

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra analytické chemie



**VÝVOJ A VALIDACE NOVÝCH HPLC METOD
PRO STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK
V KLINICKÉ PRAXI**

Disertační práce

Hradec Králové 2010

Mgr. Lenka Krčmová

Prohlášení

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

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D., školitelce specialistce, za jejich odborné vedení, cenné rady, péči po celou dobu mého postgraduálního studia, připomínky a inspiraci jak pro tvůrčí praktickou práci, tak při psaní odborných publikací. Všechny získané zkušenosti velmi přispěly k rozšíření mých odborných znalostí a také obohatily můj osobní život.

Velké poděkování patří rovněž prof. MUDr. Luboši Sobotkovi, CSc., RNDr. Petru Žďánskému, CSc. a celému kolektivu Výzkumné laboratoře gerontologické a metabolické kliniky za to, že mi umožnili pracovat v jejich laboratoři a za jejich milý, vstřícný přístup a pomoc při řešení nejen vědeckých problémů.

Dále bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D. za to, že mi umožnil podílet se na jeho klinickém výzkumu v oboru onkologie a za podporu při psaní odborných publikací. Děkuji za jeho laskavý přístup, ochotu a za veškerou podporu, kterou jsem mohla dostat pro svou práci.

Ráda bych také poděkovala doc. RNDr. Miroslavu Mackovi, Ph.D., v jehož vědeckém týmu jsem mohla pracovat na Dublin City University v Irsku během dvou stáží po dobu třech a čtyřech měsíců v rámci programu Erasmus a Erasmus Practical Placement.

Děkuji všem z Katedry analytické chemie za jejich přátelský přístup a vytvoření skvělého kolektivu.

V neposlední řadě děkuji své rodině především za trpělivost a za to, že stáli při mně v dobrém i zlém a tím mi zpříjemnili dobu mého studia.

Práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SV-2010-261-001.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Analytické chemie

Kandidát: Mgr. Lenka Krčmová

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Název disertační práce: Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení biologicky aktivních látek v klinické praxi

Disertační práce se zabývá vývojem a validací HPLC metod aplikovatelných pro klinický výzkum a praxi ve Výzkumné laboratoři Kliniky gerontologické a metabolické (GMK) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. V této práci byly využity některé moderní analytické postupy umožňující přípravu velkých sekvencí vzorků biologického materiálu, sloužící k urychlení separace analyzovaných látek a dosahující snížení spotřeby rozpouštědla i analyzovaného vzorku, atd.

Nově byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení kyseliny 13-cis a all-trans retinové, retinolu, alfa- a gama-tokoferolu v lidském séru s vnitřní standardizací pro pacienty trpící akutní promyeloidní leukémií léčené kyselinou retinovou. Jako extrakční postup byla zvolena extrakce na tuhou fázi a pro separaci bylo využito výhod monolitické stacionární fáze. Nově byla také vyvinuta metoda pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru s využitím monolitických stacionárních fází. Tato metoda byla vyvinuta s ohledem na velké série vzorků, které je nutno zpracovat. Pro přípravu biologického materiálu bylo sérum pouze naředěno, deproteinováno, centrifugováno a filtrováno. Pro filtraci byly použity mikrotitrační destičky s filtry a speciální manifold umožňující filtrovat 96 vzorků v jednom kroku ve velmi krátké době. Výhodou byla také kombinace se speciálním autosamplerem pro mikrotitrační destičky, jež nabízí možnost vzorky uchovávat v chladu, chráněné před světlem a zakoncentrováním. Tato metoda byla také částečně validována pro jiné druhy biologického materiálu jako jsou plodová voda a exsudát a bude využita pro stanovení cílových analytů u pacientů prof. Melichara z Onkologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové a Fakultní nemocnice v Olomouci. Některé již zavedené metody ve Výzkumné laboratoři GMK byly modernizovány. Došlo k modernizaci extrakčního postupu metody pro stanovení retinolu a alfa-tokoferolu v lidském séru, metoda byla rozšířena o separaci gama-tokoferolu. Pro extrakci na pevnou fázi bylo

využito vnitřní standardizace, následně byl postup miniaturizován, HPLC metoda převedena na moderní kapalinový chromatograf Prominence LC 20 (Shimadzu) a kompletně revalidována. Metoda pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči, využívaná pro velké sekvence vzorků, byla obohacena o další analyt (kynurenin), který pomáhá objasnit procesy týkající se aktivace imunitního systému, bylo využito výhod hybridní kolony Gemini-Twin, jež se osvědčila pro velké série vzorků (1 kolona/1000 analýz filtrované moči). Tato metoda byla revalidována.

Všechny vyvinuté i modernizované metody umožnily rozšířit spektrum vyšetření ve Výzkumné laboratoři Kliniky gerontologické a metabolické ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (FNHK) a jsou v současné době využívány pro klinické studie prováděné na různých odděleních Fakultní nemocnice v Hradci Králové a na Onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Lenka Krčmová

Supervisor: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Title of Doctoral Thesis: Development and validation of new HPLC methods for determination of biologically active compounds in clinical practise

The presented dissertation thesis is dealing with development and validation of HPLC methods for clinical research and clinical practice in Research laboratory of Department of Metabolic Care and Gerontology (GMC) in University Hospital in Hradec Kralove (UHHK). For this purpose modern technologies dealing with large sequences of biological material, speed separation, small volumes of organic solvent and sample were used.

New HPLC method for determination of 13-cis and all-trans retinoic acid, retinol, alpha- and gamma-tocopherol using internal calibration for patients suffers from acute promyelocytic leukemia treated with retinoic acid was developed and validated.

Solid phase extraction (SPE) and monoliths were selected for sample preparation and separation of the target compounds.

New method for determination of neopterin, creatinine, kynurenine and tryptophan in human serum using two monolithic column as stationary phase was developed and validated. This method was developed emphasis on large sequences of samples, which should be process. Biological samples were only diluted, deproteinized, centrifuged and filtrated. Micro titration plates with filters and special manifold which allow prepare 96 samples in one filtration step in very short time were used. The main advantage was combination of these technologies with special autosampler for micro titration plates. This sampler allows store samples in dark cooled place protected against evaporation. This method was partially validated for different biological fluids as amniotic fluid and exudates and will be using for determination of target analytes in patients of professor Melichar from Oncology department in University Hospital in Hradec Kralove and in University Hospital in Olomouc.

Some previously developed methods in Research laboratory GMC were modernized. Extraction procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol was modernized.

Solid phase extraction was miniaturized; gamma-tocopherol and tocol (internal standard) were added. Consequently HPLC method was transported to HPLC system Prominence LC 20 (Shimadzu) and completely revalidated.

Kynurenine, the compound which helps reflect the stage of immune system activation was included as target analyte to method for determination of neopterin and creatinine in human urine which is in Research laboratory GMC very frequently using for large sequences of the samples. Advantages of hybrid Gemini-Twin technology were used for the separation. This column was very helpful in large sequences of the samples (1 column/1000 analysis of filtered urine) measurements. Method was revalidated.

All developed and modernized methods extend spectrum of methods in Research laboratory of Department of Metabolic Care and Gerontology in University Hospital in Hradec Kralove. In present time these methods are using in running clinical studies in various departments of UHHK and Oncology department in University Hospital in Olomouc.

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Cíl práce.....	15
3	Seznam zkratk.....	17
4	Teoretická část.....	20
4.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie v bioanalýze.....	21
4.1.1	Rozvoj HPLC.....	21
4.1.2	Moderní technologie v HPLC.....	25
4.1.2.1	Vybrané moderní stacionární fáze.....	25
4.1.2.1.1	Částicové kolony/zmenšování velikosti částic.....	25
4.1.2.1.2	Porézní částice s neporézním jádrem.....	27
4.1.2.1.3	Hybridní stacionární fáze.....	28
4.1.2.1.4	Monolitické stacionární fáze.....	30
4.1.2.1.5	Stacionární fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu.....	38
4.1.2.2	Moderní instrumentace v HPLC.....	38
4.1.2.2.1	Trend HPLC využívající vysokých tlaků (UPLC, UHPLC, UFLC.....)	39
4.1.2.2.2	Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (High temperature liquid chromatography - HTLC).....	39
4.1.2.2.3	On line 2D HPLC.....	40
4.1.2.2.4	Pseudo 2D HPLC.....	41
4.1.2.2.5	Moderní instrumentace - autosampler pro mikrotitrační destičky.....	42
4.1.2.2.6	Detekce - vybrané nové detekční systémy.....	42
4.1.2.2.7	Laboratoř na čipu (lab on chip).....	47
4.2	Validace HPLC metod v bioanalýze.....	50
4.2.1	Druhy validací.....	51
4.2.2	Jednotlivé validační parametry.....	54
4.2.2.1	Účinnost chromatografického systému.....	54
4.2.2.2	Faktor symetrie (As)/asymetrie chromatografického píku (T).....	54
4.2.2.3	Rozlišení chromatografických píků (R).....	55
4.2.2.4	Retenční čas a retenční poměr.....	55
4.2.2.5	Hmotnostní distribuční poměr.....	55
4.2.2.6	Relativní retence (retenční poměr).....	56
4.2.2.7	Čistota píku (peak purity test).....	56
4.2.2.8	Přesnost.....	56
4.2.2.9	Stabilita.....	58
4.2.2.9.1	Vliv opětovného zmrazování a rozmrazování na stabilitu analytu (Freeze and Thaw Stability).....	59
4.2.2.9.2	Krátkodobá stabilita.....	59
4.2.2.9.3	Dlouhodobá stabilita.....	59
4.2.2.9.4	Stabilita zásobních roztoků - Stock Solution Stability.....	59
4.2.2.9.5	Post-preparativní stabilita.....	59
4.2.2.9.6	Stabilita standardů a vzorků.....	60
4.2.2.10	Správnost stanovení (accuracy).....	60
4.2.2.11	Linearita.....	61
4.2.2.12	Robustnost.....	62
4.2.2.13	Selektivita.....	62
4.2.2.14	Detekční a kvantifikační limit.....	63

4.3	Preanalytická část	65
4.3.1	Vliv preanalytické fáze na výsledek analýzy	65
4.3.1.1	Osoba pacienta	66
4.3.1.1.1	Neovlivnitelné faktory	66
4.3.1.1.2	Ovlivnitelné faktory	66
4.3.2	Odběr, transport a skladování jednotlivých druhů biologického materiálu	67
4.3.2.1	Odběr krve	67
4.3.2.2	Vyšetření z nesrážlivé krve a plazmy	68
4.3.2.2.1	Transport a uchovávání vzorku	68
4.3.2.3	Moč	70
4.3.2.3.1	Zásady pro transport a skladování moči	70
4.3.2.4	Likvor	71
4.3.2.4.1	Zásady pro transport a skladování likvoru	71
4.3.2.5	Stolice	71
4.3.2.5.1	Zásady pro transport a skladování stolice	72
4.3.2.6	Sputum	72
4.3.2.7	Výpotek	72
4.3.2.7.1	Zásady pro transport a skladování exsudátu	72
4.3.2.8	Plodová voda	72
4.3.2.8.1	Zásady pro transport a skladování plodové vody	73
4.3.2.9	Mateřské mléko	73
4.3.2.9.1	Zásady pro transport a skladování mateřského mléka	73
4.3.2.10	Tkáně	74
4.3.2.11	Obecné zásady pro transport a skladování biologického materiálu	74
4.3.2.12	Chyby při odběru, skladování a transportu biologického materiálu	74
4.4	Zpracování biologického materiálu před HPLC analýzou	75
4.4.1	Příprava vzorku k analýze	75
4.4.1.1	Předúprava vzorku	75
4.4.1.1.1	Homogenizace	75
4.4.1.1.2	Lyofilizace	75
4.4.1.1.3	Deproteinace/precipitace	76
4.4.1.2	Extrakce	76
4.4.1.2.1	Extrakce do kapaliny/Extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extrakce, LLE)	77
4.4.1.2.2	Extrakce na jedné kapce (Single-drop Extraction SDE)	78
4.4.1.2.3	Extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází	78
4.4.1.2.4	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	80
4.4.1.2.5	Extrakce na pevnou fází (solid-phase extraction SPE)	82
4.4.1.2.6	Mikroextrakce tuhou fází (SPME)	87
4.4.1.3	Centrifugační metody v bioanalytice	88
4.5	Analyty	90
4.5.1	Retinoidy: Vitamin A (retinol), estery retinolu, kyselina retinová	90
4.5.1.1	Historie	90
4.5.1.2	Fyzikálně chemické vlastnosti retinoidů	91
4.5.1.2.1	Kyselina retinová	92
4.5.1.2.2	Estery retinolu	92
4.5.1.3	Metabolismus retinoidů	92
4.5.1.3.1	Biologická aktivita kyseliny retinové	94
4.5.1.4	Klinický význam retinoidů	94
4.5.1.4.1	Retinol	94
4.5.1.4.2	Obsah vitamínu A v potravinách	96

4.5.1.4.3	Klinický význam kyseliny retinové	96
4.5.1.4.4	Klinický význam esterů retinolu.....	98
4.5.2	Vitamin E	102
4.5.2.1	Historie	102
4.5.2.2	Fyzikálně chemické vlastnosti.....	102
4.5.2.3	Metabolismus	104
4.5.2.4	Klinický význam.....	106
4.5.2.5	Výskyt.....	106
4.5.3	Stanovení retinoidů a vitamínu E	107
4.5.4	Neopterin.....	111
4.5.4.1	Historie	111
4.5.4.2	Fyzikálně chemické vlastnosti.....	111
4.5.4.3	Metabolismus a klinický význam	112
4.5.4.4	Koncentrace neopterinu v biologických tekutinách.....	114
4.5.5	Kynurenin a tryptofan	117
4.5.5.1	Kynurenin	117
4.5.5.1.1	Fyzikálně chemické vlastnosti kynureninu.....	117
4.5.5.2	Tryptofan.....	117
4.5.5.3	Metabolismus a klinický význam	118
4.5.6	Kreatinin.....	121
4.5.6.1	Fyzikálně chemické vlastnosti.....	121
4.5.6.2	Metabolismus a klinický význam	121
4.5.6.2.1	Clearance (endogenního) kreatininu.....	123
4.5.6.2.2	Jaffého reakce	123
4.5.6.2.3	Enzymatický test	123
4.5.6.3	Prognostický význam převrácené hodnoty sérového kreatininu	125
4.5.7	Stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu, tryptofanu v biologickém materiálu.....	127
5	Experimentální část	129
5.1	Vybrané vyvinuté metodiky	130
5.1.1	Miniaturizace metody pro stanovení vitamínu A, E v séru	130
5.1.1.1	Úvod	130
5.1.1.2	Cíl.....	130
5.1.1.3	Pracovní postup.....	130
5.1.1.4	Výsledky.....	131
5.1.1.4.1	Extrakční postup SPE metody s vnitřním standardem.....	131
5.1.1.4.2	Miniaturizace SPE extrakce.....	133
5.1.1.5	Závěr.....	137
5.1.2	Stanovení kyseliny retinové v séru.....	138
5.1.2.1	Úvod	138
5.1.2.2	Cíl.....	138
5.1.2.3	Výsledky	139
5.1.2.3.1	Parametry HPLC metody	139
5.1.2.3.2	Extrakční postup SPE metody s vnitřním standardem.....	140
5.1.2.3.3	Vybrané validační parametry	140
5.1.2.4	Závěr a diskuze	142
5.1.3	Stanovení neopterinu, kreatininu a kynureninu v moči.....	143
5.1.3.1	Úvod	143
5.1.3.2	Cíl.....	143
5.1.3.3	Výsledky	143

5.1.3.3.1	Parametry HPLC metody na přístroji Prominence LC 20	143
5.1.3.3.2	Příprava vzorku.....	144
5.1.3.3.3	Vybrané validační parametry	145
5.1.3.4	Závěr.....	147
5.1.4	Stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru.....	149
5.1.4.1	Úvod	149
5.1.4.2	Cíl.....	149
5.1.4.3	Výsledky	149
5.1.4.3.1	Parametry HPLC metody na přístroji Prominence LC 20	152
5.1.4.3.2	Příprava vzorku.....	152
5.1.4.3.3	Validace.....	152
5.1.4.3.4	Další druhy biologického materiálu	154
5.1.4.4	Korelace s ÚKBD	156
5.1.4.4.1	Výběr IS.....	156
5.1.4.5	Závěr.....	157
5.1.5	Testování deep-UV-LED jako vhodného zdroje pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze	158
5.1.5.1	Úvod	158
5.1.5.2	Cíl.....	158
5.1.5.3	Výsledky a závěr	158
5.2	Klinická část	160
5.2.1	Monitorování sérových hladin antioxidačních vitaminů u onkologických pacientů ...	161
5.2.2	Sledování změn permeability střevní sliznice po chemoterapii pomocí retinol absorpčního testu	163
5.2.3	Stanovení neopterinu v moči u onkologických pacientů	164
6	Přehled všech publikovaných prací.....	170
7	Přehled plakátových sdělení, přednášek a grantů.....	173
7.1	Postery.....	173
7.2	Přednášky.....	179
7.3	Granty	181
7.4	Stáže.....	182
8	Závěr	183
9	Literatura.....	186
10	Přílohy I - publikace.....	Chyba! Záložka není definována.
10.1	Analytické publikace.....	Chyba! Záložka není definována.
10.1.1	Příloha 1.....	Chyba! Záložka není definována.
10.1.2	Příloha 2	Chyba! Záložka není definována.
10.1.3	Příloha 3	Chyba! Záložka není definována.
10.1.4	Příloha 4	Chyba! Záložka není definována.
10.2	Klinické publikace	Chyba! Záložka není definována.
10.2.1	Příloha 1.....	Chyba! Záložka není definována.
10.2.2	Příloha 2	Chyba! Záložka není definována.
10.2.3	Příloha 3	Chyba! Záložka není definována.
10.2.4	Příloha 4	Chyba! Záložka není definována.
10.2.5	Příloha 5	Chyba! Záložka není definována.
10.2.6	Příloha 6	Chyba! Záložka není definována.
10.2.7	Příloha 7	Chyba! Záložka není definována.
10.2.8	Příloha 8	Chyba! Záložka není definována.
10.2.9	Příloha 9	Chyba! Záložka není definována.
10.2.10	Příloha 10	Chyba! Záložka není definována.

10.2.11	Příloha 11.....	Chyba! Záložka není definována.
10.2.12	Příloha 12.....	Chyba! Záložka není definována.
10.2.13	Příloha 13.....	Chyba! Záložka není definována.
10.2.14	Příloha 14.....	Chyba! Záložka není definována.
11	Přílohy II - vybraná plakátová sdělení.....	Chyba! Záložka není definována.
11.1	Příloha 1.....	Chyba! Záložka není definována.
11.2	Příloha 2.....	Chyba! Záložka není definována.
11.3	Příloha 3.....	Chyba! Záložka není definována.
11.4	Příloha 4.....	Chyba! Záložka není definována.
11.5	Příloha 5.....	Chyba! Záložka není definována.
11.6	Příloha 6.....	Chyba! Záložka není definována.
11.7	Příloha 7.....	Chyba! Záložka není definována.
11.8	Příloha 8.....	Chyba! Záložka není definována.

1 ÚVOD

V současné době jsou na biomedicínskou analýzu kladeny stále větší požadavky. Klinické laboratoře jsou nuceny zpracovávat velké soubory biologických vzorků. Značný význam má také citlivost a správnost jednotlivých metodik. Proto jsou stále více využívány moderní analytické metody a postupy. Tyto nové analytické postupy nabízí řadu výhod, jako jsou malá spotřeba vzorku a rozpouštědel, krátký čas analýzy, jednoduchá úprava vzorku před analýzou, vysoká citlivost, možnost automatizace atd.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nabízí možnost separace, identifikace a kvantifikace během jedné analýzy. Je to metoda univerzální, robustní, citlivá (v závislosti na použitém detektoru) s možností automatizace. Proto je HPLC vhodnou metodou pro stanovení biologicky aktivních látek a je hojně využívána v mnoha druzích laboratoří, ať už se jedná o laboratoře rutinní či výzkumné.

V posledních letech došlo k prudkému vývoji HPLC v oblasti instrumentace, zejména v oblasti detekce analytů. Hlavním trendem je urychlení času analýzy, vysoká citlivost a separační účinnost. Byly vyvinuty systémy pracující s velkými tlaky (UPLC, UFLC) a teplotami (UTLC). Nelze opomenout rozvoj v oblasti detekčních systémů, zejména v oblasti hmotnostní spektrometrie (MS), byly ale také vyvinuty detekční systémy nové jako například Charged Aerosol detector (CAD) pro univerzální detekci látek bez chromoforu, fluoroforu atd.

K velkému rozvoji došlo také v oblasti stacionárních fází. Monolitické stacionární fáze našly své uplatnění v řadě bioanalytických, analytických i chemických laboratoří v mnoha aplikacích díky své robustnosti, efektivnosti, časové úspoře a ekonomičnosti. Došlo k vývoji fází nových jako jsou hybridní technologie (Gemini-Twin) pracující v širokém rozsahu pH, nové Poroshell částice poskytující vysoké separační účinnosti atd.

Preanalytická fáze je jednou z klíčových a většinou časově nejnáročnějších částí bioanalytického procesu. Nutnost zpracovávat velké soubory biologických vzorků vedla ke snaze tento proces urychlit a zjednodušit. Dosud využívaná extrakce do kapaliny (LLE) je v mnoha případech nahrazována extrakcí na pevnou fázi. Ve snaze snížit spotřebu rozpouštědel (ekonomičnost, pozitivní vliv na životní prostředí) a množství vzorku potřebného pro analýzu dochází k miniaturizaci těchto procesů. Populární se stává miniaturizace SPE nabízející množnost zpracování 96 vzorků během jednoho extrakčního

procesu, extrakce na jedné kapce (SDE), mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) atd. Výhodou těchto metodik je také možnost jejich automatizace.

2 CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce byl vývoj a validace HPLC metod aplikovatelných pro klinický výzkum a praxi ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Vyvinuté metody by měly sloužit k monitorování vybraných cílových analytů v jednotlivých klinických studiích prováděných ve Výzkumné laboratoři Kliniky gerontologické a metabolické (GMK). Cílem práce nebyl jen vývoj metod nových, ale také modernizace a revalidace metod v laboratoři již zavedených, např. modernizace extrakčního postupu umožňujícího zpracovávat větší série vzorků v kratším čase, urychlení HPLC analýzy atd.

Hlavní důraz při vývoji byl kladen na rychlost, jednoduchost, přesnost a dostatečnou robustnost jednotlivých metod. Pro tento účel byly využívány moderní technologie k přípravě vzorků biologického materiálu, pro urychlení separace, snížení spotřeby rozpouštědel i vzorku atd.

Jednotlivé metody by měly být vyvíjeny na základě požadavků lékařů pracujících v různých odděleních Fakultní nemocnice (GMK, onkologie, chirurgie, hematologie atd.).

Při vývoji by neměl být kladen důraz nejen na samotnou HPLC metodu, ale také na způsob zpracování biologického materiálu, jeho odběr, transport a skladování před analýzou vzhledem ke stabilitě cílových analytů. V neposlední řadě musí být každá metoda řádně validována a sepsán Standardní operační postup (SOP) pro laboratoř. Nová metoda by se také měla stát součástí spektra vyšetřovacích metod ve Výzkumné laboratoři GMK a měla by být následně využita pro jednotlivé klinické studie.

Vyvinuté a modernizované metody lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: metody pro stanovení liposolubilních vitaminů a jejich derivátů a metody pro stanovení neopterinu, jeho derivátů a dalších látek souvisejících s jeho metabolismem.

