Ophthalmol* 2001;119(10):1417-36.
10. Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Frankowski J, Rudy D, Pei K, Tshipursky M, Nyland J. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry*. 2004;75(4):216-30.
11. Gale CR, Hall NF, Phillips DIW, Martyn CN. Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2461-5.
12. Loane E, Nolan JM, O'Donovan O, Bhosale P, Bernstein PS, Beatty S. Transport and Retinal Capture of Lutein and Zeaxanthin with Reference to Age-related Macular Degeneration Original Research Article. *Surv Ophthalmol* 2008;53(1):68-81.
13. Klingel R, Fassbender C, Fassbender T, Gohlen B. Clinical studies to implement Rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine. *Transfus Apher Sci* 2003;29(1):71-84.
14. Bláha M. Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2003;46(1):3-7.
15. Bláha V, Solichová D, Bláha M, Hyšpler R, Havel E, Vyroubal P, Žďánský P, Zadák Z. Interrelationship between fatty acid composition, lipid peroxidation and alpha-tocopherol consumption post-LDL-apheresis treatment evaluated by liquid chromatography and gas chromatography. *Anal Chim Acta* 2002;467(1-2):125-32.
16. Borberg H, Tauchert M. Rheohaemapheresis of ophthalmological diseases and diseases of the microcirculation. *Transfus Apher Sci* 2006;34(1):41-9.
17. Borberg H. Quo vadis haemapheresis: Current developments in haemapheresis. *Transfus Apher Sci* 2006;34(1):51-73.
18. Pulido JS. Multicenter Investigation of Rheopheresis for AMD (MIRA-1) Study Group. Multicenter prospective, randomised, double-masked, placebo-controlled study of rheopheresis to treat non-exudative age-related macular degeneration: interim analysis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002;100:85-107.
19. Naito HK. Lipoprotein Separations Using the TL-100 Tabletop Ultracentrifuge. Application Note Beckman DS-693, 1986.
20. Urbánek L, Solichová D, Melichar B, Dvořák J, Svobodová I, Solich P. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* 2006;573-574:267-72.
21. Solichová D, Korecká L, Svobodová I, Musil F, Bláha V, Žďánský P, Zadák Z. Development and validation of HPLC method for the determination of alpha-tocopherol in human erythrocytes for clinical applications. *Anal Bioanal Chem* 2003;376(4):444-7.
22. Binder S. The Macula: Diagnosis, Treatment and Future Trends. Springer Verlag/Wien, 2004. 1st ed. Springer; 2004
23. Bansal R, Gupta A. What is New in the Management of Age-Related Macular Degeneration? *JIMSA* 2010;23(3):169-75.
24. Borberg H. The lower the better: Target values after LDL-Apheresis and semi-selective LDL-elimination therapies. *Transfus Apher Sci* 2013;48(2):203-6.
25. Biesalski HK, Frank J. Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-/oxidative balance in the immune system. *Immun Infekt* 1995;23(5):166-73.
26. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1992;669:7-20.
27. Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002;76(4):703-16.
28. Tan JSL, Wang JJ, Flood V, Rochtchina E, Smith W, Mitchell P. Dietary Antioxidants and the Long-term Incidence of Age-Related Macular Degeneration The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2008;115(2):334-41.
29. Christen WG, Glynn RJ, Chew EY, Buring JE. Vitamin E and Age-Related Macular Degeneration in a Randomized Trial of Women. *Ophthalmology* 2010;117(6):1163-8.
30. Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):399-417.
31. Combs GF. The Vitamins. London: Elsevier; 2008. 4th ed. London: Elsevier; 2012
32. Delcourt C, Cristol JP, Tessier F, Léger LC, Descamps B, Papoz L, the POLA Study Group. Age-related Macular Degeneration and Antioxidant Status in the POLA Study. *Arch Ophthalmol* 1999;117(10):1384-90.
33. Christen WG, Glynn RJ, Sesso HD, Kurth T, Macfadyen J, Bubes V, Buring JE, Manson JE, Gaziano JM. Vitamins E and C and Medical Record-Confirmed Age-related Macular Degeneration in a Randomized Trial of Male Physicians. *Ophthalmology* 2012;119(8):1642-9.
34. Balz F, Gaziano JM. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation. *J Lipid Res* 1993;34(12): 2135-45.
35. Uchida T, Abe C, Nomura S, Ichikawa T, Ikeda S. Tissue Distribution of a- and c-Tocotrienol and c-Tocopherol in Rats and Interference with Their Accumulation by a-Tocopherol. *Lipids* 2012;47(2):129-39.
36. Sun Y, Ma A, Li Y, Han X, Wang Q, Liang H. Vitamin E supplementation protects erythrocyte membranes from oxidative stress in healthy Chinese middle-aged and elderly people. *Nutr Res* 2012;32(5):328-34.
37. Voet DJ, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons;1990. 1st ed. Praha, Victoria publishing 1995.
38. Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl HP, Charbel PI, Cano M, Brandstatter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G, Handa JT, Zipfel PF, Witztum JL, Binder CJ. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 2011;478(7367):76-81.
39. Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, Shaw PX, Choi J, Perkmann T, Backhed, Miller YI, Horkko S, Corr M, Witztum JL, Binder CJ. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* 2009;119:1335-49.