Při vývoji a modernizaci metod pro stanovení liposolubilních vitaminů a jejich derivátů bylo cílem využít předností monolitické stacionární fáze, dále modernizovat extrakční postup za použití SPE extrakce s vnitřní standardizací, převedení metody na přístroj Prominence LC 20 (Shimadzu) umožňující díky speciálnímu autosampleru na mikrotitrační destičky měřit velké série vzorků. Cílem bylo také provést stabilitní studii pro jednotlivé analyty a metodu znovu validovat.

Metoda pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči byla již v laboratoři GMK zavedena. Tato metoda je široce využívána pro velké série vzorků. Cílem modernizace bylo její

rozšíření o další analyty (kynurenin) a dále vypracování nové metody pro stanovení těchto látek v séru, popřípadě v jiných biologických materiálech (plodová voda, exsudát) s následnou validací a využitím v klinické praxi.

3 SEZNAM ZKRATEK

3-HKYN	3-hydroxykynurenin
ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AMC	amonium acetát
AMP	adenosinmonofosfát
APL	akutní promyloidní leukémie
APL-R/APL-RS	choroby rezistentní k léčbě all-trans retinovou kyselinou/nebo As_2O_3
AST	aspartátaminotransferáza
ATRA	all-trans retinová kyselina
C4	řetězec obsahující 4 atomy uhlíku
C8	řetězec obsahující 8 atomů uhlíku
C18	řetězec obsahující 18 atomů uhlíku
CAD	aerosolový detektor nabitých částic (charged aerosol detector)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CEA	karcinom embryonální antigen - sérový nádorový marker
CEC	kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography)
CK	kreatinkináza
CRABP	protein vázající kyselinu all-trans retinovou v krvi (all-trans retinoic acid binding protein)
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie (computer tomography)
ČSAV	Československá akademie věd
ČL2009	Český lékopis 2009
DAD	detektor diodového pole (diode array detector)
DCU	Dublin City University
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EC	elektrochemická detekce
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FaF	Farmaceutická fakulta (UK)
FDA	Food and Drug Administration
FSV	Fakulta sociálních věd (UK)
FTVS	Fakulta tělesné výchovy a sportu (UK)
GIT	gastrointestinální trakt
Glc	glukóza
GLP	správná laboratorní praxe (good laboratory practise)
GLE	extrakce plyn-kapalina (gass-liquid extraction)
GMK	Klinika gerontologická a metabolická
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HEPT	výškový ekvivalent teoretického patra (high equivalent to a theoretical plate)

HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HMMPS	N-(3-sulfopropyl)-3-metoxy-5-metylanilin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HTLC	vysokoteplotní kapalinová chromatografie (high temperature liquid chromatography)
i.d.	vnitřní průměr (internal diameter)
ICH	validační norma (International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use)
IČ	infračervená oblast světla
IDO	enzym indolamin 2,3-dioxygenáza
IS	interní standard
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
kat	katal, jednotka SI pro katalytickou aktivitu
LAT1	transportní protein, přítomný v mnoha typech nádorových buněk
LAMA	laktulóza/manitol test, test střevní propustnosti
LC-APCI-MS	spojení kapalinové chromatografie a chemické ionizace za atmosférického tlaku s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry)
LC-MS-MS	kapalinová chromatografie s tandemovým spojením hmotnostních analyzátorů
LD/LDH	laktátdehydrogenáza
LED	světlo vyzařující dioda, též elektroluminiscenční dioda (light emitting diode)
LLE	extrakce do kapaliny (liquid-liquid extraction)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
ODS	oktadecyl silikagel, silikagel s navázaným řetězcem 18 atomů uhlíku
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MFF	Matematicko-fyzikální fakulta (UK)
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (mass associated laser desorption ionisation)
MIP	molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymers)
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normální fáze
Pc	kritický tlak (critical pressure)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
PhEU	Evropský lékopis 2008
PhUS	Americký lékopis 2010
POD	peroxidáza
PřF	Přírodovědecká fakulta (UK)
QA	chinolinová kyselina

RAS	retinoidní syndrom vznikající podáním vysokých dávek kyseliny retinové (retinoic acid syndrome)
RAR, RXR	jaderné receptory pro kyselinu retinovou
RBP	retinol vázající protein
RIA	metoda založená na vazbě antigen protilátka, využívající radionuklidy (radioimmunoassay)
RP	reverzní fáze (reverse phase)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RSD/CV	relativní směrodatná odchylka, koeficient variace (relative standard deviation/coefficient of variation)
RTG	rentgenové záření
rTRAIL	rekombinantní buňky vznikají diferenciací při APL
CSF	kapalina v suprekritickém stavu
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SDE	extrakce na jedné kapce (single drop extraction)
SLE	extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází (solid liquid extraction)
SPE	extrakce na pevnou fází (solid phase extraction)
SPME	mikroextrakce na pevnou fází (solid phase microextraction)
SST	test vhodnosti systému (system suitability test)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
T _c	kritická teplota (critical temperature)
TAG	triacylglycerol
TH1	prekurzory pomocných T buňek (h-helper)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
TRAIL	buňky vznikají diferenciací při APL
UFLC	vysokorychlostní kapalinová chromatografie (ultra-fast liquid chromatography)
U.I., I.U.	mezinárodní jednotky (international units)
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
UPLC/UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (Ultra/high-performance liquid chromatography)
UV	ultrafialové světelné spektrum (ultraviolet)
VLDL	lipoproteinová částice o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
XA	xanthurenová kyselina (xanthurenic acid)
μLC	mikrokolonová chromatografie

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie v bioanalýze

Analytická chemie je obor přírodních věd, založený nejen na všech chemických disciplínách, ale i na fyzice, biologii, teorii informace a řadě technických oborů. Podává informace o identitě, struktuře a množství chemických species v přírodních i člověkem vytvořených objektech a o distribuci těchto species v prostoru a čase. Spolupracuje s ostatními přírodními vědami při hledání souvislostí mezi chemickým složením látek a jejich vlastnostmi. Je to aplikovaný multidisciplinární obor s mnoha zpětnými vazbami, který akceptuje kolektivní práci při řešení problémů [1].

Chromatografické metody patří dnes mezi nejvýznamnější analytické i preparativní metody. Analytická chromatografie slouží k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek zkoumané směsi a pracuje obecně s velmi malým množstvím vzorku. Naproti tomu preparativní chromatografie má za úkol jednotlivé složky směsi od sebe rozdělit v dostatečném (tzv. vážitelném) množství, je aby bylo možno dále zpracovávat a využít. V posledních letech se ve svých mnoha podobách a technikách tyto metody progresivně vyvíjejí a jsou široce používány pro dělení směsí různých látek na jednotlivé komponenty [2].

IUPAC postuloval v roce 1993 tuto definici: „*Chromatografie je fyzikální separační metoda, při níž jsou separované složky distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární, zatímco druhá se pohybuje v daném směru*“ [3].

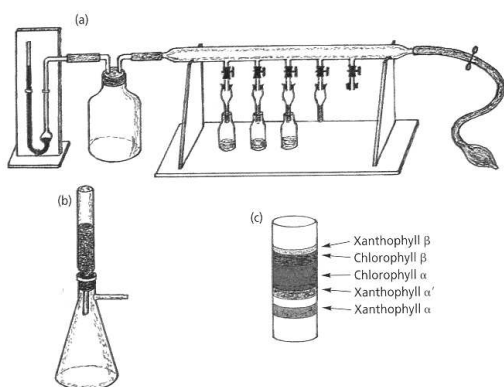
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejprogresivnějších metodik v analytické chemii, která umožňuje současnou identifikaci a kvantifikaci látek, vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. HPLC se velmi široce uplatňuje ve všech vědeckých odvětvích včetně lékařství. V rámci lékařských věd je velmi široká škála chemických (biochemických a dalších) problémů, které jsou řešeny za pomoci vysokoučinné kapalinové chromatografie [4].

4.1.1 Rozvoj HPLC

Nejstarší chromatografickou metodou, která se používá v praxi, je metoda chromatografie výměny iontů. Zmínky o této metodě se nachází již ve starověku. Už Aristoteles zjistil absorpční vlastnosti některých hlinek vhodných na čištění mořské vody, i když nepoznal podstatu těchto jevů.

V druhé polovině 19. století zkoumali angličtí půdoznalci Tompson a Way absorpci kationů z roztoku solí filtrovaných přes různé druhy hlinek (směs minerálů). O skutečný rozvoj této metody se zasloužili Adams a Holmes objevem umělých organických iontoměničů, kterou publikovali v roce 1935. Objev absorpční chromatografie jako účinné separační metody učinil ruský botanik Michail Semjonovič Cvět.

V roce 1903 provedl M. S. Cvět experiment, při kterém rozdělil chlorofyl na jeho složky - chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Experiment spočíval v tom, že petroletherový extrakt chlorofylu nechal v kolonce protékat přes sloupec křemeliny (CaCO_3). Chlorofylový extrakt se při průchodu kolonkou rozdělil na jednotlivá barviva obsažená v chlorofylu a na kolonce se tak vytvořily jednotlivé barevné zóny viditelné okem. Cvět tuto metodu pojmenoval „chromatografie“ („barvopis“, řecky chroma = barva). Michail Semjonovič Cvět publikoval tento objev v roce 1906 pod názvem „Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen“ [5].



Obr. 1 První kapalinový chromatograf sestavený ruský

Cvěttem v roce 1903 pro dělení chlorofylů. Stacionární fází v něm byl uhličitán vápenatý a mobilní fází sirouhlík [3].



Obr. 2 Michail Semjonovič Cvět,

botanik, fyziolog a biochemik (1872 - 1919)

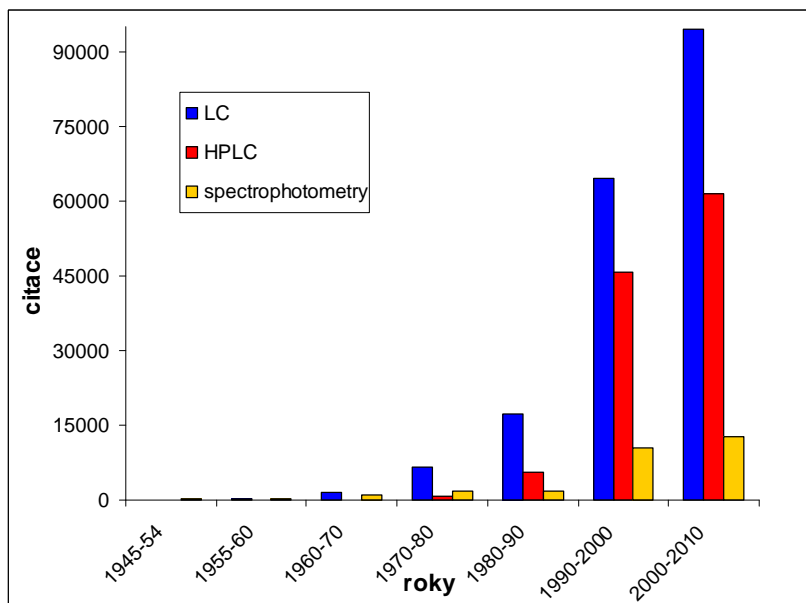
Až v roce 1931 zavedli Kun, Winterstein a Leederer tuto metodu do chemie polyenových barviv.

Absorpční chromatografie je vhodná hlavně na separace látek lipofilního charakteru. Na dělení hydrofilních látek chyběl až do objevení rozdělovací chromatografie Martinem a Syngem roku 1941 vhodný postup. Autoři použili silikagel nasycený vodou jako stacionární fází. Mobilní fází bylo organické rozpouštědlo.

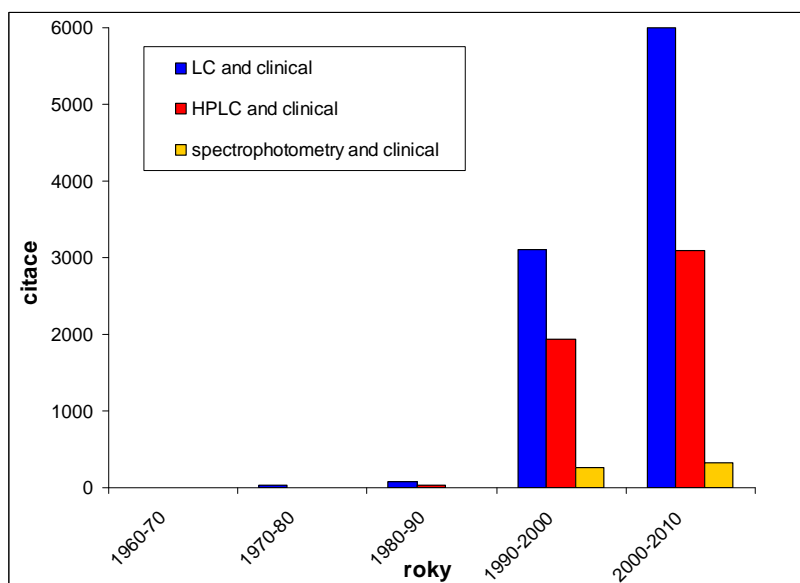
Některé látky například volné aminokyseliny se na silikagelu dělily po acetylaci. Proto se hledal vhodnější materiál na zakotvení vodné fáze. Martin a Synge v práci použili celulózu, která může na svém povrchu, stejně jako silikagel, vázat vodu. Roku 1952 Martin a Synge dostali za svůj objev, tedy za zavedení rozdělovací chromatografie typu kapalina-kapalina, Nobelovu cenu. V té stejné době pracovali Martin a James na možnosti zavedení plynové chromatografie do analytické chemie. O rozvoj této metody se u nás zasloužil Janák, který rozšířil použití metody absorpční plynové chromatografie na analýzu látek, které přechází do plynného skupenství jen při termickém rozkladu.

První zprávy o chromatografii na tenkých vrstvách přinesl Izmailov a Šrajbrová. Autoři svou práci nazvali: „Kapkové chromatografické analytické metody a jejich použití ve farmacii“.

Roku 1963 objevil Giddings, že je možné zkrátit čas analýzy látek dělených sloupcovou rozdělovací chromatografií použitím sloupců se speciálním vstupním otvorem. Kirkland upozornil na urychlené dělení v kapalinové chromatografii ve sloupcovém uspořádání, pakliže se použijí speciální dělicí kolony naplněné sorbentem obsahující malá zrnka s průměrem 30 μm . Pro takto připravené kolony je typický tlak 1 MPa. Kirkland a Halász vyvinuli více takovýchto kolon a vyřešili také otázku automatizace. Z hlediska metodiky i přístrojové techniky se kapalinová chromatografie stále více zdokonalovala. Bylo to hlavně způsobeno zvýšeným zájmem o analýzy vysokomolekulárních látek, málo těžkých a termicky labilních látek v biochemii, polymerní chemii, farmacii a potravinářském průmyslu. Rozvojem stacionárních fází s chemicky vázanými fázemi pak započal růst počtu aplikací v oboru vysokoúčinné kapalinové chromatografie a v současné době je nejpopulárnější technikou. Okolo 90% analytických separací nízkomolekulárních látek se provádí na této fázi [6].



Obr. 3 Počet jednotlivých prací týkajících se HPLC a spektrofotometrie v letech 1945 - 2010 (zpracováno dle Web of Science 20.7.2010) [7]



Obr. 4 Počet jednotlivých prací týkajících se HPLC a spektrofotometrie v klinickém výzkumu v letech 1945 - 2010. (zpracováno dle Web of Science 20.7.2010) [7]

4.1.2 Moderní technologie v HPLC

Snahou při vývoji HPLC metodik v této disertační práci bylo využití jednotlivých moderních technologií a jejich kombinace. Proto se následující kapitola zabývá vybranými moderními technologiemi v HPLC analýze biologického materiálu jako jsou moderní stacionární fáze, nová instrumentace HPLC, vybrané detekční systémy a tzv. laboratoř na čipu.

4.1.2.1 Vybrané moderní stacionární fáze

Principem HPLC je separace analytů založená na jejich rozdílné distribuci mezi stacionární a mobilní fází. Při separaci dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní a stacionární fází i vzájemná interakce mezi těmito fázemi. Během tohoto procesu dochází k mnohonásobnému ustalování rovnováhy těchto systémů.

Přestože výsledek separace závisí na mnoha podmínkách, patří volba mobilní a zejména stacionární fáze mezi nejdůležitější faktory. Zlepšování kvality stacionární fáze umožňuje zlepšení separačních vlastností a možností [8].

Stacionární fáze lze obecně dle polarity rozdělit na fáze normální (NP) - stacionární fáze je polární, mobilní fáze nepolární, dochází tedy k retenci polárních analytů. Dále je to fáze reverzní (obrácená, RP), kdy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je tvořena rozpouštědlem polárním. V tomto případě jsou zadržovány látky nepolární.

Pokud se jedná o separační módy HPLC, je možno konstatovat, že dělení na reverzních fázích je stále nejrozšířenější technikou, přitom dominantní postavení mají již tradičně partikulární vázané fáze na bázi silikagelu. Ze silikagelových RP jsou dlouhodobě nejpopulárnější C18 modifikace s tím, že tyto fáze představovaly kolem 50% všech RP kolon nově uváděných na trh v roce 2005. S velkým odstupem následují modifikace C8 (13%), fluorované fáze, alkylované fáze s řetězcí delšími než 18 uhlíků, fenylové fáze, fáze se zabudovanou polární funkční skupinou, C4 modifikace a další. Vedle silikagelových partikulárních (částicových) sorbentů se v moderní RP-HPLC stále více prosazují materiály nové, jako např. anorganicko-organické hybridy a modifikované oxidy kovů. Velmi perspektivní jsou také monolitické kolony [9].

4.1.2.1.1 Částicové kolony/zmenšování velikosti částic

První široce používaná náplň kolon pro HPLC - μ Bondapak měl velikost částic 10 μ m a byl uveden na trh v roce 1973. O pět let později přišly na trh kolony plněné silikovými

částicemi o velikosti 5 μm . V 90. letech minulého století se pak velikostním standardem staly 3,5 μm částice [3].

Důvodem snižování velikosti částic je zvýšení separační účinnosti.

Snížením velikosti částic do rozsahu 1,5 - 2,0 μm se počet teoretických pater zvýší na hodnoty okolo 180 000/m. Typické pracovní tlaky se pohybují okolo 60 MPa.

Existují ale dobře známé negativní efekty:

- zvýšený zpětný tlak a jeho vliv na životnost chromatografu
- zvýšené nároky na čistotu rozpouštědel používaných jako mobilní fáze, zejména obsah částic (mechanické nečistoty)
- snížená životnost kolon daná větší citlivostí na čistotu mobilní fáze i vzorku
- vyšší cena kolon

Vážným problémem se v současné době jeví náchylnost k ucpání kolony, a to mechanickými částicemi, které pocházejí z(e):

- mobilní fáze (mechanické částice)
- vzorku (precipitát, nerozpustné komponenty)
- HPLC systému (degasser, obložení ventilů atd.) [10]

Řešení našla firma Waters (Milford, MA, USA) ve vývoji nových stacionárních fází s velikostí 1,7 μm podporovaných novou přístrojovou technikou, která na rozdíl od předešlé generace umožňuje bezpečně a reprodukovatelně pracovat s tlaky přes 80 MPa, tedy více než dvojnásobnými ve srovnání s předchozími přístroji. Obdobné produkty dalších významných producentů chromatografických zařízení pak na sebe nedaly dlouho čekat. Tato nová technologie umožnila dosahovat nebývale vysokých účinností běžně převyšujících 200 000 teoretických pater/m, zřídka údajně i téměř 400 000 a byla záhy akceptována v oblastech, jako jsou farmaceutická analýza, monitorování životního prostředí atd. [3].



Obr. 5 ACQUITY UPLC systém (Waters, USA)

Zmenšování sorbentu jde ruku v ruce se zkracováním chromatografických kolon. Výsledkem je podstatné zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi

provedenými na starších kolonách tradiční délky (25 cm) plněných 5 µm sorbentem. Doby analýz na krátkých kolonách (5 cm, 2 cm i menších) určených pro tzv. rychlou chromatografii bývají kolem 1 a 2 minut. Tyto kolony jsou s výhodou užívány zejména pro tzv. vysokoprostupné (high-throughput) analýzy v oblastech, kde jsou denně zpracovávány stovky a tisíce vzorků. Krátké kolony se ale začínají prosazovat i v běžných chromatografických aplikacích a celá řada firem poskytuje rostoucí sortiment kolon těchto nových formátů. Vedle zkracování kolon dochází postupně také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Tradiční průměr analytických kolon 4,6 mm je postupně opouštěn a nahrazován dnes již běžnějšími průměry kolem 3 - 4 mm. S nástupem techniky LC-MS vzrostla popularita kolon o průměru 2 mm a menším. Tento trend souvisí nejen se snahou o zrychlení analýz, ale také s úsilím o zlepšení ekonomiky provozu chromatografických laboratoří a v neposlední řadě i s hledisky ekologickými. Spotřeba mobilních fází, obvykle obsahujících organická rozpouštědla, a množství vznikajících odpadů může být tímto způsobem řádově sníženo. Navíc nově se rozvíjející obory, např. proteomika, vyžadují provádění separací v kolonách kapilárních a menších, protože množství vzorků bývají velmi malá a nároky na mez detekce vysoké. Splnění těchto požadavků klade velké nároky nejen na vývoj stále lepších sorbentů, ale i instrumentálních systémů. Čerpadla mobilní fáze musí generovat potřebné tlaky, mimokolonové objemy je třeba minimalizovat stejně jako rozměry detekčních cel, příslušné časové konstanty musí být sníženy apod. [9].

4.1.2.1.2 Porézní částice s neporézním jádrem

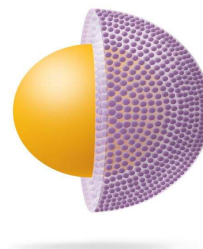
Na trhu se v současnosti tato technologie vyskytla pod obecným názvem „Fused-Core particle“ (kolony HALO vyrobené firmou Advanced Materials Technology, USA; kolona Ascentis firmy Sigma-Aldrich, USA) nebo „Poroshell particle“ (kolona Poroshell firmy Agilent Technologies, USA). Částice s porézní povrchovou vrstvou se skládají ze dvou vrstev. Vnitřní vrstvu tvoří kompaktní kulovité jádro z anorganického materiálu, často z velmi čistého pevného silikagelu. Neporézní jádro je překryté slabší vrstvou porézního materiálu. Čím tenčí je porézní vrstva, tím snazší je převod hmoty a roste účinnost separace. To je výhodou zejména pro makromolekuly, které difundují do a z pórů pomaleji než malé molekuly. Zároveň se ovšem s klesající tloušťkou porézní vrstvy snižuje specifický povrch stacionární fáze a klesá sorpční kapacita kolon [8].

První částice zvané HALO vyrobené firmou Advanced Materials Technology (USA) jsou tvořeny neporézním silikovým jádrem (core) s velikostí 1,7 µm a silnou vrstvou splynutých

(fused) silikových nanočástic. Povrchová porézní vrstva obsahuje 9 nm póry a její objem reprezentuje cca 87% celkového objemu částice. Konečná velikost stacionární fáze je tedy 2,7 μm .

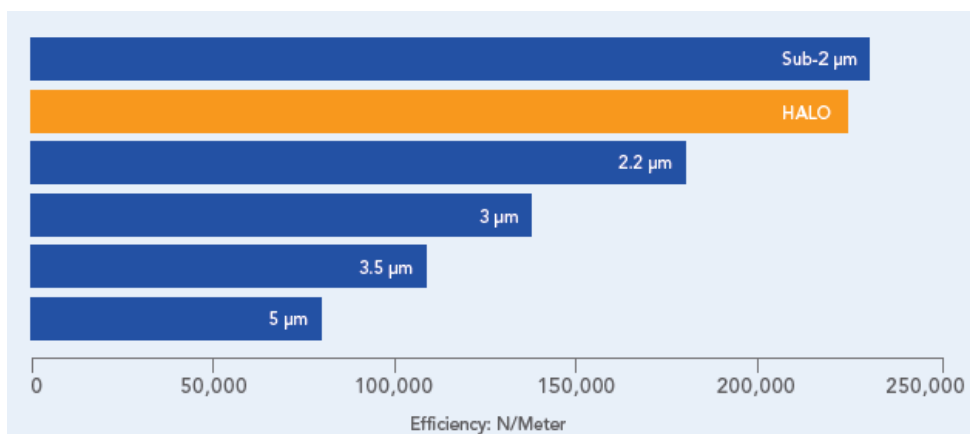


Obr. 6 Fused-Core™ částice [11]



Obr. 7 Model částice Poroshell [12]

Kolony plněné částicemi této velikosti mohou být použity ve standardních přístrojích, neboť nevyžadují zvýšený tlak k dosažení požadovaných průtokových rychlostí. Kolona naplněná fused-core/poroshell částicemi může poskytnout více než 210 000 teoretických pater/m, což je o 50% více než 3,5 μm fáze a dvojnásobek dostupný pro 5 μm fáze. Většímu rozmachu těchto stacionárních fází zatím brání omezený sortiment dvou typů navázaných skupin C8 a C18 vhodných pouze pro separace v obrácené fázi [13].



Obr. 8 Účinnost kolony HALO v porovnání s kolonami s rozdílnými velikostmi částic [11]

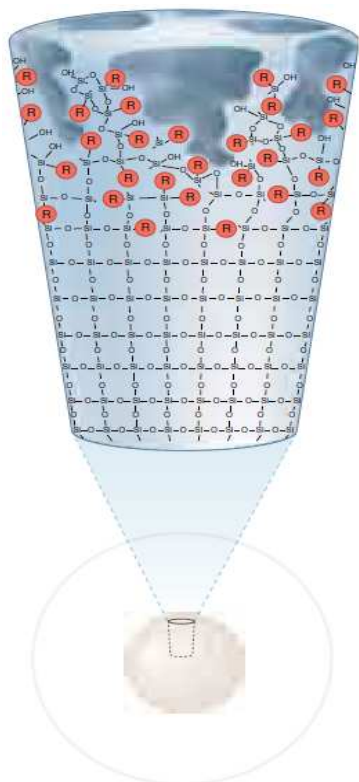
4.1.2.1.3 Hybridní stacionární fáze

V poslední době jsou komerčně dostupné i hybridní organicko-anorganické stacionární fáze na bázi silikagelu, na jehož povrchu se nejprve část OH skupin nahradí skupinami methylovými. Silanizací silikagelu s takto modifikovaným povrchem lze dosáhnout snížení

obsahu silanolových skupin (poměr zastoupení dlouhých alkylů, methylů a Si-OH skupin 1 : 1 : 1 místo poměru alkylů a Si-OH skupin 1 : 1 u „klasických“ stacionárních fází) [13].

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. mimořádnou pH stabilitou a sníženým efektem reziduálních silanolů. Hybridní reverzní fáze byly úspěšně testovány v rozmezí pH 1,2 a 11,5 [14].

Analyty bazické povahy tak mohou být často separovány ve formě volných bází s daleko lepší separační účinností a odlišnou selektivitou v kyselém prostředí. Další důležitou vlastností hybridních sorbentů je jejich zlepšená odolnost vůči zvýšené teplotě mobilní fáze. Možnost chromatografie při teplotách i kolem 60°C přináší řadu výhod: snížení viskozity mobilní fáze, a tím tlaku na koloně, zlepšení separační účinnosti a zmenšení závislosti účinnosti kolony na rychlosti průtoku (velmi zajímavý a důležitý efekt). Tím se vytváří příznivé podmínky pro uplatnění uvedených sorbentů při velmi rychlých separacích [9].



Obr. 9 Hybridní stacionární fáze
R - methylenové skupiny [15]



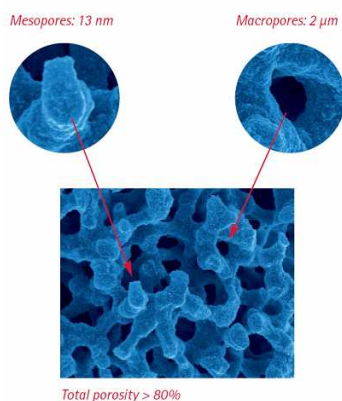
Obr. 10 Kolona Gemini-Twin

4.1.2.1.4 Monolitické stacionární fáze

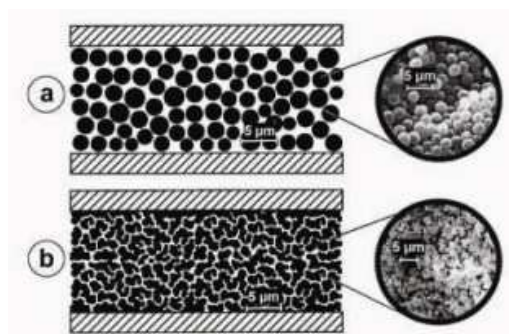
Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi, neobsahují monolity mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze nutně protékat póry monolitu [16].

Monolitické kolony mají dva typy pórů: a) velké póry (makropóry) zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, b) středně velké póry (mezopóry) poskytují monolitu dostatečně veliký povrch, a tím vysokou separační kapacitu [17].

SEM picture of a cross section from a silica monolith

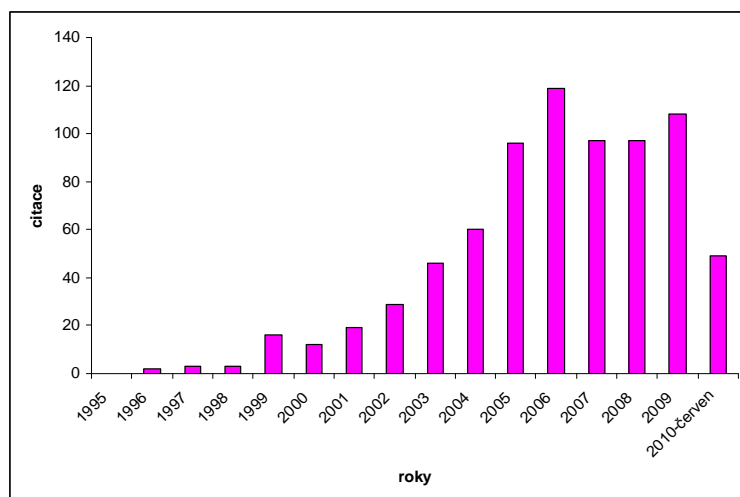


Obr. 11 Makropóry a mezopóry monolitické stacionární fáze [18]



Obr. 12 Struktura částicové stacionární fáze (a) v porovnání s monolitickou stacionární fází (b) [19]

Během minulého desetiletí byla zveřejněna celá řada originálních přístupů zahrnujících jak přípravu systémů vyznačujících se pouze některými prvky charakteristickými pro monolity (jako je snížený objem mezičásticových prostorů), tak i technologie skutečně monolitické. Do první skupiny patří např. kazety naplněné vrstvenými listy modifikované celulosy či srolované tkaniny. Monolity druhého typu jsou reprezentovány stlačenými hydrofilními gely, polymerními makroporézními disky, kolonami a trubicemi, jako i monolity na bázi siliky, což je dnes již vžitý termín pro materiály na bázi oxidu křemičitého. Některé z těchto materiálů již doznaly i praktického uplatnění [16, 20].

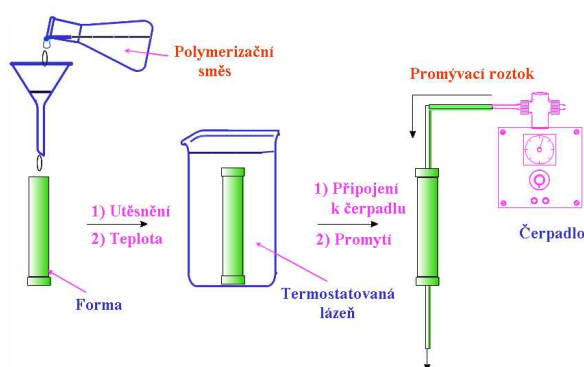


Obr. 13 Počet jednotlivých prací týkajících se HPLC a monolitů v letech 1995 - 2010 (zpracováno dle Web of Science 20.7.2010) [7]

Příprava monolitů

Příprava monolitů je jednoduchá. Získávají se radikálovou polymerací směsi, jež obsahuje monovinylový monomer s funkční či reaktivní skupinou jako jsou butyl- či glycidylmethakrylát, síťovadlo, typický monomer se dvěma či více dvojnými vazbami (divinylbenzen a ethylendimethakrylát), iniciátor a porogenní rozpouštědlo. Tato směs se naplní do formy buď plochého, nebo válcovitého tvaru, kde po zahřátí polymeruje [16].

Polymerační směs používaná pro přípravu těchto monolitů se může lišit. Funkční skupiny monolitických kolon připravených přímou polymerací jsou dány použitými monomery. Tento postup je např. velmi úspěšný pro přípravu monolitických kolon obsahujících poly(styren-co-divinylbenzen) vhodných pro mimořádně rychlé separace bílkovin [16].



Obr. 14 Schéma přípravy monolitické stacionární fáze [17]

Paleta výrobních technik byla doplněna i polymerací iniciovanou UV světlem zvláště výhodnou pro přípravu monolitů v kapilárách a mikrofluidních zařízeních [21, 22].

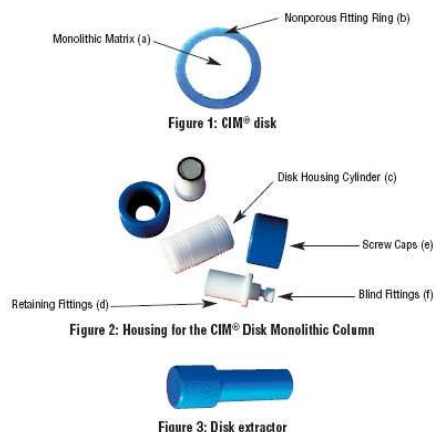
Tato metoda ovšem vyžaduje, aby forma, v níž reakce probíhá, byla transparentní pro UV světlo, což je např. snadno splněno v komerčních silikových kapilárách potažených teflonem [16].

4.1.2.1.4.1 Makroporézní polymerní disky

Tato forma vyvinutá v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV v Praze je jedním z prvních skutečně fungujících monolitických separačních médií, jež byly použity k velmi rychlým a účinným separacím bílkovin [23]. Původní impuls k jejich vývoji přišel z petrohradského Ústavu makromolekulárních látek, kde Belenkii studoval chromatografii bílkovin v módu gradientové eluce, při níž použil celou řadu separačních médií i kolon lišících se geometrií. Zjistil přitom, že pouze jistá, většinou velmi slabá vrstva sorbentu v koloně, je postačující k dokonalé separaci, což vedlo k odvození teorie krátkých separačních loží [24]. Příprava krátkých kolon potřebných pro experimentální ověření této teorie s použitím drobných částic se však ukázala velice obtížnou, protože tyto vrstvy byly příliš neuspořádané a obsahovaly četné kanálky. Nezbylo tedy než se poohlédnout po separačních médiích nového typu, monolitických discích, jež byly pro tento účel vyvinuty v Praze a skutečně umožnily potvrdit teorii a docílit chromatografické separace s tehdy nevídanou rychlostí [16].

Disky o tloušťce do 3 mm jsou při vlastní separaci umístěny ve speciálním držáku, kam může být vloženo i několik různých membrán lišících se chemickou modifikací, a tak lze provádět vícerozměrné separace.

Hlavní využití tohoto formátu dnes stále spočívá především v oblasti rychlého dělení velkých biomolekul gradientovou elucí. Většina komerčních disků je připravována z reaktivních monomerů, např. glycidyl-methakrylátu (GMA), které jsou následně vhodně chemicky modifikovány pro jejich použití v různých separačních modech [9].



Obr. 15 Příkladů makroporézních polymerních disků (CIM® DISK MONOLITHIC COLUMNS, BIA Separations, Lublaňa , Slovinsko)

4.1.2.1.4.2 Makroporézní rigidní polymerní kolony

Začátkem devadesátých let připravili prof. Švec a jeho skupina první rigidní makroporézní monolitické kolony. Jejich syntéza se provádí velmi jednoduchým způsobem, a to „in situ“ polymerací vhodných monomerů přímo v chromatografické koloně. Tyto rigidní monolity byly s úspěchem vyrobeny nejen ve formátu typických nerezových HPLC kolon, ale i v kapilárách, které nacházejí velké uplatnění při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Jejich velkou předností je fakt, že provedení polymerace přímo v kapiláře je snazší než její plnění mikročásticemi konvenčního sorbentu [9].



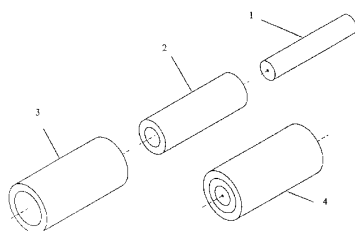
Obr. 16 Prof. František Švec

4.1.2.1.4.3 Tubulární kolony s radiálním tokem

Monolitické kolony by mohly být velmi zajímavé také pro preparativní separace. Problém je ovšem v tom, že radikálová polymerace v koloně je exotermní proces, při kterém se uvolňuje velké množství tepla. Polymerace probíhá bez míchání a odvod tepla je obtížný. Zatímco při výrobě monolitů pro analytické aplikace je tato komplikace zvládnutelná, dostatečně přesná kontrola tepelných poměrů při polymeraci velkých monolitů je totiž mimořádně obtížná.

Takovéto monolity mají v důsledku vytvořeného teplotního gradientu nehomogenní distribuci pórů v radiálním směru, a to vede ke zhoršení chromatografických parametrů [9]. Elegantní řešení tohoto problému nabídl ve své práci Podgornik [25]. Namísto plného monolitického bloku připravil monolit ve tvaru trubice. Její stěny jsou tenčí a teplota při polymeraci je tedy snáze udržována v požadované toleranci. Kromě toho lze snadno měnit jak průměr, tak i tloušťku této monolitické trubky. Zvětšení průměru při zachování stejné tloušťky stěny vede ke kvadratickému růstu celkového objemu separačního média a tedy i ke zvýšení separační kapacity. Použití několika tubulárních monolitů zasunutých do sebe teleskopickým způsobem umožňuje dosáhnout objemů stacionární fáze zcela nepředstavitelných při použití klasického výrobního postupu. Tok těmito kolonami je radiální, většinou z vnějšku do středu. Vynikající permeabilita těchto monolitů usnadňuje jejich použití i při vysokých průtokových rychlostech [16].

Tyto kolony mohou mít objemy i kolem 10 litrů, používané průtoky jsou asi 10 l/min a množství separovaných proteinů nebo oligonukleotidů může dosahovat i 200 g v jednom nástřiku [9].



Obr. 17 Konstrukce monolitické jednotky o velkém objemu [16]

4.1.2.1.4.4 Anorganické materiály

První monolitické stacionární fáze na bázi silikagelu připravili a popsali profesori Nakanashi, Soga a Tanaka [26, 27, 28, 29, 30].

Na rozdíl od rigidních makroporézních polymerních médií, silikagelové monolity analytických rozměrů nemohou být připraveny přímo v chromatografické koloně, neboť při solidifikaci během polykondenzace tetraalkoxysilanů porogenu dochází k výraznému zmenšování objemu. Nejprve je tedy připraven monolit, ten je pak zatěsněn do kolony odpovídajících rozměrů a nakonec obvykle následuje chemická modifikace povrchu podle účelu použití monolitu. Vzhledem ke srážení monolitu při jeho syntéze je obtížné připravit média s délkou nad ~ 15 cm. Pravděpodobně z podobných důvodů není snadná ani výroba monolitů s průměrem menším než 3 mm [9].

Komerčně jsou zatím dostupné kolony o průměrech 10 mm - semipreparativní kolona, 4,6 mm, 3,0 mm a nově 2,0 mm. Platí, že příprava silikagelových monolitů v kapilárním měřítku je snazší a reprodukovatelnější než výroba kolon větších rozměrů, a to proto, že kapiláry se s úspěchem polymerují podobně jako rigidní polymerní monolity, tedy přímým in situ procesem. Silikagelové tyče obsahují jak velké póry o velikosti kolem 1 μm , tak i velké množství mesoporů, a proto má výsledný monolit poměrně značně velký povrch, což je vlastnost důležitá zvláště při izokratických separacích v reverzním módu. Monolitické silikagelové kolony jsou vhodné pro rychlé separace především malých a středně velkých molekul. Tím se liší od všech ostatních typů monolitů, protože ty jsou naopak většinou užívány pro dělení makromolekulárních látek, většinou v gradientovém uspořádání [9].

Je zřejmé, že potenciál monolitů ještě není plně využit. Díky jejich unikátním vlastnostem, tj. snadné přípravě a toleranci k vysokým průtokům, jsou již dnes v řadě konkrétních případů preferovány před klasickými partikulárními sorbenty. Vzhledem k tomu, že monolitické kolony patří mezi nové stacionární fáze, není zatím jejich sortiment tak pestrý jako v případě částicemi plněných kolon, ale tento stav se pravděpodobně rychle změní [9].

Guiochon v roce 2002 napsal [31]: „Vynález a vývoj monolitických kolon je významná změna v kolonové technologii, vpravdě první původní průlom, který se objevil v této oblasti od doby před sto lety, kdy Cvět vynalezl chromatografii“. Velký objem experimentální práce nahromaděný do dnešních dnů či komerční dostupnost monolitických kolon podporují úvahy o jejich značném potenciálu do budoucna. Jejich jedinečné vlastnosti odlišující je od všech ostatních kolon, zejména pak snadnost jejich přípravy, tolerance k velkým průtokovým rychlostem dosažitelným s použitím pouze mírných tlaků a velké rychlosti, s nimiž lze dosáhnout vynikajících separací, činí tyto kolony v jistých oblastech nezastupitelnými. Počet separací docílených s monolitickými kolonami i množství vyvinutých separačních metod zatím zdaleka nedosahuje počtů charakterizujících jejich mnohem starší protějšky plněné sférickými částicemi. Je však otázkou času, kdy toto již nebude pravdou, protože počet chromatografistů používajících monolitické kolony neustále roste a do jejich výzkumu jsou v současné době zapojeny pracoviště na všech kontinentech [9].



Obr. 8 Monolitická kolona Onyx Monolithic C18 (Phenomenex) 100 x 3,0 mm



Obr. 9 Nová monolitická kolona Chromolith® FastGradient C18 endcapped (Merck) 50 x 2 mm

produkt	tvar	výrobce	materiál	separační módy
CIM	disk	<u>BIA Separations</u> , Ljubljana, Slovinsko	modifikované polymethakrylátové či polystyrénové kopolymery	iontová výměna, hydrofobní interakce, reverzní fáze, bioafinitní
CB Silica plate	disk	<u>Conchrom</u> , Bremen, Německo	modifikovaná silika	reverzní a normální fáze
SeptraSorb	disk	<u>Sepragen</u> , San Leandro, Kalifornie, USA	modifikovaná celulóza	iontová výměna
CIM	kolona	<u>BIA Separations</u> , Ljubljana, Slovinsko	modifikované polymethakrylátové kopolymery	iontová výměna
UNO kolona	kolona	<u>BioRad</u> , Richmond, Kalifornie, USA	kopolymery methakrylamidových monomerů	iontová výměna
Swift kolona	kolona	<u>ISCO</u> , Lincoln, Nebraska, USA	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, reverzní fáze
Chromolith kolona	kolona	<u>Merck</u> , Darmstadt, Německo	silika a modifikovaná silika	reverzní a normální fáze
Monolitická kolona	kolona	<u>LC Packings</u> , Amsterdam, Holandsko	polystyrenové kopolymery	reverzní fáze
Onyx kolona	kolona	<u>Phenomenex</u> , Torance, USA	silika a modifikovaná silika	normální a reverzní fáze
IonSwift™	kolona	<u>Dionex</u> , Sunnyvale, USA	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna
Bio-Monolit	disky	<u>Agilent Technologies</u> , Santa Clara, USA	modifikované methakrylátové polymery	iontová výměna

Tab. 1 Současně komerčně dostupné monolitické separační jednotky [16, 32, 33, 34]

4.1.2.1.4.5 Exotické monolity pro použití v separacích i mimo ně

Většina monolitických stacionárních fází používaných v separačních metodách je připravena na bázi silikagelu nebo organických polymerů, obvykle povrchově modifikovaných. Výhodami těchto „klasických“ monolitů jsou především jejich rigidita a morfologie, které dovolují dosáhnout nízkého odporu proti toku mobilní fáze. Nové hybridní monolitické stacionární fáze, pojmenované „exotické“, se skládají z nanovrstvy žádaného materiálu nanesené různými technikami na povrch „klasických“ silikagelových nebo organických monolitů.

Exotické monolity takto spojují výhody silikagelových nebo organických monolitů, které hrají roli porézního podkladu vhodných vlastností, a velmi odlišné nanovrstvy jiného materiálu na povrchu. Zlaté nanovrstvy ukládané na povrch monolitů různými způsoby představují jednu významnou část výzkumu v této oblasti. Atraktivita zlatého povrchu je především dána jeho silnou interakcí s thiolovými skupinami. Zlato je například používáno jako povrch pro samoskladné vrstvy (self-assembled monolayers, SAM) [35].

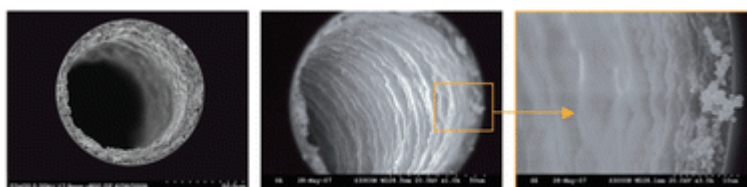
Dalším typem separačního materiálu jsou monolitické porézní kolony s velkým centrálním kanálem, tzv. Open-tubular monoliths. Byly připraveny monolity s vnitřním kanálem o průměru 10 μm [36].

4.1.2.1.4.6 Monolitické kolony s vnitřním kanálem - Open tubular monoliths

Příprava monolitů v kapilárách s vnitřním průměrem menším než 20 μm vyžaduje speciální technologii. Nicméně prázdné silikagelové kapiláry nenabízí požadovanou retenci látek. To bylo hlavním důvodem, proč se pozornost upřela na studium kapilárních kolon potažených tenkou vrstvou polymerního monolitu. Tyto kapiláry byly použity v kapilární elektrochromatografii. Hlavní výhodou byly velmi krátké separační časy (90 s), vysoká účinnost kolon (více jak 200 000 pater/m). 100 - 200 μm kolony mají ve srovnání s běžnými analytickými kolonami mnoho dalších výhod - malá spotřeba vzorku, menší rozmývání zón, což je výhodné při spojení s (ESI)-MS [37].

Tloušťka vrstvy významně ovlivňuje separační účinnost kolony v kapilární elektrochromatografii, po optimalizaci lze dosáhnout účinnosti 400 000 pater/m. Zrychlení separace může být dosaženo zvýšením teploty a tlaku [38].

Monolitické kolony s vnitřním kanálem byly také použity jako mikroreaktory pro digesci proteinů [39].



Obr. 18 Kapilární monolitické kolony s vnitřním kanálem–elektronový mikroskop [39]

4.1.2.1.5 *Stacionární fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu*

Vzhledem k omezené chemické odolnosti silikagelu v alkalickém prostředí byly hledány jiné chemicky odolnější materiály použitelné pro přípravu obrácených fází. Ukázalo se, že oxidy hliníku, zirkonia a titanu jsou podstatně stabilnější v silně alkalickém prostředí než silikagel. Navíc jsou tyto nové materiály v bazickém prostředí stabilní i při zvýšené teplotě, což neplatí pro silikagelové fáze. Zvýšená stabilita a pracovní rozsah pH přináší řadu výhod, kromě jiného i možnost regenerace kolon za velmi agresivních podmínek bez nebezpečí poškození sorbentu. Srovnávací testy jednotlivých oxidů prováděné za extrémních podmínek ukázaly, že oxid zirkonia je stabilnější než oxid hliníku jak v silně kyselém, tak alkalickém prostředí.

Kompatibilita sorbentů s vysokými teplotami nabízí mnoho zajímavých aplikačních výhod. Lze navíc připomenout možné využití samotné vody jako mobilní fáze. Je totiž známo, že při teplotě 200°C má voda podobnou polaritu jako methanol při laboratorní teplotě [40].

Tímto způsobem lze dosáhnout snížení spotřeby organických rozpouštědel. Navíc vyloučení organických solventů může nabídnout i nové detekční možnosti (např. měření ve vzdálené UV oblasti < 210 nm). V budoucnu lze předpokládat další rozvoj sorbentů odvozených od oxidů kovů. Je například pravděpodobné, že budou připraveny monolitické fáze. Také se dá očekávat, že bude pokračovat vývoj modifikačních technik, které povedou k dokonalejšímu odstínění matrice stacionární fáze. Nejnovější způsoby pokrývání oxidů kovů vrstvami uhlíku a možnosti jejich následující chemické modifikace jsou v tomto směru velkým příslibem [9].

4.1.2.2 *Moderní instrumentace v HPLC*

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, hlavními trendy v HPLC jsou zkracování doby analýzy, za účelem měření velkých sekvencí vzorků, zvyšování separační účinnosti pro analýzu složitých směsí a zvyšování citlivosti pro monitoring nízkých koncentrací analytů. Během několika posledních let došlo k významné inovaci instrumentace konvenčních HPLC přístrojů umožňující rychlejší analýzy s vyšší separační účinností a s nižšími limity detekce. Aplikace těchto instrumentálních inovací je široká zejména v laboratořích s velkým počtem vzorků, kde je kladen důraz na krátký čas analýzy. Své zastoupení nachází v mnoha bioanalytických oborech jako jsou klinická chemie, toxikologie, biochemie, forenzní toxikologie, analýza životního prostředí atd.

Také zvýšení separační účinnosti vedlo k využití zejména v genomice, proteomice a metabolomice, kde jsou analyzovány velmi složité biologické směsi, kde klasická HPLC selhává [41].

4.1.2.2.1 Trend HPLC využívající vysokých tlaků (UPLC, UHPLC, UFLC...)

UHPLC neznamena jen vylepšení instrumentace běžné HPLC ve smyslu zvýšení odolnosti vyšším tlakům, ale také systém schopný pracovat s rychlými analýzami (v ultra fast modu). Dochází zde také k výrazné redukci mimokolonových objemů a ke snížení objemu nástřiku vzorku. Malý průměr analytických kolon (1 - 2,1 mm i.d.) omezuje teplo vznikající třením a snižuje spotřebu rozpouštědel.

Pro dosažení vysokoúčinných separací by měly být splněny následující kritéria

- sběr dat by měl být rychlejší než u běžné HPLC, šířka píků je v UHPLC jen několik sekund
- sampler musí být schopen nástřiku v cyklech kratších než 1 - 2 minuty, důležitá je variabilita objemu nástřiku a možnost tzv. zakoncentrování analytu (peak focusing technique) pro zvýšení citlivosti u nízkých koncentrací
- schopnost rychlé adaptace na změnu mobilní fáze (skokový gradient)

UHPLC stanovení v biologických tekutinách

Pro stanovení látek v biologickém materiálu touto metodou je důležitá úprava vzorku před analýzou. Pro zlepšení citlivosti a selektivity je často tato technika spojována s MS detekcí, zejména u nízkých koncentrací analytů ve vzorku. Před analýzou je nutno důkladně zvážit způsob přípravy.

Nejčastěji je používána precipitace proteinů, ředění, filtrace, extrakce na pevnou fázi, extrakce do kapaliny atd. [42].

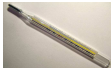



4.1.2.2.2 Vysokoteplotní kapalinová chromatografie (High temperature liquid chromatography - HTLC)

HTLC ($T > 60^{\circ}\text{C}$) poskytuje také vysokou separační účinnost a krátké časy analýz. Během HTLC dochází k snížení viskozity mobilních fází a tím ke snížení zpětných tlaků. Současně se zvyšuje rychlost přenosu hmoty a účinnost separace.

V roce 2000 Yang a další publikovali separaci pěti alylifenolů při 150°C ve 20 s (oproti separaci za laboratorní teploty 20°C ve 20 min) [43].

Navíc zvyšující se teplotou dochází k poklesu relativní permitivity (dielektrické konstanty) vody. Voda tedy může nahradit v mobilní fázi některá organická rozpouštědla, což je velkou výhodou při ochraně životního prostředí. Příkladem je separace steroidů s použitím vody jako mobilní fáze (100%) při 200°C během méně než 30 s [44].

Navzdory všem výhodám HTLC, není tato metodika rutinně příliš využívána [42]. První nevýhodou je nutnost použití stacionárních fází odolných vysokým teplotám. Druhým hlavním problémem je stabilita analyzovaných látek ve vysokých teplotách. Přesto byla publikována separace proteinů při 120°C bez jakýchkoliv stabilitních problémů. [45].

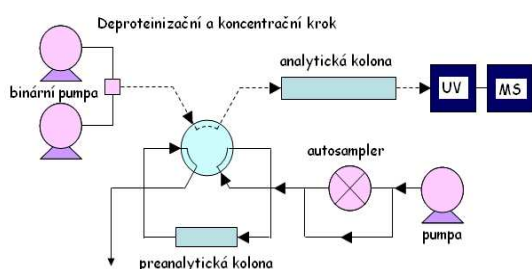
	výhody	nevýhody
 HTLC	šetrná k životnímu prostředí, pokles spotřeby organických rozpouštědel se zvyšující se teplotou, zlepšení tvaru píku u bazických léčiv a větších molekul (peptidů), možnost použití tohoto principu ve spojení s UHPLC pro zvýšení účinnosti	stabilita látek a silikagelových stacionárních fází je limitována teplotou 100°C, nutno další zařízení (přehřívací a chladicí zařízení a regulátor zpětného tlaku), špatný převod metod kvůli změnám selektivity látek při vysoké teplotě
 UHPLC	významné zkrácení doby analýzy, velká rozmanitost kolon s částicemi menšími než 2 μm (více než 10 výrobců), snadný převod metod mezi UHPLC a HTLC	nutnost speciální instrumentace, vhodné pro vysoké tlaky, rychlý nástřik, rychlý sběr dat (vyšší ceny), kvalitnější rozpouštědla (vyšší ceny), stlačitelnost kapalin a vznik třecího tepla u kapalin při tlacích 100 MPa
 Monolity	velmi nízké tlaky díky zvýšené propustnosti, kompatibilní s konvenčními HPLC systémy (levnější), různé velikosti kolon (např. 2,1 mm i.d.)	na trhu jsou pouze endkapované fáze C8, C18 a Si, nemožný přímý převod metod na HPLC (jiné retenční časy), tlakový limit 20 MPa, limit pH 2 - 8
 Fused-core	snížení difúze velkých molekul do pórů, dokonalejší tvar částic ($h = 1,5$) ve srovnání s ostatními materiály ($h = 2 - 2,5$), kompatibilní s běžnými HPLC systémy (levnější)	vyrábí se pouze fáze C8, C18 a HILIC, retence a kapacita lehce nižší (neporézní jádro), nižší odolnost tlakům (60 MPa) a pH (2 - 9) ve srovnání s UHPLC

Tab. 2 Porovnání výhod a nevýhod vybraných nových trendů v kapalinové chromatografii [42, 46]

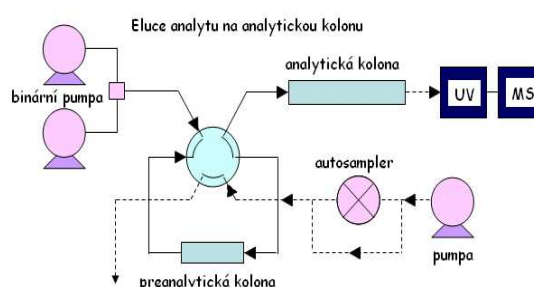
4.1.2.2.3 On line 2D HPLC

Hledání možnosti zvýšení píkové kapacity chromatografické kolony a tím i počtu analytů, které mohou být separovány v jediném nástřiku, vedlo ke vzniku vícerozměrné HPLC. Při klasické „off line“ HPLC se postupuje tak, že se sbírá určitá vybraná frakce ze semipreparativní kolony, která se následně analyzuje na druhé chromatografické koloně. Vybraná frakce se většinou sbírá do vialky a poté se nástřikuje nezávisle na druhou chromatografickou kolonu. Tento experiment vyžaduje dva nezávislé chromatografické systémy a případná automatizace této metody vyžaduje velmi složité technické zařízení. Při on line 2D chromatografii jsou přímo spojené dvě nebo více chromatografických kolon

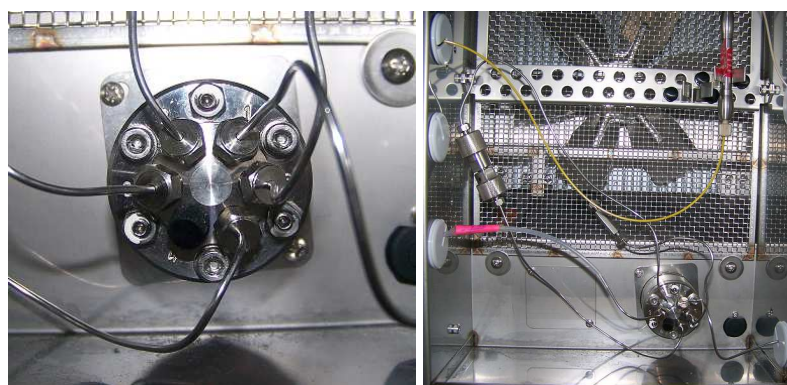
přes přepínací ventil v jediném chromatografickém systému. V ideálním případě je snaha sbírat veškerý eluent z první kolony a nastříkovat jej na kolonu druhou. Bohužel v praxi se na druhou kolonu nanáší pouze eluent obsahující soluty, které nás zajímají. Vícerozměrné (multidimenzionální, 2D) separační techniky poskytují dramatické zvýšení píkové kapacity a celková píková kapacita je rovna píkové kapacitě v obou systémech, což vede k daleko vyššímu rozlišení [47].



Obr. 19 2D HPLC přepínací ventil Krok 1
Nástřik vzorku na preanalytickou kolonu, vymytí balastů



Obr. 20 2D HPLC přepínací ventil Krok 2
Vymytí analytu na analytickou kolonu,
separace, detekce



Obr. 21 Selekční ventil HPLC Prominence LC 20 Shimadzu

4.1.2.2.4 Pseudo 2D HPLC

Dvourozměrná HPLC s jednou chromatografickou kolonou zjednodušuje koncept vícerozměrné chromatografie zahrnující následné separace ve dvou rozdílných mobilních fázích. Jako příklad je možné uvést použití konvenční reverzní fáze C18, která se použije pro separaci nabitých a neutrálních malých organických molekul a peptidů. V prvním módu se použije gradient pH vodné mobilní fáze pro pozvolnou ionizaci nabitých organických

molekul. Ve druhém módu se gradientem methanolu ve vodných pufrovaných mobilních fázích eluují neutrální hydrofobní molekuly, které se dosud zadržovaly na počátku chromatografické kolony během prvního kroku. Tento typ eluce je obvykle řízen pouze změnou složení mobilní fáze, protože stacionární fáze zůstává stejná pro každý separační krok. Tento typ separace není pravá dvourozměrná chromatografie, protože vysokomolekulární látky nejsou separovány [47].

4.1.2.2.5 Moderní instrumentace - autosampler pro mikrotitrační destičky

Další novinkou v HPLC instrumentaci, která umožňuje měření velkých sérií vzorků je speciální typ autosampleru pro mikrotitrační destičky. Jedna mikrotitrační destička nabízí 96 pozic o objemu 120 μl . Vzorky jsou v sampleru uchovávány v chladu (termostat) a ve tmě, kryty speciální krytkou, čímž je zabráněno rozkladu nebo zakoncentrování analytů.

Příkladem může být autosampler na mikrotitrační destičky Rack Changer (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), kde může být umístěno ve čtyřech zásuvkách celkem 12 destiček. Sampler umožňuje nastavení teploty od 4 - 40°C.



Obr. 22 Ukázka autosamplérů pro mikrotitrační destičky Rack Changer (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

4.1.2.2.6 Detekce - vybrané nové detekční systémy

Na detektor jsou kladeny určité požadavky:

- možnost detekce všech přítomných analytů (univerzálnost)
- okamžitá a lineární odezva detektoru v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah)
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu:
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón co nejmenší
- možnost gradientové eluce

4.1.2.2.6.1 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Využití hmotnostní spektrometrie v diagnostice bioorganických a biologických molekul znamenalo v poslední době obrovský rozvoj této metody, patrně největší za celou dobu její existence. Tato metoda vznikla před více než sto lety jako fyzikální metoda a až do konce padesátých let byla využívána především ve fyzikálních vědách, v chemii pak především jako analytická metoda při určování složení plyných směsí. V posledních zhruba dvaceti letech umožnil rozvoj přístrojů a vývoj nových ionizačních metod její mohutné rozšíření do oblastí biochemie, biologie a medicíny [48].

Hmotnostní spektrometrie (MS) v bioanalýze

Hmotnostní spektrometrie je v současné době jednou ze široce rozšířených metod kvalitativní analýzy neznámých molekul se zvláštním zřetelem na identifikaci a charakterizaci makromolekul biologické povahy. Tohoto faktu se využívá v řadě bioanalytických technik, zejména pak k identifikaci či sekvenaci a určení molekulové hmotnosti neznámých proteinů či peptidů. Existuje řada MS technik, které se liší typem ionizace, hmotnostního analyzátoru či detektoru. Nejčastějším uspořádáním zdroje iontu využívaným v biologii je zejména ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) v kombinaci s analyzátozem doby letu (TOF). Tyto metody jsou k biologickému vzorku šetrné a umožňují analyzovat až 300 kDa velké proteiny. Často jsou kombinovány s chromatografickým předčištěním vzorku, například pomocí HPLC [49].

Princip

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů.

MS je mimořádně citlivá, destruktivní metoda s minimální spotřebou vzorku umožňující určení molekulové hmotnosti a dalších strukturních informací.

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich m/z . MS je řazena mezi spektrální techniky, i když podle definice by tam patřit neměla, protože spektrální techniky měří rozdíly energií mezi dvěma energetickými stavy molekuly a sledují pravděpodobnost tohoto přechodu (IČ, UV, NMR, atd.) - mezi tyto techniky je MS řazena pro formální podobnost získaných záznamů (hmotnostních spekter) s jinými spektry, podobné instrumentální uspořádání i aplikační využití (strukturní analýza) [50].

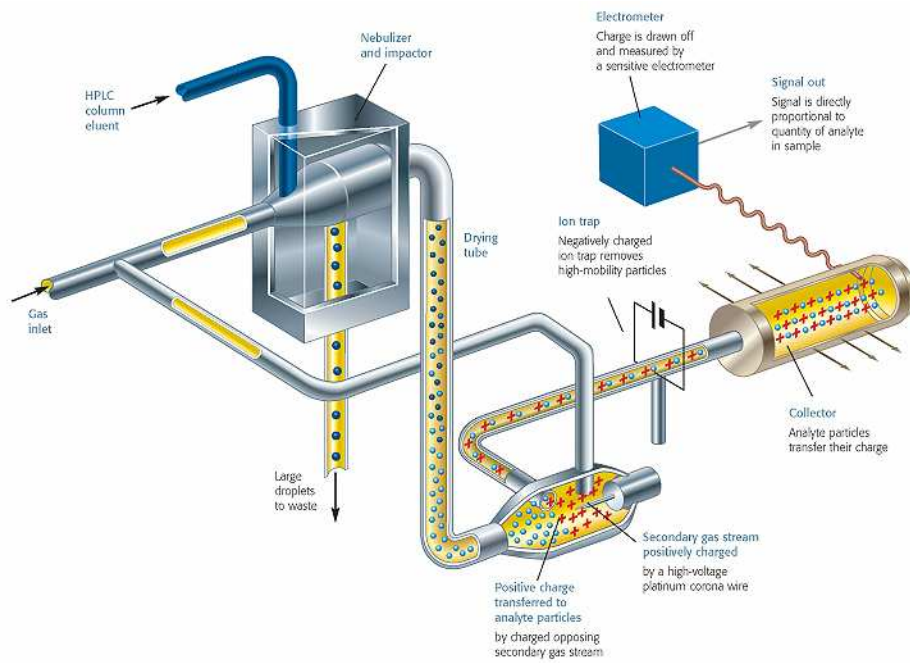
4.1.2.2.6.2 Tandemové techniky (Hyphenated techniques) HPLC-MS

Hlavní výhodou tandemových technik je možnost v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek. Dochází ke kombinaci výhod obou spojovaných technik. Alternativní způsob spočívající v izolaci látek po jejich chromatografické separaci a následném změření hmotnostních spekter pro jednotlivé látky offline technikou je pracný, časově náročný a pro složité směsi látek nebo látky ve stopové koncentraci ve směsi nemusí být vůbec proveditelný [51].

4.1.2.2.6.3 CAD-Corona™ Charged Aerosol Detector

Tento detektor byl vyvinut pro univerzální detekci látek bez chromoforu, fluoroforu firmou Esa (Kalifornie, USA). Je to citlivý a univerzální detektor, který je kompatibilní s gradientovou elucí.

CAD pracuje na principu detekce kladně nabitých částic, které mají rozdílnou pohyblivost (hmotnost). Obdržený signál je závislý především na velikosti částic solutu a není závislý víceméně na fyzikálně-chemických vlastnostech solutu. Při vstupu eluentu z chromatografické kolony do zmlžovače dojde k jeho zmlžení (vznik aerosolu) inertním plynem (dusíkem). Zmlžený eluent (aerosol) vstupuje do evaporační komůrky, kde dojde k odstranění mobilní fáze (tvoří větší a těžší částičky než solut) a vytvoření částiček méně těžkého solutu. Ve zmlžovači dochází ke kondenzaci eluentu, který je odváděn odpadním výfukem ze zmlžovače do odpadu. Aerosol solutu a zbytků mobilní fáze proudí sušicí trubicí, kde dojde k dalšímu odstranění zbytků mobilní fáze, a aerosol poté přichází do kolizní komůrky. V kolizní komůrce je umístěna elektroda, na kterou se přivádí vysoké napětí (na elektrodě vzniká koronový výboj, odtud název detektoru CORONA), a současně je hnán do kolizní komůrky sekundární nosný plyn (dusík), který se na hrotu elektrody nabíjí kladně. Kladně nabitý nosný plyn se mísí (difúzí) s aerosolem a předává molekulám aerosolu svůj kladný náboj. Takto kladně nabitý aerosol je hnán přes "negativní iontovou past" (elektrické pole), ve které dojde k odstranění (filtraci) nadbytku kladně nabitých částic lehčího nosného plynu a mobilní fáze. Kladně nabité částice solutu proudí do kolektoru, kterému předávají svůj náboj za vzniku proudu, který se měří citlivým elektrometrem. Signál je přímo úměrný množství solutu [52].



Obr. 23 Schéma detektoru CORONA [52]



Obr. 24 Sestava s detektorem Corona® CAD® (Esa - A Dionex, USA)

4.1.2.2.6.4 ELSD detektor - Odpařovací detektor rozptylu světla -Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

Evaporative Light Scattering HPLC Detector (ELSD) především slouží k detekci látek, které ve své molekule neobsahují žádný chromofor nebo fluorofor. Jako příklad je možné uvést detekci fosfolipidů, mastných kyselin, makromolekul, sacharidů, aminokyselin. ELSD detektor je univerzální detektor, u něhož můžeme použít na rozdíl od refraktometrického detektoru gradientovou eluci.



Obr. 25 ELSD detektor [53]

Při vstupu eluentu (mobilní fáze) do zmlžovače dojde k jeho zmlžení inertním plynem (dusíkem o rychlosti 0,4 až 1,5 l/min). Zmlžený eluent vstupuje do evaporační komůrky, kde dojde k odpaření mobilní fáze a vytvoření částic méně těkavého solutu. Ve zmlžovači dochází ke kondenzaci eluentu, který je odváděn odpadním výfukem (obdobně jako v technice LC-MS), např. octan amonný, hydroxid amonný, kyselina mravenčí nebo octová, pentylamin. Zmlžený eluent se solutem dopadá do evaporační komůrky, ve které nesmí docházet k rozptýlení solutu, aby byly eluující píky ostré. V optické komůrce dojde k rozptylu světla pocházejícího ze zdroje záření na částicích solutu a odezva fotodetektoru je přímo úměrná hmotě solutu procházející optickým paprskem [54].

4.1.2.2.6.5 Výhody a nevýhody ELSD

Odezva detektoru odpovídá všem přítomným netěkavým solutům, jinak řečeno, odezva detektoru by měla být úměrná hmotnosti přítomných solutů. Aby byl lineární dynamický rozsah detektoru co největší, musí se velikost solvatovaných částic roztoku kontrolovat a měla by být jednotná (desolvatace). Velikost částic solutu určuje, jak se dopadající

světlo rozptýlí. Tvorbu kapiček solutu v nebulizéru a jejich velikost v závislosti na složení mobilní fáze je možné s určitou mírou predikovat. Závisí na průtoku mobilní fáze, viskozitě a její hustotě. Rozptyl světla se pak měří v takovém úhlu od excitujícího paprsku, aby byly co nejvíce eliminovány polarizační efekty. Linearita detektoru závisí tudíž také na fyzikálně chemických vlastnostech solutu. Obecně je linearita ELS detektoru daleko nižší než detektoru UV. Protože musí být mobilní fáze těkavější než soluty, což vyplývá z principu ELSD, jsou na mobilní fázi kladeny určité limitující požadavky. Použitá mobilní fáze významně ovlivňuje šum detektoru. Proto je nutná vysoká kvalita HPLC solventů, ale i stacionární fáze (vymývání - krvácení - stacionární fáze). Technika ELS je technikou destruktivní, a proto musí být detektor zařazen jako poslední detektor v sérii. Předností detektoru je jeho univerzálnost, slouží především k detekci látek, které ve své molekule neobsahují žádný chromofor nebo fluorofor. Je možné použít gradientovou eluci, ta je ale omezena tím, že změna složení mobilní fáze má vliv na velikost částic solutu a jejich odpařování [54].

4.1.2.2.7 Laboratoř na čipu (lab on chip)

V posledním desetiletí jsme svědky velkého pokroku na poli mikrofluidiky, miniaturizace a integrace analytických procesů. Lze předpokládat, že mikrofluidika bude hrát důležitou roli při vývoji instrumentace pro hromadné analýzy. Hlavní přínosy spojené s miniaturizací spočívají v rychlosti analýz, malé spotřebě vzorku a činidel, integraci funkčních prvků a možnosti paralelních analýz. Typické příklady využití miniaturizace a mikrofluidiky zahrnují vývoj v oblastech mikrokolonové chromatografie (μ LC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární elektroforézy (CE), předkoncentračních jednotek a mikroreaktorů. Tyto techniky lze využít např. pro analýzy DNA, proteinů, peptidů nebo screening léčiv. Klíčovým prvkem pro využití mikrofabrikovaných zařízení pro proteomiku je spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) nebo MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry) [55].

Hlavním cílem nově vyvinutých mikrochemických systémů bylo uplatnění v biochemii a medicíně. Systémy jsou vyrobeny ze skla, silikonu, polymerních materiálů, v nichž jsou kapalně vzorky transportovány mikrokanály z rezervoárů do reaktorů pomocí elektrokinetických, magnetických nebo hydrodynamických metod. Pro měření produktů se používá škála detekčních zařízení.

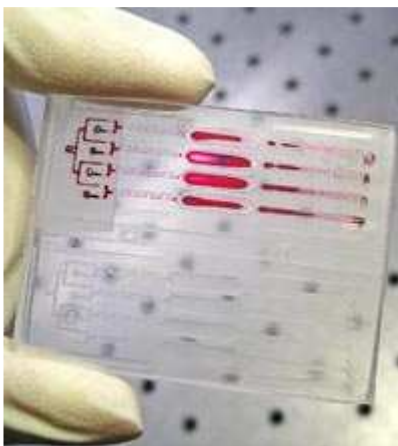
Hlavními výhodami jsou nízká cena, samozřejmě nízké objemy rozpouštědel i vzorku (nl), krátká doba analýzy a široké uplatnění v mnoha oborech.

výhody	nevýhody
malý objem vzorku a rozpouštědel rychlá analýza nízká cena bezpečnější analýzy vyšší rozlišení	nová technologie, ne ještě zcela úplně vyvinutá fyzikální a chemické aspekty-kapilární síly, povrchové napětí, chemické interakce s výrobními materiály čipu nemožnost detekce nízkých koncentrací u určitých typů detektorů (nízký poměr signál/šum)

Tab. 3 Porovnání výhod a nevýhod laboratoře na čipu [56]

Aplikace:

- genomika
- proteomika
- studium cukrů
- klinická, biochemická a chemická diagnostika
- imunoassay
- separace buněk [56]



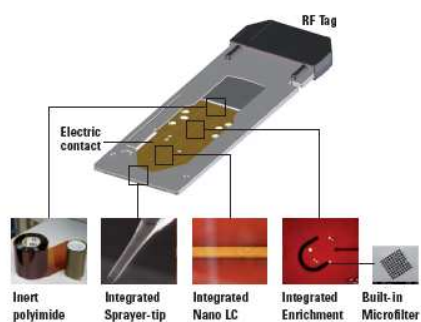
Obr. 26 Biočip pro detekci krevních skupin [57]

Velikosti kanálek mikrofluidických zařízení se pohybují většinou v rozsahu desítek mikrometrů a celé mikrofluidické bloky dosahují rozměrů 5 – 100 cm². Mikrofluidické čipy mohou být vyrobeny z různých materiálů, např. ze skla, křemene, křemíku nebo polymerních substrátů. Kapilární elektroforéza je nejčastější separační metodou využívanou pro

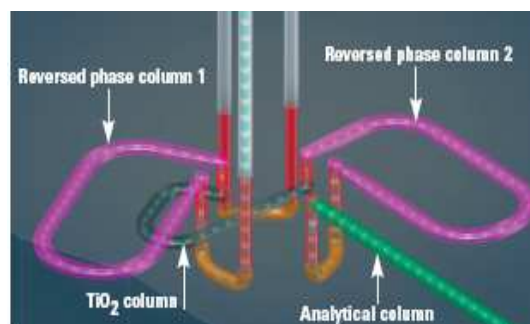
separace na mikročipech. Souvisí to s jednoduchostí připojení elektrod separačního napětí (narozdíl od připojení chromatografické pumpy) a také se zájmem o separace směsí DNA nebo proteinů, které jsou většinou analyzovány elektroforézou. Značné úsilí je také zaměřeno na vývoj μ LC. Účinnost LC pro separaci směsí peptidů a vyšší dávkovací kapacita oproti elektroforéze vytváří předpoklad pro citlivé separace s mikročipy. V nejjednodušším uspořádání lze plnit kanály mikročipu běžnými stacionárními fázemi. Novější směr představují polymerní monolitické kolony, ve kterých je stacionární pórovitá struktura polymerována přímo uvnitř separačního kanálku. Typické průtoky v mikrofluidických kanálcích jsou v rozsahu 10 – 300 nl/min. Tyto hodnoty jsou zároveň blízké optimálním průtokům při mikro/nano elektrosprejové ionizaci. Vhodným uspořádáním výstupu kapaliny z mikrofluidického bloku by tedy mělo být umožněno přímé (on-line) spojení s hmotnostním spektrometrem [55].

Vývoj kombinace mikrofluidiky s hmotnostní spektrometrií započal v posledních několika letech a lze očekávat podstatná vylepšení jak v technologii přípravy, tak v praktických návrzích a aplikacích. Zájem o tuto problematiku lze dokumentovat na vzrůstajícím počtu publikací, které se každoročně objevují ve vědecké literatuře [55].

Firma Agilent vyvinula HPLC na čipu ve spojení s MS detekcí. Mikročip je napojen na nano LC pumpy a přepínací mikroventil (obsahující stator a rotor), kterým lze regulovat nástřik vzorku a průtok mobilní fáze čipem či přepnutí do elektrického módu pro CEC. Čip obsahuje systém kolon (viz Obr. 28), vstupy pro elektrické napětí důležité pro elektrosprej, který je na konci čipu ve spojení s MS detektorem (analyzátor doby letu TOF). Jednou z výhod oproti klasické nanoLC je malé množství spojů, a tím nízké procento úniku vzorku nebo mobilní fáze mimo LC systém.



Obr. 27 Zapojení nano-LC kolon v mikročipu firmy Agilent [58]



Obr. 28 Schéma mikročipu firmy Agilent [58]

4.2 Validace HPLC metod v bioanalýze

Validace analytické metody je série experimentů, kterými lze zjistit nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je vhodná pro zamýšlené použití. Cílem validace je vyšetřit praktické hranice, ve kterých je zkušební postup použitelný, a zjistit, zda při opakovaném použití v jedné nebo různých laboratořích metoda dávala stále stejně spolehlivé výsledky [59].

Platné normy pro validaci v klinických laboratořích:

- Český lékopis 2009 [60]
- Evropský lékopis - (European Pharmacopoeia) [61]
- Americký lékopis (USPh) [62]
- FDA guidelines (Food and Drug Administration) [63]
- Věstník SÚKL 1/1994 - novelizace nebyla provedena, v dalších dokumentech je uvedena norma ICH [59]
- Validace analytických metod v klinických laboratořích: doporučení výboru České společnosti klinické biochemie [64]
- International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Harmonised Tripartite guideline, Text on validation of analytical procedures Q2A [65]
- International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Harmonised Tripartite guideline. Validation and analytical procedures: methodology Q2B [66]
- publikace: A practical Guide to Analytical Method Validation [67]
- publikace: Validation of HPLC methods for pharmaceutical [68]
- příručka: Holík M. Příručka validace analytických metod, Masarykova univerzita [69]
- standardní operační postup laboratoře (SOP)
- Analytical detection limit guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. Wisconsin Department of Natural Resources, Laboratory Certification Program [70]

4.2.1 Druhy validací

Validace metody v rámci jedné laboratoře se nazývá interní (vnitřní) validace a podle účelu ta může být validace průzkumová, plná atd. Interní validace, jejímž cílem je na omezeném počtu vzorků stanovit, zda je zvolená analytická metoda vhodná pro plnou validaci, se nazývá průzkumová validace. Zaměřuje se na vyhodnocení delikátních validačních parametrů jako jsou selektivita a robustnost a na stanovení opakovatelnosti na omezeném počtu vzorků. Po prokázání vhodnosti průzkumové validace následuje plná validace, jejímž cílem je demonstrovat vhodnost metody k zamýšlenému použití vyhodnocením všech požadovaných validačních parametrů. Při zavedení publikované validované analytické metody resp. validované metody v jiné laboratoři se používá tzv. validace při převodu metody a obvykle zahrnuje stanovení správnosti laboratoře a opakovatelnosti. K ověření platnosti dříve plně zvalidované metody se používá kontrola způsobilosti metody a zahrnuje pouze kontrolu kalibrační přímky (linearita a citlivost). Existují-li již dříve naměřená data, která byla naměřena za stejných podmínek, může se použít tzv. retrospektivní validace, která umožní vyhodnotit jeden z nejdůležitějších validačních parametrů - opakovatelnost. Externí (vnější) validace zahrnuje interní validaci společně s validací metody srovnáním výsledků metody z více laboratoří (mezilaboratorní porovnávací zkoušky) a zahrnuje výpočet reprodukovatelnosti metody [71].

Validace a následně validační protokol, by měly mít tři části:

1. Podrobně vypracovaný analytický postup

- příprava vzorku a standardů
- výrobce, typ a kvalita analytického zařízení (autosampler...)
- použitý materiál (kolona, tenká vrstva, mobilní fáze...) a jeho případné úpravy (aktivování, kondicionování)
- způsob a postup vnesení vzorku a standardů
- postup analýzy (temperování, gradient, derivatizace)
- postup vyhodnocování včetně použitých výpočetních vzorců

Někdy se tato část validačního protokolu nahrazuje odkazem na normu nebo jiný publikovaný návod. V zásadě by však měl validační protokol tvořit jeden samotný celek, a proto je vhodné v něm analytický postup uvést.

2. Test vhodnosti použité metody, system suitability test, t.j. číselné prokázání toho, že byl navržený analytický postup zvolen správně. U chromatografických metod se doporučuje provést alespoň některé z těchto testů.
 - dělící účinnost systému (počet teoretických pater pro kolonovou chromatografii, retenční faktor pro TLC)
 - asymetrie píku
 - rozlišení píku
 - čistota píků (peak purity test) nebo identita
 - opakovatelnost analýzy (instrument precision)
 - stabilita vzorku a standardů

3. Vlastní validace analytické metody, t.j. číselné prokázání toho, že výsledky získané touto metodou jsou správné, přesné a reprodukovatelné. Z toho vyplývají i odpovídající testy.
 - přesnost (precision)
 - správnost (accuracy)
 - linearita (v případě TLC tvar závislosti)
 - robustnost (ruggedness)
 - selektivita (u hlavní látky)
 - detekční a kvantifikační limit

Každý test by měl být v protokolu ukončen definovaným požadavkem na jeho úspěšnost a zhodnocením, zda byl požadavek splněn nebo ne. Nesplnění požadavku neznamena automaticky zamítnutí metody, ale třeba jen že stanovení jisté vedlejší látky je méně přesné než jiné, u testu linearity se uvádí více požadavků a některé mohou být splněny a jiné ne (např. jeden reziduál může být větší než 2) [69].

Podle FDA je SST tvořen následujícími parametry:

- kapacitní faktor - definující retenci látky vzhledem k mrtvému objemu t_0 ,
$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad k > 2$$
- přesnost/opakovatelnost nástřiku
- relativní retence
- symetrie píku
- účinnost chromatografického systému

SST dle Českého lékopisu 2009 [60]

Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, hmotnostní distribuční poměr, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie.

Pokud není v lékopisném článku uvedeno jinak, musí se splnit následující požadavky:

- Faktor symetrie hlavního píku má být mezi 0,8 - 1,5. Tento požadavek je obecně použitelný u zkoušky na čistotu nebo na stanovení obsahu popsané v lékopisných člancích.
- Maximální dovolená relativní směrodatná odchylka ploch hlavního píku pro opakované nástřiky předepsaného porovnávacího roztoku nepřevyšuje hodnoty uvedené v tabulce 8. Tento požadavek je použitelný pouze pro stanovení obsahu a nepoužívá se ve zkoušce na příbuzné látky.
- Mez detekce píku (odpovídající poměr signálu k šumu = 3) je pod limitem zanedbatelnosti u zkoušky na příbuzné látky.
- Mez stanovitelnosti píku (odpovídající poměru signálu k šumu = 10) je nejvýše rovna limitu zanedbatelnosti u zkoušky na příbuzné látky.

Věstník SÚKL 1/1994 [59]

Věstník SÚKL požaduje pro validaci následující parametry:

- přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- linearita, rozsah
- správnost
- detekční a kvantitativní limit
- selektivita
- robustnost

4.2.2 Jednotlivé validační parametry

4.2.2.1 Účinnost chromatografického systému

Počet teoretických pater (N) udává účinnost chromatografického systému

	ČL 2009	FDA	SÚKL	ICH - USPh	Holík
vzorec	$5,54 (T_R/W_h)^2$	$16 (T_R/W)^2$	nezabývá se	$16 (T_R/W)^2$	$16 (T_R/W)^2$
požadavek	N > viz jednotlivé lékopisné články	N > 2000	nezabývá se	N > viz jednotlivé lékopisné články	N > 300

Tab. 4 Účinnost chromatografického systému dle jednotlivých norem

W_h - šířka píku v polovině jeho výšky (min)

W - šířka píku na základně (min)

T_R - retenční čas (min)

Dle Johna W. Dolana [72] by měl být počet teoretických pater u kolon o rozměrech 150 x 4,6 mm o velikosti částic 5 μm mezi 12 000 - 15 000. U kolony stejných rozměrů o velikosti částic 3 μm by měl dosahovat 13 000 - 16 000. U reálných vzorků by měl počet teoretických pater dosahovat 10 000 a více.

K porovnání kolon různé délky se používá tzv. výškový ekvivalent teoretického patra HEPT (high equivalent to a theoretical plate),

$$HEPT = L/N$$

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

Často je také uváděn pro porovnání přepočítaný počet N na délku kolony v metrech př. 180 000/m

4.2.2.2 Faktor symetrie (A_s)/asymetrie chromatografického píku (T)

	ČL 2009	FDA	SÚKL	ICH - USPh	Holík
vzorec	$W_{0,05}/2d$	$W_{0,05}/2f$	nezabývá se	$A + B/2A$	$W_{0,05}/2f$
požadavek	$A_s = 1,0$ ideální	$T = \leq 2$	nezabývá se	$T = 1,0$ ideální	$T < 1,2$

Tab. 5 Faktor symetrie dle jednotlivých norem

$W_{0,05}$ - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

A, f - menší část úsečky, která vznikne protnutím ramen píku a je rozdělena kolmicí spuštěnou z vrcholu na dvě části

B - delší část úsečky, která vznikne protnutím ramen píku a je rozdělena kolmicí spuštěnou z vrcholu na dvě části

4.2.2.3 Rozlišení chromatografických píků (R)

	ČL 2010	FDA	SÚKL	ICH - USPh	Holík
vzorec	$1,18 (T_{R2} - T_{R1}) / (W_{h1} + W_{h2})$	$1,18 (T_{R2} - T_{R1}) / 0,5(W_i + W_j)$	nezabývá se	$(T_{R2} - T_{R1}) / (W_i/2 + W_j/2)$	$2(T_{R2} - T_{R1}) / (W_i + W_j)$
požadavek	$R_{ij} > 1,5$	$R_{ij} > 2$	nezabývá se	dle lékopisného článku	$R_{ij} > 1,5$

Tab. 6 Rozlišení chromatografických píků dle jednotlivých norem

$$T_{R2} > T_{R1}$$

T_{R2} , T_{R1} - retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřihu ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků

W_{h1} , W_{h2} - šířky píků v poloviční výšce

W_i , W_j - úsek na základní linii (šířka píku na základně)

4.2.2.4 Retenční čas a retenční poměr

Měření retence v eluční chromatografii se může vyjádřit retenčním časem (T_R) přímo definovaným polohou vrcholu píku na chromatogramu. Z retenčního času se může vypočítat retenční objem (V_R) podle vzorce:

$$V_R = T_R \cdot v$$

v - průtoková rychlost mobilní fáze [59]

4.2.2.5 Hmotnostní distribuční poměr

Hmotnostní distribuční poměr (D_m - známý jako kapacitní faktor k) je definován jako: množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi / množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

$$D_m = K_C \cdot V_S/V_M$$

K_C - rovnovážný distribuční koeficient (distribuční konstanta)

V_S - objem stacionární fáze

V_M - objem mobilní fáze

Hmotnostní distribuční poměr složky se může určit z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = (T_R - T_M)/T_M$$

T_R - retenční čas nebo objem

T_M - mrtvý čas nebo objem

4.2.2.6 Relativní retence (retenční poměr)

Relativní retence se vypočítá podle vzorce [59]:

$$r = (T_{R2} - T_M)/(T_{R1} - T_M)$$

v němž značí:

T_{R2} - retenční čas sledovaného píku

T_{R1} - retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce)

T_M - mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřihu ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce

4.2.2.7 Čistota píku (peak purity test)

Na začátku, uprostřed a na konci píku analyzované látky se změří pomocí DAD UV spektra.

Požadavek je, aby všechna tři spektra byla identická v rámci možné chyby měření [64].

4.2.2.8 Přesnost

Dle Věstníku SÚKL [59]: je přesnost analytické metody mírou shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji se stejnými činidly na jednom

zhomogenizovaném vzorku. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře. Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku, ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji. V tomto případě jde o přesnost při přenosu metody z jedné laboratoře do druhé [59].

Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka a stanoví se minimálně ze 6 nezávislých analýz zhomogenizovaného vzorku provedených kompletním postupem počínaje přípravou vzorku. Nestačí proto jen např. 6 x nastříknout do chromatografu jeden roztok, ale je nutné připravit kompletním postupem 6 roztoků vzorku. SÚKL požaduje jen doložení opakovatelnosti metody tedy přesnost metody při provedení jedním analytikem na jednom přístroji se stejnými činidly.

FDA uvádí přesnost jako opakovatelnost a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost se dělí na opakovatelnost nástřiku a opakovatelnost analýzy.

Opakovatelnost nástřiku je hodnocena jako relativní směrodatná odchylka 10 nástřiků stejného vzorku.

Opakovatelnost analýzy je definována jako analýza vzorků jedním analytikem se stejnými činidly, přístroji a ve stejné laboratoři. Často je v praxi kombinována se správností metody jako jedna studie. Opakovatelnost analýzy se stanoví změřením minimálně pěti vzorků na každé ze tří koncentračních úrovní.

Reprodukovatelnost (intermediate precision) byla dříve součástí robustnosti. Metoda by měla vykazovat stejné výsledky homogenního vzorku, nezávisle na čase, přístroji a osobě, která analýzu provádí.

V USPh je reprodukovatelnost označena jako rigidita [62].

Přesnost dle ČL 2009

Jednotlivé části použitého zařízení se musí kvalifikovat a musí být schopné dosáhnout přesnosti požadované pro provedení zkoušky nebo stanovení obsahu.

Maximální dovolená relativní směrodatná odchylka ploch hlavního píku pro opakované nástřiky předepsaného porovnávacího roztoku nepřevyšuje hodnoty uvedené v tabulce 8. Tento požadavek je použitelný pouze pro stanovení obsahu a nepoužívá se ve zkoušce na příbuzné látky.

	ČL 2009	FDA	SÚKL	ICH-USPh	Holík
opakovatelnost nástřiku	RSD = horní limit obsahu v jednotlivých lékopisných člancích - 100%, n = 3 - 6	RSD ≤ 1%, n = 5	ne	ne	SD ≤ 1%, n = 7 - 10
opakovatelnost analýzy	ne	CV ≤ 15% n = 5/3 úrovně CV ≤ 20% pro LLOQ	RSD n = 6	n = 3/3 úrovně	SD ≤ 1%, n = 10 pro hlavní látku SD ≤ 5%, n = 10 pro vedlejší látky (0,1-1,0%),
reprodukovatelnost	ne	CV ≤ 15% n = 5/3 úrovně CV ≤ 20% pro LLOQ	ano	ano	zatím se běžně neprovádí

Tab. 7 Přesnost dle jednotlivých norem

B (%)	počet jednotlivých nástřiků			
	3	4	5	6
	maximální dovolená relativní směrodatná odchylka (RSD %)			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

B-horní limit obsahu uvedený v jednotlivých lékopisných člancích minus 100%

Tab. 8 Požadavky na opakovatelnost dle ČL2009 [60]

4.2.2.9 Stabilita

Stabilita látek v biologickém materiálu je ovlivněna skladovacími podmínkami, chemickými vlastnostmi analytu, matrice a skladovací nádoby. Stabilita provedená na jedné matrici by neměla být extrapolována na matrice jiné. Stabilitní studie by měla zahrnovat ověření stability vzorku během odběru, před přípravou a skladováním. Stabilitu lze rozdělit na tzv. dlouhodobou a krátkodobou. Experimenty by měly postihnout celý proces od příjmu až po skladování vzorku (např. vliv opětovného zmrazování a rozmrazování vzorku). Zásobní roztoky standardních látek by měly být připraveny ve vhodných rozpouštědlech v odpovídajících koncentracích.

4.2.2.9.1 Vliv opětovného zmrazování a rozmrazování na stabilitu analytu (Freeze and Thaw Stability)

Stabilita analytu by měla být stanovena po třech rozmrazovacích cyklech ve dvou koncentračních úrovních (nízké a vysoké, $n = 3$). Alikvoty by měly být skladovány 24 hodin při předpokládané skladovací teplotě, pak rozmrazeny při 25°C a následně opět zamrazeny na 12 - 24 hodin za stejných podmínek. Tento proces se opakuje třikrát (ve třetím cyklu jsou vzorky analyzovány).

4.2.2.9.2 Krátkodobá stabilita

Tři alikvoty obou koncentračních úrovní (vysoká a nízká) se rozmrazí při 25°C a ponechají 4 - 24 hodin (vzhledem k očekávané době zpracování vzorku ve studii při této teplotě).

4.2.2.9.3 Dlouhodobá stabilita

Skladovací doba pro dlouhodobou stabilitní studii by měla být delší než doba od odběru vzorku přes jeho zpracování až po analýzu. Opět se skladují tři alikvoty od každé koncentrace (nízká a vysoká) za předpokládaných podmínek v dostatečném množství pro tři příležitostná měření. Koncentrace látek by měla být srovnávána s koncentrací v první den dlouhodobé stabilitní studie.

4.2.2.9.4 Stabilita zásobních roztoků - Stock Solution Stability

Stabilita zásobních roztoků a roztoku interního standardu by měla být stanovena při pokojové teplotě 25°C po šesti hodinách, pakliže jsou roztoky skladovány při nižší teplotě, měla by být stabilita dokumentována i při těchto podmínkách.

4.2.2.9.5 Post-preparativní stabilita

Jedná se o stabilitu vzorků, které byly již zpracovány, a zahrnuje dobu, kterou vzorek stráví v autosampleru před analýzou. Do této studie je zahrnuta také stabilita vnitřního standardu, která se porovná s čerstvě připraveným roztokem vnitřního standardu v kalibrační úrovni.

Výsledky stabilitní studie a jejich statistické zpracování by měly být součástí standardního operačního postupu [63].

4.2.2.9.6 Stabilita standardů a vzorků

V této stabilitní studii se testuje, zda je analyzovaný vzorek dostatečně teplotně stabilní a zda je jeho teplotní stabilita srovnatelná se standardem. Připraví se roztoky standardu a vzorku a rozdělí se na dvě části, které se uchovávají čtyři dny při teplotě 2 - 8°C a při teplotě místnosti. Plochy píků takto skladovaných roztoků se srovnávají každý den s plochami píků získaných od čerstvě připravených roztoků [69].

Stabilita S_T (%) se vypočte podle vzorce:

$$S_T = 100(A - A_T)/A$$

A_T je průměr dvou měření ploch píku u roztoku skladovaného

A je průměr dvou měření ploch píku u roztoku čerstvě připraveného

Požadavek je $S_T < 1\%$.

4.2.2.10 Správnost stanovení (accuracy)

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

V případě, že se stanovovaná látka nachází v matrici, která může při měření interferovat, testuje se správnost metody pomocí standardního přídatku účinné látky a to buď k samotné matrici, nebo k analyzovanému přípravku. Její koncentrace je C_0 , koncentrace stanovená u modelového vzorku je C_i [69].

$$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$$

Dle Věstníku SÚKL: Pokud se analyzuje modelový vzorek, přidává se standardní látka v množství menším i větším, než je deklarovaný obsah. Některé postupy uvádějí 10% hladinu, jiné 50%. SÚKL požaduje jen jednu hladinu, tedy stanovení minimálně šesti různých modelových vzorků s přibližně 100% obsahem stanovené látky. Při přidání standardní látky ke vzorku se přidává méně než 100%, aby se výsledek nedostal mimo kalibrační křivku [59].

	ČL 2009	FDA	SÚKL	ICH - USPh	Holík
vzorec	$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$	$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$	$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$	$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$ n = 9/3 úrovně	$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$
požadavek	uvedeno v jednotlivých lékopisných člancích	$\leq 15\%$ n = 5/3 úrovně $\leq 20\%$ pro LLOQ	ne	uvedeno v jednotlivých lékopisných člancích	$S_T < 1\%$ hlavní látka $S_T < 5\%$ vedlejší látka

Tab. 9 Správnost dle jednotlivých norem

$$S_T = \sqrt{(\sum(R_i - 100)^2 / n)}$$

S_T - chyba měření

R_i (RSD) - relativní směrodatná odchylka

n - počet měření

4.2.2.11 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky úměrné koncentraci analyzované látky [69].

Kalibrační křivka by měla být vypočítána pro každý analyt ve vzorku. Měla by být provedena ve stejné biologické matrici jako vzorek pomocí standardního přídávku do vzorku. Koncentrační úrovně by měly být stanoveny podle očekávaných koncentrací ve studii. Kalibrační křivka by se měla skládat z blanku (vzorek matrice bez vnitřního standardu), z nulového vzorku (vzorek matrice + vnitřní standard) a z šesti nebo osmi nenulových vzorků v očekávané koncentrační úrovni obsahující LOQ [63].

Definice linearity dle USPh: Linearita analytické metody je její schopnost vyvolat výsledky, které jsou přímo nebo dobře definovatelnými matematickými transformacemi úměrné koncentraci analytu ve vzorku v daném rozsahu [62].

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (r). Při lineární závislosti nabývá hodnoty + 1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější [73].

	ČL 2009	FDA	SÚKL	ICH-USPh	Holík
vzorec	uvedeno v jednotlivých lékopisných člancích (n = 4)	6 - 8 koncentračních úrovní+blank+nulový vzorek	5 koncentračních úrovní	5 koncentračních úrovní	5 koncentračních úrovní (n = 3/level)
požadavek	uvedeno v jednotlivých lékopisných člancích	korelační koeficient $\geq 0,999$	linearita v 50 - 150% očekávané koncentrace	uvedeno v jednotlivých lékopisných člancích	+/- 50% očekávané koncentrace

Tab. 10 Linearita dle jednotlivých norem

4.2.2.12 Robustnost

Robustnost je míra schopnosti metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když popsaný postup zůstává zachován. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. SÚKL nepožaduje číselné doložení, ale je velmi užitečné uvést v dokumentaci poznatky z vývoje metody, které mohou ovlivnit výsledky, např. vliv pH a teploty, stability vzorku v roztoku, vliv různých šarží činidel, rámec změn eluentu apod. [59].

Analytická metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek. K tomuto testu se připraví jeden vzorek standardu analyzované látky, 8 x se nastříkne a změří se odpovídající plochy píků A_i . Před každým nástříkem se změní pracovní podmínky. V tomto experimentu se mění 5 pracovních podmínek (proměnných) na dvou úrovních - spodní a horní. Proměnné si zvolí analytik tak, aby představovaly reálně možné odchylky dolů a nahoru od optimálních podmínek [69].

ICH zařazuje robustnost jako součást validačního protokolu [65].

4.2.2.13 Selektivita

Selektivita je schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek. To mohou být další účinné látky, pomocné látky, nečistoty, zbytková rozpouštědla, rozkladné produkty nebo neznámé látky. Je nutné doložit, že metoda je dostatečně selektivní pro dané použití. Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými rozkladnými produkty, nečistotami atd. [59].

USPh a ICH uvádí pro toto stanovení pojem specifita.

FDA uvádí selektivitu pro stanovení v biologickém materiálu jako schopnost kvantifikovat analyt v přítomnosti dalších komponent vzorku. Pro zjištění selektivity je nutno změřit blankový vzorek příslušné biologické matrice nejméně na šesti různých vzorcích (např. vzorky od šesti různých osob). Každý blank musí být testován na přítomnost možných interferencí (rozkladné produkty, metabolity, složky matrice...). Selektivita musí být stanovena i v limitu kvantifikace [63].

4.2.2.14 Detekční a kvantifikační limit

LOD (limit of detection) - detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestanovované kvantitativně za definovaných experimentálních podmínek.

LOQ (limit of quantification) - kvantitativní limit je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností [69].

Stanovením detekčního a kvantifikačního limitu se podrobněji zabývá norma „Analytical detection guidelance and laboratory guide for determining method detection limits“. Limit detekce a kvantifikace pro biologický materiál je počítán jako poměr signálu k šumu větší než 5 a v případě LOQ větší než 10 [70].

	ČL 2009	FDA	SÚKL	ICH-USPh	Holík
LOQ	S/N	5 x větší odezva než blank - LLOQ Přesnost 20%, správnost 80 - 120%	5 x S_n	S/N = 10:1	5 x S_n
LOD	S/N	3 x S/N	3 x S_n	S/N = 2:1	3 x S_n

Tab. 11 Detekční a kvantifikační limit dle jednotlivých norem

S_n - směrodatná odchylka odezvy slepého pokusu - šumu

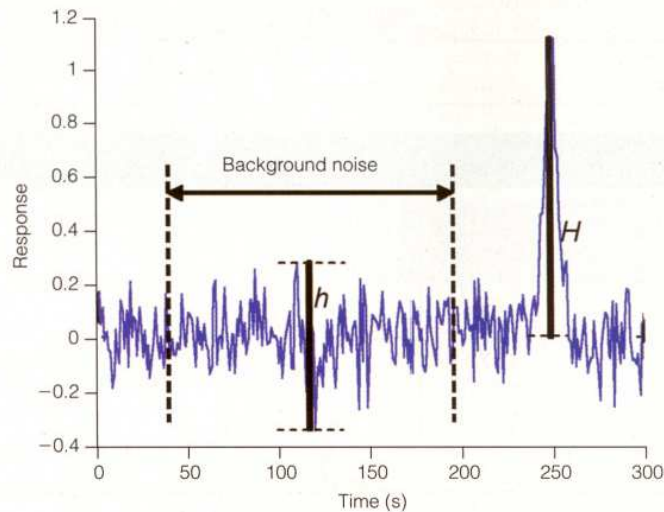
S/N - poměr signálu k šumu

Podle ČL 2009 se poměr signálu k šumu vypočítá jako:

$$S/N = 2H/h$$

H - výška píku odpovídající dané složce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřená od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky.

h - rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl pík nacházet [59].



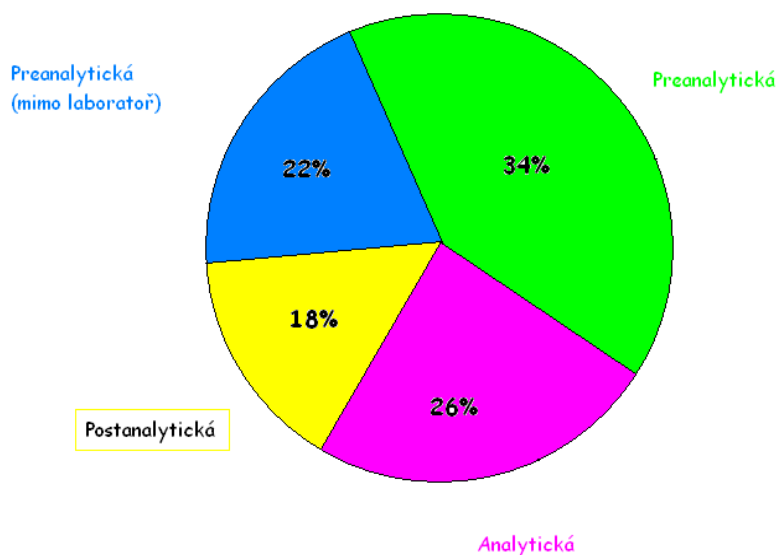
Obr. 29 Jednotlivé parametry pro výpočet poměru signálu k šumu dle PhEU [74]

Pro validaci analytické metody je vždy určen odpovědný pracovník - analytik, který také sepíše validační protokol. Při sepisování validačního protokolu je třeba brát ohled na to, aby jeho jednotlivé listy nebyly zaměnitelné. Tzn. je třeba označit jednotlivý list nějakým kódem. Celkové provedení validace kontroluje a výpočty v protokolu ověřuje jiný pracovník, zpravidla vedoucí oddělení, oba pak také protokol podepíší [64].

4.3 Preanalytická část

4.3.1 Vliv preanalytické fáze na výsledek analýzy

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



Obr. 30 Jednotlivé fáze laboratorního vyšetření podle časové náročnosti (průměrné hodnoty)

Zdaleka nejdůležitější z hlediska možného ovlivnění výsledku je období preanalytické. Uvádí se, že nerespektování preanalytických vlivů způsobuje chybný výsledek nebo jeho nesprávné hodnocení častěji než analytická chyba. V preanalytickém období mohou výsledek ovlivnit následující faktory:

- osoba pacienta
- odběr vzorku
- transport vzorku
- uchování vzorku před analýzou
- příprava vzorku ke zpracování [75]

4.3.1.1 Osoba pacienta

4.3.1.1.1 Neovlivnitelné faktory

Pohlaví

- červený krevní obraz

Rasa, etnická a sociální skupina obyvatel

- odlišná frekvence některých chorob
- nižší hladiny granulocytů u příslušníku negroidní rasy
- vliv stravovacích návyků etnických skupin
- frekvence určitých genů

Věk

- odlišnost mnoha parametrů v dětském a dospělém věku (pozitivní dusíková bilance u rostoucího organismu, vyšší aktivita kyselý fosfatázy....)

Cyklické změny

- diurnální rytmus u kortizolu
- měsíční rytmus pohlavních hormonů

Gravidita

- v krvi bílkoviny produkované trofoblastem nebo orgány plodu
- vzestup cholesterolu v posledním trimestru
- pokles koncentrace kreatininu i močoviny v séru (hemodiluce)

Současně probíhající jiná nemoc hlavně pokud chybí některé údaje o pacientovi

4.3.1.1.2 Ovlivnitelné faktory

Fyzická aktivita vede k následujícím změnám

- přesun tekutiny z intravazálního do intersticiálního prostoru (hemokoncentrace)
- uvolnění svalových bílkovin do krevního oběhu (zvýšená aktivita CK, AST, LD...)
- pokles pH př. při anaerobní zátěži
- pokles clearance kreatininu, vzestup močoviny
- metabolické změny (klesá koncentrace TAG, stoupá HDL a volné mastné kyseliny)

Psychický stres

Zejména u dětí při odběru krve se stres projevuje vyplavením hormonů dřeně nadledvin a jejich vliv na metabolismus ovlivňuje zejména glykémii.

Vliv potravy, alkoholu, tekutin

- Není-li odběr nalačno, můžeme pozorovat zvýšení Glc, TAG, MK, močoviny, kyseliny močové, aktivity ALP, změnu pH moči.
- Příjem tekutin se projeví u pacientů různou hustotou moči, ale i změnou koncentrace některých látek v séru (vzestup bílkovin, hemoglobinu, močoviny).
- Před biochemickým vyšetřením by neměl pacient 24 h přijímat alkohol, jinak můžeme pozorovat hyperlipoproteinémii, uvolnění jaterních enzymů, hyperurikémii.

Vliv kouření

- Kouření výrazně zvyšuje podíl kyslíkhemoglobinu a koncentraci thiokyanátů v séru, nikotin stimuluje sekreci žaludeční šťávy.
- Kuřáci mívají vyšší hladinu fibrinogenu, hemoglobinu, železa a karcinom-embryonálního antigenu.

Léky

- Působí na metabolismus stanovené látky.
- Ruší (interferují) při vlastní analýze.

Operace

- Stanovení může ovlivnit podané narkotikum (hepatotoxicita).
- Řez svalovou tkání (vzestup CK, AST, LD)
- Hormonální odpověď na stres + vzestup bílkovin akutní fáze [75]

4.3.2 Odběr, transport a skladování jednotlivých druhů biologického materiálu

4.3.2.1 Odběr krve

Odebírá se krev venózní, arteriální nebo kapilární. Poučení pacienta hraje klíčovou roli v celém procesu laboratorního vyšetření. Odběr nalačno pro většinu laické populace znamená nesení, ale odběrem nalačno se rozumí, že pacient přibližně 10 - 12 hodin nejedl, byl v klidu a odběr je proveden v ranních hodinách. Poloha pacienta je při odběru velmi významná a může ovlivnit koncentraci celé řady látek (např. při poloze ve stoje je koncentrace vysokomolekulárních bílkovin o 10% vyšší, některé hormony mají ve stoje

koncentraci až o 50% vyšší). Při delším zaškrvení končetiny (asi 5 min) a výraznějším cvičení dochází až k 10% změně aktivity nebo koncentrace řady analytů (ALT, CK, bilirubin, LD, albumin, cholesterol, AST, vápník, glukóza, vápník, kreatinin a další). V případě použití odběru do zkumavek s gelovými separátory je nutné si uvědomit možnost ovlivnění výsledku mechanickými a chemickými vlastnostmi gelu a možnou adsorpcí látek na gel. Při odběru arterializované krve na vyšetření krevních plynů je nutné pracovat anaerobně (vyhnout se bublinám v kapiláře) [76].

4.3.2.2 Vyšetření z nesrážlivé krve a plazmy

Pro některá klinicko-biochemická vyšetření je nutné získat nesrážlivou krev. Jsou to vyšetření prováděná z celé krve (acidobazická rovnováha, glykémie, laktát, minerály, glykovaný hemoglobin, kalium, magnesium v erythrocytech atd.). První zásadou je dodržet předepsaný poměr mezi objemem roztoku a antikoaguantu. Při přidání menšího množství krve k odparku dochází k objemovým a tvarovým změnám krvinek, přidáme-li velký objem, krev se sráží. Krev je nutno v nádobce dokonale promíchat a to opakovaným obracením. Vyhýbáme se třepání, aby nedošlo k hemolýze. Antikoaguační přípravek dále ovlivňuje složení odebrané krve. Všechny koagulanty včetně heparinu vážou ionty Ca^{2+} a tedy snižují jejich koncentraci, totéž platí o Mg^{2+} . Pro stanovení Ca^{2+} je nutné používat heparin vytitrovaný těmito ionty.

Na tomto místě je vhodné uvést, že plazma a sérum se od sebe liší více než jen přítomností koagulačních faktorů, zejména fibrinogenu v séru. Během koagulace se totiž z rozpadlých trombocytů uvolňují některé jejich složky, které pak jeví v séru vyšší koncentraci. Sérum bývá také mnohem častěji hemolytické - v tomto případě se do séra dostávají látky obsažené v cytoplazmě erythrocytů. Tak má sérum vyšší aktivitu kyselé fosfatázy, ale i koncentraci draslíku [75]. Uvolněný hemoglobin v séru ruší fotometrická stanovení, ale také svými fyzikálně chemickými vlastnostmi může ovlivnit průběh reakcí sloužících ke stanovení analytů [76].

4.3.2.2.1 Transport a uchování vzorku

Podmínky uchování vzorku mají stejně jako jeho transport vliv na stabilitu analytů. Při delším stání odebrané krve dochází k vyčerpání energetických zdrojů erythrocytů (glukózy). Ty pak nemohou udržet základní metabolické děje, k nimž patří funkce membrány zajišťující transport K^+ do buňky a Na^+ opačným směrem. Následně pak naměříme

hyperkalémii. Únik kalia z buněk se urychlí, uskladníme-li odebranou krev v chladničce, neboť udržování K^+ v buňce je enzymový děj, který poklesem teploty ustává.

Při uchování v teple spotřebovávají leukocyty kyslík a dochází k produkci oxidu uhličitého a tím klesá pH krve. Většina vyšetření se však provádí v krevním séru. Není-li provedeno stanovení ihned, obvykle stačí uchovat sérum v chladničce při $+4^{\circ}C$ a to v dobře uzavřené zkumavce, aby nedošlo k zahuštění vzorku odpařením vody. Většina analytů včetně enzymů je stabilní řadu dní. Při delším skladování se uchovává sérum zmrazené (při $-20^{\circ}C$, event. $-80^{\circ}C$), výjimečně se upravuje mrazovou sublimací (lyofilizací), tento způsob konzervace se však používá spíše u kontrolních sér.

Chemická konzervační činidla se k uchování užívají jen vzácně a je nutné předem ověřit, zda neruší při požadované analýze [75].



Heparinová plazma/ Krev



Srážlivá krev/Sérum



Citrátová plazma-koagulační testy



K_3EDTA plazma/Krev



K_3EDTA plazma s NaF

4.3.2.3 Moč

Moč lze definovat jako průhledný vodný roztok metabolických odpadů, rozpuštěných solí zejména chloridu sodného a dalších organických látek. Barva je od světle žluté po jantarovou, kterou podmiňují barviva žlutý urochrom a červený urosein. pH moči se pohybuje v rozmezí 5 - 6. Moč je z biologických tekutin nejspodněji dostupná.

Podle způsobu odběru dělíme moč na:

- získanou jednorázově
- sbíranou po určitý časový úsek

O spolehlivosti vyšetření moči nerozhoduje jenom její správný odběr a kvalitní provedení analýz.

Moč je velmi nestálá tekutina a po odběru podléhá rychlým změnám.

Ranní moč může představovat nasycený roztok některé z látek při tělesné teplotě. Při ochlazení na teplotu místnosti může daná látka z roztoku vypadnout a může tak vzniknout amorfní nebo krystalická sraženina.

Moč je výborným prostředím pro množení mikroorganismů, které rozkládají látky obsažené v moči (kreatinin, glukózu, močovinu), rozkladem vzniká amoniak a mění se tak pH [77].

4.3.2.3.1 Zásady pro transport a skladování moči

Konzervační činidla při základním vyšetření moči zásadně nepoužíváme. Ani v případě nutnosti sběru moči. Přísnější doporučení pro odběr vzorku uvádějí nutnost vymočení pacienta přímo v laboratoři nebo ordinaci. Interval od vymočení do zpracování vzorku má být dle možností do jedné, maximálně do dvou hodin, což ovšem nebývá často ze strany pacienta dodrženo [78].

Při sběru moči za 12 - 24 hodin je vhodné moč uchovávat v chladu nebo použít různé konzervační látky (thymol, azid sodný) [76].



Obr. 32 Odběrová zkumavka na moč

4.3.2.4 Likvor

Likvor je čirá bezbarvá tekutina o hustotě 1006 - 1009 g/m³, která se za fyziologických podmínek nachází v komorovém systému mozku a míchy. Více než polovina likvoru (55 - 70%) je tvořena aktivní sekrecí chorioidální a extrachorioidální. Zbylá část vzniká ultrafiltrací plazmy.

4.3.2.4.1 Zásady pro transport a skladování likvoru

Mozkomíšni mok získáváme nejčastěji lumbální punkcí. Punkce znamená riziko a zátěž pro pacienta, odběr nelze často opakovat a objem odebraného likvoru je omezený.

K vyšetření se odebírá 10 - 15 ml. Mok se odebírá frakcionálně do tří sterilních zkumavek. Pokud má být mok k dalšímu vyšetření transportován bez možnosti chlazení během transportu, nesmí být po odběru uložen do lednice. Mozkomíšni mok není vhodné před imunochemickým vyšetřením uchovávat v lednici. Také opakované zmrazení a rozmrazení vede k jeho znehodnocení [76].

Likvor je nutné okamžitě doručit do laboratoře, aby bylo možno do 60 minut provést mikroskopické vyšetření (leukocyty) a z chemických vyšetření kvantitativní stanovení glukózy (glykoarchie) a chloridů (chloridoarchie) [79].



Obr. 33 Odběrová zkumavka na likvor

4.3.2.5 Stolice

Stolice se skládá ze zbytků požití potravy, sekretů, odloupaných epitelů trávicího traktu, bakterií, kvasinek a jiných mikroorganismů.

Stolice se v současné době vyšetřuje nejčastěji na okultní krvácení odběrem vzorku do připravených detekčních políček. Vyšetření stolice lze rozdělit na fyzikální (vzhled, množství, pH, barva, konzistence, zápach, příměsi, frekvence stolice), biochemické (kvalitativní, pH, hlen,

buněčné elementy, okultní krvácení, vyšetření na zbytky potravy), mikrobiologické a parazitologické.

4.3.2.5.1 Zásady pro transport a skladování stolice

Z podložní mísy do nádoby opatřené zátkou, ve které je upevněná lopatička, odebereme ze středu stolice množství odpovídající velikosti lískového ořechu.

4.3.2.6 Sputum

Odběr sputa (sekret bronchiálních žláz) se provádí nalačno při první ranní expektoraci do sterilní zkumavky nebo nádoby s širokým hrdlem. Odběr provádíme minimálně 3 x za sebou. Před odběrem se nemocný nesmí napít a čistit zuby [80].



Obr. 34 Odběrová nádoba na sputum - sterilní

4.3.2.7 Výpotek

Kliničtí odborníci popisují výpotek (exsudát) z rány jako „to, co vychází z rány“, jako „tekutinu rány“. Exsudát obsahuje celou řadu látek, včetně vody, elektrolytů, živin, zánětlivých mediátorů, bílých krvinek, enzymů pro trávení a rozklad bílkovin, růstových faktorů a odpadních látek [80].

Celková bílkovina je $> 30 \text{ g/l}$, LD $> 200 \text{ U/l}$ ($3,3 \mu\text{kat/l}$).

4.3.2.7.1 Zásady pro transport a skladování exsudátu

Odběr do sterilní zkumavky a rychlý transport do laboratoře.

4.3.2.8 Plodová voda

Plodová voda je čirá tekutina, která se získává amniocentézou. V termínu porodu může být zbarvena lehce doběla a v případě, že těhotná žena přenáší, může být barva také nazelenalá.

Složení plodové vody ovlivňuje jak matka, tak samotný plod. Obecně se ale uvádí, že z 99% je tvořena vodou, 0,3% ve složení zastupuje glukóza a bílkoviny, 0,7% močovina, dále kreatinin a minerální látky. V menším množství jsou obsaženy i buňky z pokožky plodu. Od 12. týdne gestace do ní přechází i moč plodu.

4.3.2.8.1 Zásady pro transport a skladování plodové vody

Odběr 2 x 15 ml plodové vody je sterilně rozdělen do dvou sterilních plastových zkumavek s dobře těsnícím šroubovatelným víčkem bez přídavných látek. Odebraný materiál se uchovává při pokojové teplotě. Transport do laboratoře je nutno zajistit co nejdříve, nejpozději do 24 hodin po odběru [81].

4.3.2.9 Mateřské mléko

Mateřské mléko obsahuje 3 - 5% tuku, 0,8 - 0,9% karbohydrátů (laktóza) a 0,2% minerálů. Obsah tuku se během laktace příliš nemění, ale podléhá diurnálnímu cyklu. Základními proteiny v mateřském mléce jsou kasein, alfa-laktalbumin, laktoferin, imunoglobulin IgA, lysozym a albumin. Základním cukrem je laktulóza a dalších 30 či více oligosacharidů. Tuk v mateřském mléce obsahuje velké množství palmitové a olejové kyseliny. Fosfolipidy jsou zastoupeny v obsahu 75 mg/100 ml a zahrnují fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a sfingomyelin [82].



Obr. 35 Lidské mateřské mléko - dva vzorky pocházející od stejné ženy, z jediného sání: Vlevo nejprve vodnaté přední mléko z plného prsu, vpravo tučné zadní mléko z téměř prázdného prsu [83].

4.3.2.9.1 Zásady pro transport a skladování mateřského mléka

Mléko je uchováváno v pevné skleněné nádobce.

Čerstvé mateřské mléko bez pasterace (pouze matka pro vlastní dítě) musí být skladováno při teplotě + 4°C a spotřebováno do 24 hodin. V ostatních případech musí být mateřské mléko vždy pasterováno. Pasterované mateřské mléko musí být skladováno při teplotě + 4°C a spotřebováno do 48 hodin. Pasterace musí probíhat při teplotě nejméně + 62,5°C po dobu 30 minut, potom se

mléko bez prodlení ochladí na teplotu + 4°C. Takto ošetřené mléko musí být označeno datem pasterace a datem spotřeby.

4.3.2.10 Tkáně

Speciální příprava podle druhu tkáně a požadavku vyšetřovaných analytů.

4.3.2.11 Obecné zásady pro transport a skladování biologického materiálu

Každý biologický materiál je nutno považovat za potenciálně infekční.

Žádanky ani vnější strana zkumavky (odběrového systému) nesmí být kontaminovány biologickým materiálem.

Vzorky od pacientů s přenosnými virovými onemocněními nebo multirezistentní nozokomiální nákazou mají být viditelně označeny.

Vzorky jsou přepravovány v uzavřených zkumavkách, které jsou vloženy do stojánku nebo přepravního kontejneru tak, aby během přepravy vzorků do laboratoře nemohlo dojít k rozlítí, potřísnění biologickým materiálem nebo jinému znehodnocení vzorku. Vnitřní prostor transportních boxů musí být pravidelně dezinfikován. Materiály použité při odběru se likvidují podle předpisů jako infekční materiál.

Skladování biologického materiálu před transportem do laboratoře

Po odebrání vzorků a jejich řádném označení jsou odběrové nádoby skladovány tak, aby byly dodrženy podmínky preanalytické fáze, které jsou určeny typem požadovaných vyšetření.

4.3.2.12 Chyby při odběru, skladování a transportu biologického materiálu

- Nevhodné odběrové nádoby, zkumavky
- Zkumavky s biologickým materiálem nebyly dostatečně označeny
- Zkumavky s biologickým materiálem byly tímto materiálem potřísněny
- Prodloužení doby mezi odběrem a dodáním do laboratoře
- Biologický materiál byl vystaven přímému slunečnímu světlu, teplu nebo mrazu [84]

4.4 Zpracování biologického materiálu před HPLC analýzou

4.4.1 Příprava vzorku k analýze

Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze biologického materiálu. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení - a to jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Volbou vhodné metody přípravy vzorku se tedy rozhoduje nejenom o přesnosti stanovení dané látky (analytu), ale vůbec o možnosti jejího určení. Při analýze biologických matricí se prakticky v žádném případě nelze vyhnout aplikaci některé z metod přípravy vzorků. V mnoha případech je jich třeba použít i několik.

Celý postup lze modelově chápat jako soubor jednotlivých operací, které se volí podle určitých požadavků, jako jsou např. komplexnost vzorku, množství sledovaného analytu s důrazem na množství jiných látek a jejich vlastnosti. Některé využívané postupy se zdají jako triviální. Je třeba si ale uvědomit požadavky praxe, kdy je např. nutno v klinické analýze nakládat se značným množstvím vzorků, které musí být zpracovány v relativně krátkém čase. V tomto ohledu je nutno vzít navíc v úvahu požadavky na automatizaci a přesnost z pohledu správné laboratorní praxe (Good Laboratory Practise - GLP).

Systémově lze operace přípravy vzorků rozdělit do třech kategorií:

1. Uvolnění látek z biologické matrice
2. Odstranění endogenních látek
3. Zvýšení selektivity a citlivosti [85]

4.4.1.1 Předúprava vzorku

4.4.1.1.1 Homogenizace

Homogenizace vzorku se uskutečňuje ručně nebo v laboratorních homogenizátorech. Před homogenizací je vhodné upravit velikost částic vzorku na jednotnou velikost roztíráním nebo mletím [86].

4.4.1.1.2 Lyofilizace

Lyofilizace - sušení vymrazováním je nejšetrnější metodou přípravy suchých látek. Při sušení vymrazováním se využívá fyzikálního jevu sublimace ledu, t.j. bezprostředního přímého přechodu

z pevné fáze do fáze plynné. Při vysušování se vloží připravená látka ve zmrzlém stavu do vakuové komory nebo do prostoru s vakuovou komorou spojeného. Sublimací ledu za vakua se uvolněná vodní pára zachytává namrzáním na ledovém kondenzátoru vychlazeném na velmi nízkou teplotu, označovaném také jako „čerpadlo vodních par“. Z toho vyplývá, že úkolem vakuového čerpadla je odčerpání vzduchu z vakuové komory nebo připojeného prostoru nikoliv však odčerpání uvolněných vodních par. Aby se sublimace ledu rozeběhla, musí mu být přivedena energie. Dosahuje se toho při sušení v zábrusových baňkách vně vakuové komory účinkem mnohem vyšší teploty okolí (přímé kontaktní teplo), při sušení na nevyhříváných plošinách uvnitř vakuové komory účinkem zářivého tepla a na vyhříváných plošinách přímým přechodem tepla. Jestliže je vysušovaná látka úplně zbavena „volné“, t.j. veškeré chemicky nevázané vody, může se za vysokého vakua docílit i oddělení krystalické vody. Tato část procesu vysušování látky se označuje jako dosušování [87].

4.4.1.1.3 Deproteinace/precipitace

Deproteinace je cílené odstranění proteinů ze vzorku. Obvykle bývá výchozím bodem při přípravě biologického vzorku. Vzorek je smíchán s precipitačním činidlem (obvykle 1 : 1), následuje promíchání a centrifugace, popř. dále filtrace. V některých případech lze vzorek ihned nastříknout do HPLC systému. Nevýhodou této jednoduché přípravy vzorku je jeho naředění. V případě nutnosti zakoncentrování analytu je nutné filtrát odpařit a opět rozpustit v menším množství mobilní fáze. Hlavními výhodami této metody je její jednoduchost, univerzálnost, možnost automatizace např. použitím mikrotitračních destiček. Při detekci látek hmotnostní spektrometrií (MS/MS) ovšem dochází vlivem matrice k poklesu účinnosti ionizačního procesu. To může vést ke snížení reprodukovatelnosti, účinnosti a ke zhoršení limitu detekce [88].

4.4.1.2 Extrakce

Princip extrakce: Jedná se o separační (dělící) proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky (analyty) se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení.

Cíl extrakce: Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušících látek od analytu.

Klasifikace extrakce:

a) podle zúčastněných fází

1. **Plyn - kapalina** (GLE, gas - liquid extraction) - extrakce těžkých látek plynem z kapaliny. Používá se v plynové chromatografii pro nakoncentrování těžkých složek vzorku.
2. **Kapalina - kapalina** (LLE, liquid - liquid extraction) - z analytického hlediska nejdůležitější, dnes již rychle vytlačována extrakcemi na tuhé fázi (SPE, solid - phase extraction)
3. **Tuhá fáze - kapalina** (SLE, solid - liquid extraction, selektivní rozpouštění, loužení) - používá se velmi často v biologii, biochemii, organické a anorganické chemii. Získávají se takto např. alkaloidy, hormony a barviva. Tuhé organické materiály se za tepla extrahují organickými rozpouštědly, z tavenin se horkou vodou získávají rozpustné anorganické soli.

b) podle způsobu provedení

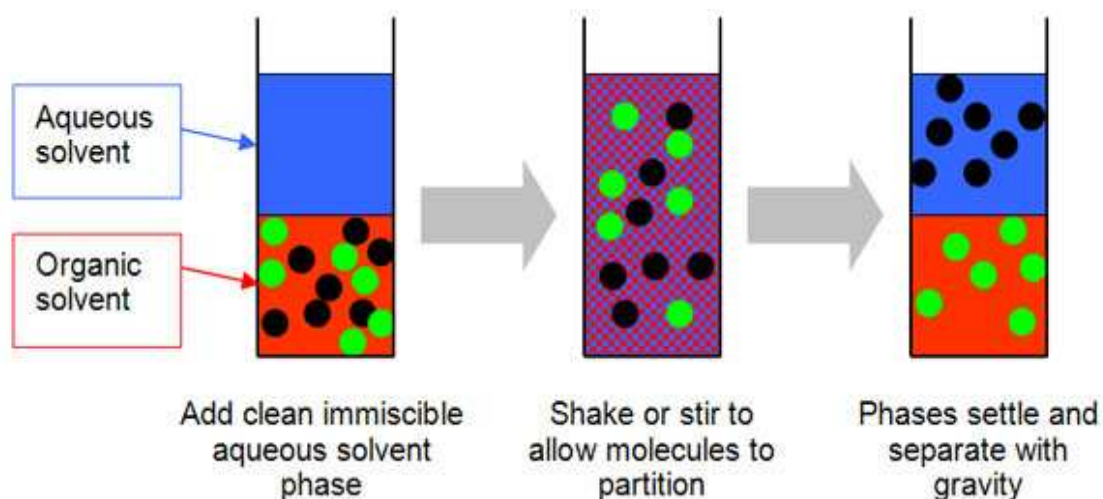
1. **Jednostupňová** - dochází k ustavení jedné rovnováhy mezi fázemi. Nejběžnějším případem je roztřepání v dělicí nálevce.
2. **Mnohostupňová** - proces ustavení rovnováhy se mnohokrát opakuje v oddělených krocích. Příkladem je několikanásobné roztřepávání v dělicí nálevce.
3. **Kontinuální** - fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém styku. Příkladem je extrakce v Soxhletově extraktoru či extraktorech na extrakci kapaliny kapalinou [89].

4.4.1.2.1 *Extrakce do kapaliny/Extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extrakce, LLE)*

Extrakce do kapaliny je technika využívající separace analytů od nečistot ve vzorku matrice mezi dvě nemísitelné kapaliny (vodná a organická fáze). Distribuce analytu do organického rozpouštědla závisí na jeho ionizaci. Proto je v některých případech nutno upravit pH vzorku, aby byl analyt neionizován a snadno přešel do organické fáze. Po vytřepání analytu do organické fáze obvykle následuje centrifugace, oddělení supernatantu (organická fáze), její odpaření a rekonstituce do mobilní fáze.

Hlavními výhodami LLE je široké uplatnění v bioanalýze, finanční nenáročnost, lze získat velmi čisté extrakty s dobrou selektivitou pro cílové analyty. Při LLE extrakci dochází také k odstranění anorganických solí, které jsou v běžně používaných organických rozpouštědlech nerozpustné.

Nevýhodou LLE je její nešetrnost k životnímu prostředí v porovnání s ostatními technikami (větší spotřeba organických rozpouštědel, tvorba emulzí) [88].



Obr. 36 Princip extrakce do kapaliny [89]

4.4.1.2.2 Extrakce na jedné kapce (Single-drop Extraction SDE)

V roce 1996 byla poprvé popsána mikroextrakce kapalina - kapalina. Při miniaturizaci extrakce kapalina - kapalina jsou používány systémy využívající kapky rozpouštědla na konci teflonového vlákna nebo nověji na špičce nástřikové jehly chromatografického systému (typicky plynového chromatografu).

Postup extrakce je následující. Do injekční (nástřikové) stříkačky jsou nataženy 2 μl hexanu, jehla je ponořena do vzorkové nádoby s vodným roztokem a poté je pístem stříkačky vytlačena 2 μl kapka rozpouštědla do vzorku. Po zhruba 15 minutách působení (extrahování) kapkou ve vodném roztoku je kapka opět pístem vtažena zpět, jehla je vytažena ze vzorkové nádoby a posléze je proveden normální nástřik do chromatografického přístroje. Celý proces extrakce musí být přesně opakován, kritickým faktorem opakovatelnosti (reprodukovatelnosti) jsou teplota a čas extrakce. Tyto faktory musí být stále stejné, vždyť např. rovnováhy distribuce není dosaženo ani po 45 minutách, ale nastává např. i zmenšování objemu kapky vlivem postupného rozpouštění organického rozpouštědla (během extrakčního procesu se jedná o ztrátu asi 10 - 15%). Se vzrůstem teploty extrakce roste množství extrahovaných látek [90].

4.4.1.2.3 Extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází

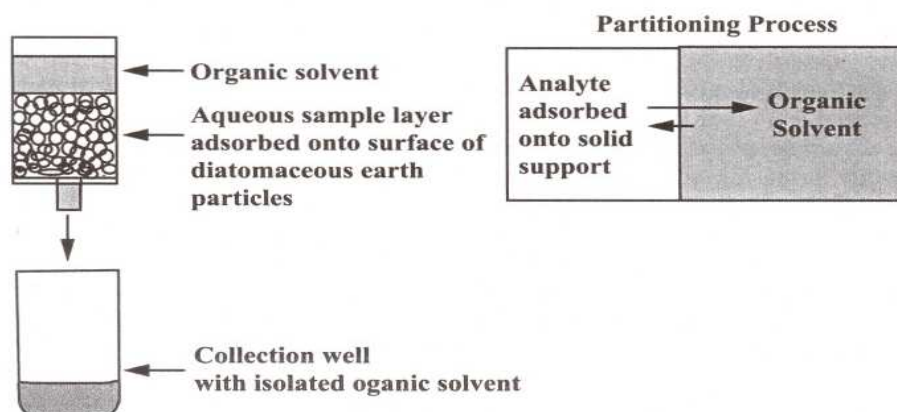
Centrifugace a třepání u běžné LLE může být nahrazena tzv. křemelinovými částicemi (rozsivková zemina). Vysoký povrch těchto částic usnadňuje tvorbu interakcí mezi vodným vzorkem a organickým rozpouštědlem (bez tvorby emulzí). Tyto křemelinové částice se v podstatě chovají jako vodná fáze při tradiční extrakci do kapaliny.



Obr. 37 Rozsivková zemina (Diatomaceous Earth) - diatomit je hornina složená z mikroskopických křemitých schránek. Je-li nezpevněná, nazývá se často křemelina neboli rozsivková zemina, zpevněná se podle vzhledu nazývá též diatomová břidlice nebo rohovec. Křemelina je cennou surovinou. Diatomity vznikly usazením křemitých schránek řas rozsivek. Jsou sladkovodního i mořského původu. Vznikaly již od třetihor [91].

Postup

Připraví se směs vzorku (plazma), interního standardu a pufru (úprava pH). Tato směs se nanese na suché křemelinové částice (nemusí se aktivovat ani kondicionovat jako při SPE) umístěné v mikrotitrační destičce. Tato směs je ponechána 3 - 5 minut, kapalina protéká pouze gravitační silou. Analyt ve vodném roztoku je nyní nanesen na obrovský povrch částic (vstupuje do nich). Hydrofobní filtr izoluje vodnou fázi na povrchu a zabraňuje jejímu přechodu do sběrných zkumavek ve spodní části. Následně je přidáno organické rozpouštědlo, které snadno prochází gravitační silou skrz částice a vymývá nasorbovaný analyt do připravených zkumavek. Důležitou roli pro přechod analytu do organického rozpouštědla hraje také úprava pH. Dále následuje, stejně jako u LLE, odpaření organického vzorku a rekonstituce analytu do mobilní fáze [88]. Hlavní výhodou extrakce do kapaliny podpořené pevnou fází je možnost její automatizace bez nutnosti centrifugace a vytřepání vzorku.



4.4.1.2.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce využívá k izolaci analytu unikátních vlastností superkritické fluidní tekutiny vzniklé za určitých podmínek z CO_2 . Tato tekutina se chová jako plyn a kapalina a zároveň má nepolární charakter. Proto se využívá k izolacím nepolárních sloučenin. Díky podobnosti s plynem snáze proniká do struktury matrice a vlastnosti kapalin využívá ve své schopnosti rozpouštět nepolární sloučeniny [92].

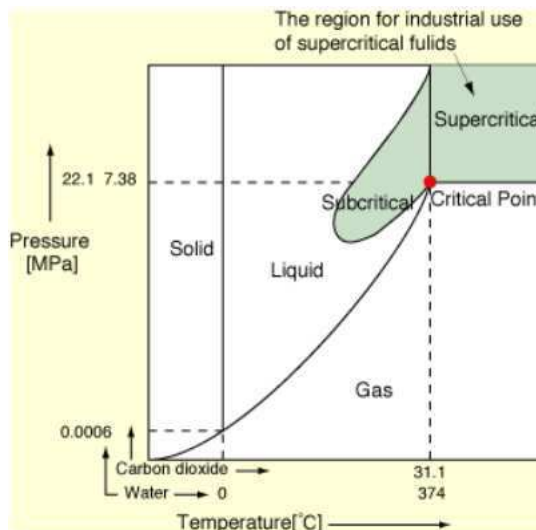
Její hlavní výhodou je, že namísto organických rozpouštědel využívá netoxický a levný oxid uhličitý za superkritických podmínek. Rozpustnost analytu v superkritické fázi lze snadno upravovat volbou tlaku a teploty [93].

Superkritické kapaliny (SCF) mohou být definovány jako sloučeniny, které jsou ve stavu nad jejich kritickým tlakem (P_c) a nad jejich kritickou teplotou (T_c). Jednoduše se na proces můžeme dívat jako na spojení hustot kapalné a plynné fáze. Jestliže teplota kapaliny vzroste, hustota se sníží. Pokud tlak plynné fáze vzroste, hustota se zvýší. V kritickém bodě se hustoty stávají rovnocenné. Obecně mají superkritické kapaliny hustotu blízkou kapalinám a viskozitu podobnou plynům.

Mohou difundovat skrz pevné látky jako plyny a rozpouštět materiály jako kapalina. Blízko ke kritickému bodu způsobí i malé změny tlaku nebo teploty velké změny v hustotě, což má za následek změnu mnoha vlastností. Se vzrůstajícím tlakem se mohou při kritické teplotě tvořit pevné látky, pro mnoho materiálů je však odpovídající tlak velmi vysoký, např. 570 MPa pro CO_2 . Kritická teplota a tlak se materiál od materiálu velmi liší.

	hustota (kg/m ³)	viskozita (cP)	difusivita (mm ² /s)
plyny	1	0,1	1 - 10
superkritické kapaliny	100 - 1000	0,05 - 0,1	0,01 - 0,1
kapaliny	1000	0,5 - 1	0,001

Tab. 12 Srovnání hustoty, viskozity a schopnosti difundovat pro typické plyny, kapaliny a superkritické kapaliny [93]



Obr. 39 Fázový diagram CO₂ a H₂O [93]

Superkritická fluidní extrakce (SFE) je proces separace jedné složky od ostatních s použitím superkritické látky jako extrakčního rozpouštědla. Extrahuje se obvykle z pevného povrchu, ale může to být i z kapaliny. SFE může být použita i k separaci vzorků pro analytické účely nebo k odstranění nežádoucích materiálů z produktu. Oxid uhličitý je nejpoužívanější superkritická kapalina, někdy modifikovaná přísadkou malého množství jiného rozpouštědla, např. ethanolu či methanolu.

Rychlost extrakce a fázové separace je u SFE rychlejší než u běžné extrakce.

Výhody:

- rozpustnost může být ovlivněna tlakem či teplotou
- superfluidní kapaliny jsou snadno obnovitelné a odstranitelné z extraktu díky jejich těkavosti
- nejsou toxické
- vysoko vroucí složky jsou extrahovány za poměrně nízké teploty
- separace, kterou není možné provést za běžných podmínek, může být efektivní
- termicky labilní sloučeniny mohou být extrahovány s minimálním rozkladem

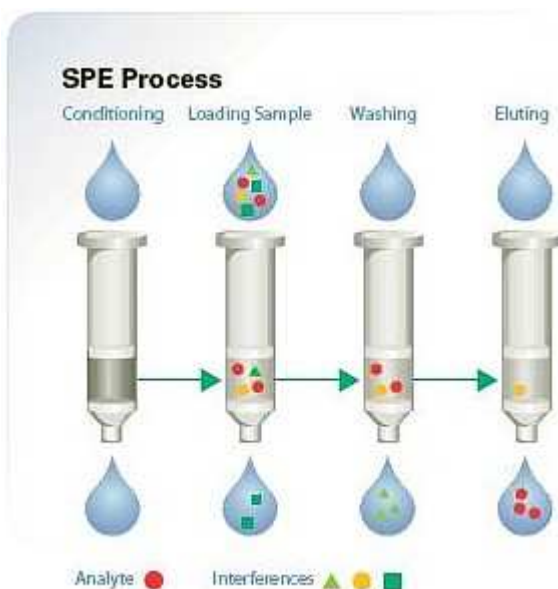
Nevýhody:

- je požadován vysoký tlak
- vysoké náklady na zařízení [92]

4.4.1.2.5 Extrakce na pevnou fázi (solid-phase extraction SPE)

Při SPE je analyt selektivně sorbován na pevnou fázi. Před nanesením analytu je důležitá kondicionace SPE sorbentu.

1. Methanolem - aktivace sorbentu
2. Následně vodou - vytvoření podobného prostředí vzorku



Obr. 40 Schématické znázornění extrakce na pevnou fázi [94]

SPE interakce:

Během SPE extrakce jsou uplatňovány následující vazebné interakce analyt - sorbent:

- hydrofobní interakce - disperzní síly (van der Waalsovy síly)
- polární interakce - vodíková vazba, dipól - dipól
- iontové (elektrostatické) interakce [95]

Jako SPE sorbenty mohou být použity kolonky, mikrotitrační destičky, popřípadě extrakční disky.

SPE KOLONKY

Mají tvar injekční stříkačky bez pohyblivého pístu. Často bývají specifikovány následujícími vlastnostmi:

- typ pevné fáze
- objem kolonky [0,4 - 15 ml]
- maximální průtoková rychlost
- kapacita [1 - 500 (2800) mg]
- minimální eluční objem [10 µl - 50 ml]
- materiál kolonky [plast, sklo]

MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

Sorbent je možno také zakoupit v podobě mikrotitračních destiček, které umožňují miniaturizace běžné SPE.

Výhody:

- menší spotřeba vzorku a rozpouštědel
- možnost zpracovat velké série vzorků za krátký čas (96 pozic)

EXTRAKČNÍ DISKY

Jedná se o moderní formu SPE. SPE disky se skládají z tenké teflonové membrány a příslušného modifikovaného sorbentu (až 90 váh. %), mají velkou hustotu, proto je nutno při eluci použít vakuum, mají předřazen sedmivrstevný filtr.

Výhody:

- není omezena průtoková rychlost
- nakoncentrování vzorku ve velmi úzké zóně membrány
- k eluci stačí řádově µl rozpouštědla, a proto odpadá odpařování nadbytečného rozpouštědla před chromatografickou analýzou vzorku [96]

Výhody SPE:

- velmi selektivní metoda
- vhodná pro celou škálu maticí

- možnost zakoncentrování vzorku
- dobrá výtěžnost a reprodukovatelnost
- malé objemy vzorků
- možnost automatizace
- netvoří se emulze jako u LLE
- velký výběr SPE fází
- velký výběr tvarů a velikostí SPE kolonek, disků atd.

Nevýhody SPE:

- nutná určitá zkušenost
- časté ucpávání SPE kolonky - obvykle nutná centrifugace a filtrace před nanesením
- bez použití miniaturizace (SPE destičky) - časově náročné
- vysoká cena



Obr. 41 Vakuový manifold pro SPE kolonky (Teknokroma, Barcelona, Španělsko)



Obr. 42 Vakuový manifold pro SPE mikrotitrační destičky (Fisher Scientific, USA)

4.4.1.2.5.1 Sorbenty pro SPE

4.4.1.2.5.1.1 Silikové sorbenty

Silikové sorbenty jsou hlavním typem částicových sorbentů, jedná se o amfiprotní, porézní materiál, obsahující polysiloxanové (Si-O-Si) a silanolové (Si-OH) skupiny. Přítomnost těchto skupin způsobuje, že povrch částic je lehce kyselý a umožňuje absorpci polárních látek. Obvykle bývají na tyto skupiny navázány jiné funkční skupiny: oktadecyl (C18), oktyl (C8), butyl (C4), ethyl (C2) a methyl (C1). Stejně jako při výrobě reverzních stacionárních fází pro HPLC je i zde odstraněn vliv reziduálních silanolových skupin „endcappingem“.

velikost částic (μm)	8 - 12, 12 - 20, 40 - 60
povrch (m ² /g)	350 - 450
velikost pórů (Å)	60 - 80
nožství uhlíku (%)	C18 : 18, C8 : 12, C2 : 6

Tab. 13 Typické specifikace pro silikové částicové sorbenty pro SPE, někteří výrobci uvádí také tvar částic a způsob přípravy vzorku

4.4.1.2.5.1.2 Polymerní sorbenty

Byly vyvinuty jako alternativa pro částicové polymerní sorbenty. Prvním polymerním sorbentem pro SPE byl polystyren-divinylbenzen. Tento polymer lze dále modifikovat fází C18. V roce 1996 byl vyvinut sorbent Oasis HLB (Waters) - jedná se o syntetický polymer divinylbenzenu a N-vinylpyrolidinu. Označení kolonek HLB (Hydrophilic-lipophilic-balance) popisuje vliv aktivace sorbentu a tím možnost nastavení hydrofobicity vzhledem k lipofilnímu analytu. Principem je změna pH při aktivaci kolonky [97].

Hlavní výhody polymerního sorbentu jsou:

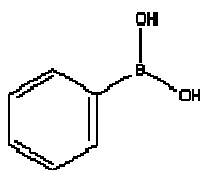
- 100% chemické složení (chemicky syntetizováno)
- stabilita v pH 0 - 14
- předpokládané reakce s analytem (nejsou silanolové skupiny)
- větší kapacita sorbentu/gram než silika (granulovitá, pórovitá forma oxidu křemičitého)

4.4.1.2.5.1.3 Duální zónové sorbenty

Duální zónové sorbenty jsou tvořeny částicemi se dvěma rozdílnými sorbenty. Vnější sorbent je hydrofilní, neabsorpční ligand odpuzující proteiny a vnitřní povrch je tvořen póry s navázanými řetězci C8, C18 atd. Proteiny a ostatní velké molekuly nemohou vstoupit do pórů a jsou vymyty do odpadní zkušavky během promývacího kroku. Duální zónové sorbenty mohou obsahovat kromě C18 a C8 také iontově selektivní fáze.

4.4.1.2.5.1.4 Kyselina fenylboritá

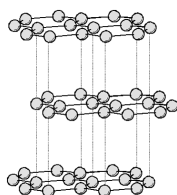
Navázáním kyseliny fenylborité na silikové polymerní sorbenty vznikne fáze s velmi dobrou selektivitou, v tomto případě ve slabě zásaditém pH (8, 7), zejména pro katecholaminy (adrenalin, noradrenalin a dopamin). Po navázání katecholaminů na sorbent a vymytí balastů se katecholaminy eluují okyselením elučního činidla.



Obr. 43 Kyselina fenylboritá

4.4.1.2.5.1.5 Grafitický uhlík

Stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku byly vyvinuty jako alternativní reverzní SPE fáze. Příkladem jejich použití je extrakce β -blokátorů z plazmy použitím směsi chloroform/methanol (80 : 20) jako elučního činidla. Grafitický uhlík neobsahuje silanolové skupiny a umožňuje extrakci hydrofobních analytů.



Obr. 44 Grafít

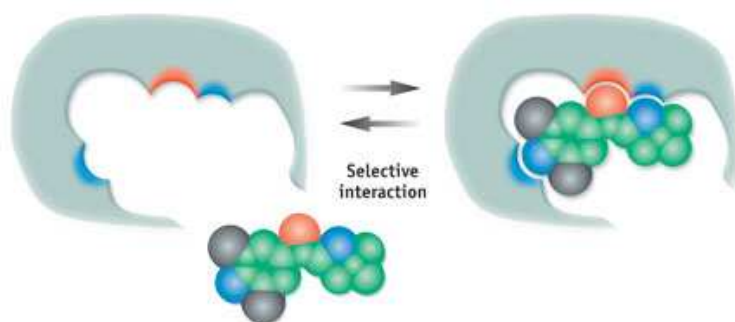
4.4.1.2.5.1.6 Silikalit

Molekulární síto zvané silikalit (mikroporézní hlinito-křemičitý materiál) bylo použito pro SPE extrakci organických analytů z vodných vzorků. Toto molekulární síto je unikátní složitý systém kanálů schopný zadržet organické látky pomocí hydrofobních mechanismů. Lze jej využít také na extrakci mnoha nízkomolekulárních hydrofobních látek.

4.4.1.2.5.1.7 MIP molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymers)

Potenciálně nové vysoce selektivní SPE fáze určené pro extrakci jedné nebo několika strukturně podobných látek. Principem je navázání analytu do stacionární fáze jako klíče do zámku. Vtištěné polymery jsou vhodné především pro obtížné separace, jako jsou například chirální separace léčiv.

[88]



Obr. 45 Molekulárně vtištěné polymery - MIP [98]

4.4.1.2.6 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně - desorpční technika zakoncentrování analytu, která nevyžaduje rozpouštědla nebo komplikované aparatury. Principem je expozice malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Analyty jsou sorbovány na SPME vlákne, dokud není dosaženo rovnováhy. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovacího koeficientu. Metoda je použitelná ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií. Dává lineární výsledky v širokém koncentračním rozsahu. Volbou vhodného typu vlákna se dosáhne reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů. Doporučuje se zachovávat shodné doby vzorkování a další extrakční parametry - hodnotu pH, iontovou sílu apod. [88].

Optimalizace SPME

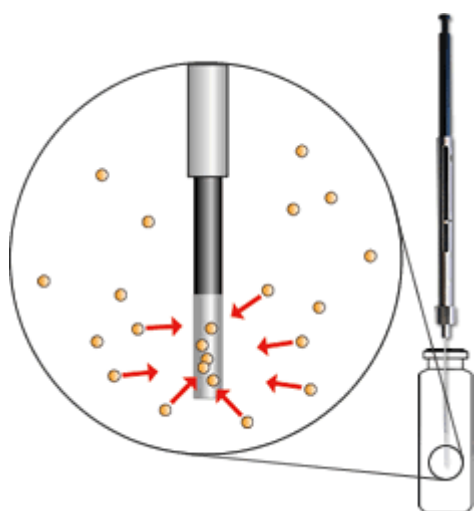
Shodnost výsledků a spolehlivost detekce při nízkých koncentracích je ovlivněna celou řadou faktorů, např. polaritou a tloušťkou vrstvy polymeru na povrchu vlákna, způsobem vzorkování, hodnotou pH, iontovou silou roztoku, teplotou vzorku, mícháním apod. U techniky SPME není nutná ani úplná extrakce analytu, resp. rovnováha. Důležité je ale, dodržovat shodnou délku doby vzorkování, teplotu vzorku a hloubku ponoru vlákna. Pro dosažení reprodukovatelných výsledků je důležitá volba vhodného vlákna, která závisí především na vlastnostech analytů. Mezi faktory, které mají největší vliv na extrakční proces, patří molekulová hmotnost a charakter molekuly, polarita a přítomnost funkčních skupin, očekávaný detekční limit a lineární rozsah. Volba vlákna vychází především z jeho polaritativy a očekávaného extrakčního mechanismu.

Účinná extrakce a následná desorpce ze SPME vlákna závisí na:

- molekulové hmotnosti
- tvaru molekuly
- bodu varu a tenzi par analytu

- polaritě analytu a vlákna
- funkčních skupinách v molekule analytu
- koncentračním rozsahu pro stanovení analytu a typu detektoru

Na základě známého pravidla, že podobné se rozpouští v podobném, je třeba vybírat i nejvhodnější vlákno. Nepolární vlákna by se měla používat pro extrakci nepolárních analytů a naopak. Polární látky jsou dobře rozpustné ve vodě. Jejich extrakce je z tohoto rozpouštědla obtížná. Kromě použití polárního vlákna se ještě doporučuje úprava vzorku, např. přidání solí, míchání, zahřívání a nastavení pH tak, aby se celý proces optimalizoval atd. [99].



Obr. 46 Princip SPME [100]



Obr. 47 Některé typy SPME vláken (Labicom, Olomouc, Česká republika)

4.4.1.2.6.1 On-line SPE

Proces SPE je přímo spojen s analytickou metodou, nejčastěji s HPLC.

Výhody:

- neprovádí se předřazená SPE
- přímé dávkování vzorků tělních tekutin
- plně automatizovaný provoz
- bezpečná manipulace s infekčními materiály
- zvýšená přesnost a citlivost
- zvýšená produktivita a nižší náklady připadající na jeden vzorek [89]

4.4.1.3 Centrifugační metody v bioanalytice

Centrifugační metody jsou jednou z nejčastějších metod separace a analýzy částic biologické povahy. Na rozdíl od řady dalších umožňují tyto metody provádět separace široké škály velikostí částic od celých buněk, organel, fragmentu buněčných membrán až po izolované proteiny a

nukleové kyseliny. Princip spočívá v sedimentaci částic v odstředivém poli. Rychlost sedimentace a konečný rovnovážný stav je ovlivněn řadou faktorů jako jsou velikost částic, velikost odstředivé síly, viskozita roztoku, hustota částic aj. Tyto vlivy je možné částečně popsat Stokesovým zákonem a Svedbergovou rovnicí. Existuje několik typu centrifugačních technik, které se liší použitým rotorem (úhlový, výkyvný, vertikální), hustotním profilem roztoku (konstantní, gradientový) a způsobem separace látek (diferenciální, izopyknická a zonální). Z hlediska využití jsou pak tyto metody využívány jako tzv. preparativní, popř. analytické [49].

4.5 Analyty

4.5.1 Retinoidy: Vitamin A (retinol), estery retinolu, kyselina retinová



4.5.1.1 Historie

Samotný název "vitamin" pochází z roku 1911 od polského chemika Kazimíra Funka, ovšem tento název je chybný. Vznikl totiž spojením dvou slov: označením nezbytnosti těchto látek pro život (život = vita) a označením dusíkatých látek (amin). Funk zde vycházel z předpokladu, že tyto pro život nezbytné sloučeniny jsou dusíkové povahy. Tento fakt totiž obecně pro všechny vitaminy neplatí. Přesto se název vitaminy ujal, i když se v současnosti čím dál více používá triviálních názvů, např. místo vitamin H použijete spíše označení biotin apod.



Obr. 48 Kazimierz Funk 1884-1967



Obr. 49 Sir Frederick Gowland Hopkins 1861-1947

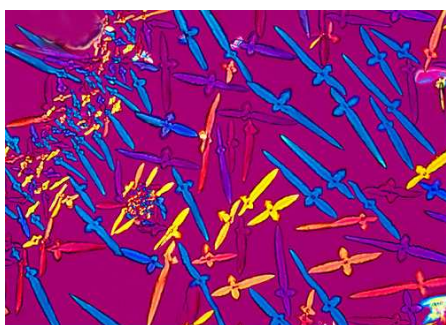
Historie objevení vitaminů sahá o několik tisíciletí zpět, ovšem skutečné vědecké studium započalo až s rozvojem chemie v 19. a na začátku 20. století a vyvrcholilo poznáním jednotlivých

přídavných potravinových faktorů, které byly pojmenovány podle abecedy v tom pořadí, v jakém byly objeveny. Ovšem projevy nedostatku těchto látek byly známy mnohem a mnohem dříve. Šeroslepost, porucha vidění za šera, způsobovaná nedostatkem v té době samozřejmě neznámého vitamínu A, byla popsána už ve starém Egyptě v roce 1600 př.n.l., ale zkušenosti měli i staří Číňané, kteří léčili podáváním jater zvířat, popř. inhalováním par vystupujících z vařících se jater. Základ k objevu vitamínu A (ale i ostatních vitaminů) položil v roce 1906 anglický fyziolog Sir Frederick Gowland Hopkins z University v Cambridge [101].

4.5.1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti retinoidů

All-trans retinol je primární alkohol s pěti konjugovanými vazbami, které mají acyklickou trans konfiguraci.

Látka tvoří světle žluté jehlice, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%, etheru, petroletheru a mastných olejích. Retinoidy vykazují v ultrafialovém světle při 365 nm intenzivní zelenavou fluorescenci. Roztok v 2-propanolu vykazuje v ultrafialovém světle absorpční spektrum s maximem 325 nm.



Obr. 50 Jehlice vitamínu A, fotografie byla pořízena po krystalizaci látky (za 2 - 3 měsíce) polarizačním mikroskopem se zvětšením 600x. Barvy jsou výsledkem interference světla podobně jako přes olejovou nebo mýdlovou bublinu [102].

Vitamin A se všeobecně používá ve formě esterů jako acetát, propionát nebo palmitát, které se dodávají jako olejové koncentrované roztoky, vodné disperze nebo ve formě prášku. Účinnost vitamínu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách U.I. nebo I.U. 1 U.I. vitamínu A odpovídá účinnosti 0,344 μg all-trans retinol acetátu. Účinnost ostatních sloučenin vitamínu A se vypočítá stechiometricky tak, že 1 U.I. vitamínu A odpovídá 0,300 μg all-trans retinolu, 0,359 μg all-trans retinol propionátu, 0,550 μg all-trans retinol palmitátu [59].

Údaje o biologické účinnosti vitamínu A se uvádějí také v retinolových ekvivalentech (RE), přičemž 1 I.U. = 0,3 RE [103].

4.5.1.2.1 Kyselina retinová

Kyselina retinová je žlutý až světle oranžový prášek s charakteristickým zápachem, nerozpustný ve vodě, s absorpčním maximem 351 nm (methanol). Nejdůležitější formy jsou all-trans, 13-cis a 9-cis retinová kyselina [104].

4.5.1.2.2 Estery retinolu

Estery retinolu jsou zásobní formou retinolu. Hlavními zástupci jsou retinyl palmitát a retinyl stearát. Retinyl palmitát je žlutý olej s absorpčním maximem 330 nm.

4.5.1.3 Metabolismus retinoidů

Vitamin A je přijímán v potravě přímo nebo ve formě provitaminu beta-karotenu, který poskytné hydrolýzou ve střevě dvě molekuly vitamínu A. V tenkém střevě se však vstřebává i samotný beta-karoten. Jeho dostatečné hladiny se užívá jako ukazatele neporušené absorpce lipidů.

Transport vitamínu A v krvi zajišťuje speciální bílkovina RBP (retinol binding protein). Aby nedocházelo ke ztrátám tohoto mikroproteinu s navázaným vitamínem A močí, váže se v plazmě na další bílkovinu - prealbumin [75].

Vstřebané beta-karotenoidy bývají oxidativně štěpeny beta-karotendioxygenázou. Toto štěpení využívá molekulární kyslík v přítomnosti žlučových solí a vytváří dvě molekuly retinylaldehydu (retinalu).

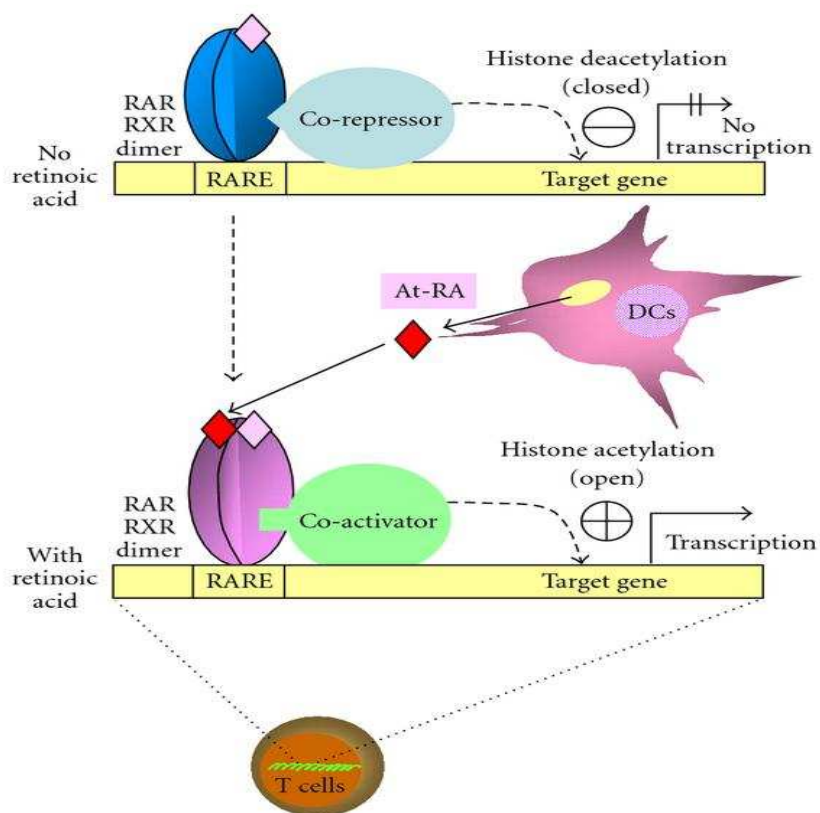
Ve střevní sliznici je retinal redukován na retinol enzymem retinal aldehydreduktazou, využívajícím NADPH. Pouze malá část retinalu je oxidována na kyselinu retinovou. Většina retinolu je esterifikována nasycenými mastnými kyselinami a inkorporována do chylomikronů v lymfě a ty pak vstupují do krevního oběhu. Jsou přeměněny na chylomikronové zbytky, které i s retinolem v nich obsaženým vychytávají játra. Karotenoidy se mohou některým z těchto procesů vyhnout a pronikat přímo do chylomikronů.

Vitamin A je v játrech ukládán do zásoby jako ester v lipocytech (perisinusoidálních hvězdicovitých buňkách) pravděpodobně ve formě lipoglykoproteinového komplexu. Pro transport do tkání je komplex hydrolyzován a retinol navázán na RPB.

Toxicita vitamínu A (hypervitaminoza A) se projeví po vyčerpání kapacity vazebných bílkovin - buňky jsou vystaveny působením nenařádaného retinolu. Tento jev může nastat při nadměrném užívání vitaminových preparátů s vitamínem A [105].

4.5.1.3.1 Biologická aktivita kyseliny retinové

Kyselina retinová se významně podílí na kontrole regulace genové exprese pro diferenciaci a morfogenezi mnoha druhů buněčných linií. V krvi je navázána na tzv. all-trans retinoic binding protein (CRABP), který zajišťuje její distribuci do tkání. Regulace genové exprese je podmíněna jadernými receptory RAR a RXR [106].



Obr. 52 Kontrola genové exprese kyselinou retinovou (RAR - RXR - receptory pro kyselinu retinovou). Pokud není kyselina retinová k dispozici, na receptory se naváže korepresor a uzavře cestu pro histon-acetyl deacetylázu, která aktivuje genovou expresi. Pokud je kyselina retinová přítomna, dochází k uvolnění korepresoru a aktivaci koaktivátoru, který uvolní histon acetyl-transferázu a dochází k transkripci genů [107].

4.5.1.4 Klinický význam retinoidů

4.5.1.4.1 Retinol

Vitamin A zasahuje do řady fyziologických pochodů v lidském těle. K základním funkcím patří ovlivňování metabolismu rodopsinu, tedy procesu vidění (prekurzor fotosenzitivních pigmentů oční sítnice), dále působení na diferenciaci a růst epitelových buněk (sliznice, kožní a krvetvorné buňky). Je nezbytný i pro udržení stability biologických membrán, pro diferenciaci a zrání

pohlavních buněk a pro vývoj plodu. Zasahuje rovněž do syntézy bílkovin, nukleových kyselin a lipoproteinů. Vitamin A má jen mírné antioxidační vlastnosti, proto je jeho preventivní efekt na incidenci nemocí, jejichž etiologie je spojena s volnými radikály, považován za minimální. Podstata jeho působení se koncentruje do oblasti tzv. zhášení (quenching) singletového molekulárního kyslíku ($O_2\cdot$). Tento metabolit, který není považován za volný radikál, vzniká fotochemickou reakcí, enzymaticky nebo při procesu peroxidace lipidů v membránách (fotoexcitace, chemiexcitace) a je velmi reaktivní oksylišující agent o vysoké energii.

Může reagovat s biomolekulami a tak způsobovat poškození tkání. Toto poškození může být zpomalené právě „zhášecí“ aktivitou vitaminu A, ostatních retinoidů a karotenoidů. Zhášení singletového kyslíku je umožněno schopností uvedených sloučenin absorbovat energii bez chemické změny, takže excitovaný ($O_2\cdot$) se vrátí do základního molekulárního stavu (O_2) bez poškození okolních tkání.

Aktivní forma vitaminu A, 11-cis retinal, je především nezbytná pro vidění (je součástí očního purpuru). Uvádí se [108], že normální adaptace očí na tmou je zajištěna při sérové koncentraci vitaminu A vyšší než $1,4 \mu\text{mol/l}$. Možná avitaminóza se vyvíjí pomalu, protože tělo čerpá ze svých zásob. Prvním příznakem hypovitaminózy je zpomalení přivykání na šero. Při větším nedostatku se ztrácí schopnost vidět za šera úplně. Pokud je nedostatek vitaminu A velký a dlouhodobý, může dojít až k úplnému oslepnutí. Toto je bohužel poměrně častou příčinou v rozvojových zemích především afrického kontinentu. Zhruba jedno procento Afričanů trpí slepotou, jejíž hlavní příčinou jsou katarakta, glaukom a právě trachom, infekční onemocnění, které může souviset i s nedostatkem vitaminu A. Existují důkazy, že xeroftalmie a trachom mohou mít jednoho ze společných jmenovatelů právě v hypovitaminóze tohoto substrátu [109, 110]. V této souvislosti se je třeba také zmínit o problematice zinku. Je známo, že nedostatek zinku může souviset se zhoršenou adaptací na tmou nebo noční slepotou, ale zvýšený příjem zinku adaptaci oka nezlepší nebo neobnoví, může pouze potencovat účinek vitaminu A. V tomto případě je nezbytné, aby bylo podávání zinku dlouhodobé, několikaleté. Oslepnutí postupně předchází suchost spojivek, poškození rohovky a zánět celého oka, což souvisí s další funkcí vitaminu A v organismu - pravidelnou obnovou epitelových tkání, růstem apod. [111]. Snížené hodnoty v séru nacházíme až po vyčerpání zásob vitaminu v játrech, způsobují je onemocnění spojená s deficitem vitaminů rozpustných v tucích (cystická fibróza pankreatu, deficit lipázy, infekční hepatitis, hypothyreóza, kwashiorkor, malabsorpce, proteinová malnutrice, Crohnova choroba, syndrom krátkého střeva, nefritida, atd.) [110].

Protože mají vysoké dávky retinol-palmitátu prokázané teratogenní účinky, musí ženy v plodném věku a zejména v těhotenství tato dávkovací omezení dodržovat, přičemž optimální přívod retinolu v těhotenství (doporučená denní dávka) je 2600 I.U. denně, v období kojení 4000 I.U. denně [103].

věk	vitamin A koncentrace v séru	
	muži	ženy
dospělí	1,05 - 2,27 $\mu\text{mol/l}$	0,83 - 1,75 $\mu\text{mol/l}$
novorozenci	1,22 - 2,60 $\mu\text{mol/l}$	
děti	1,05 - 2,80 $\mu\text{mol/l}$	

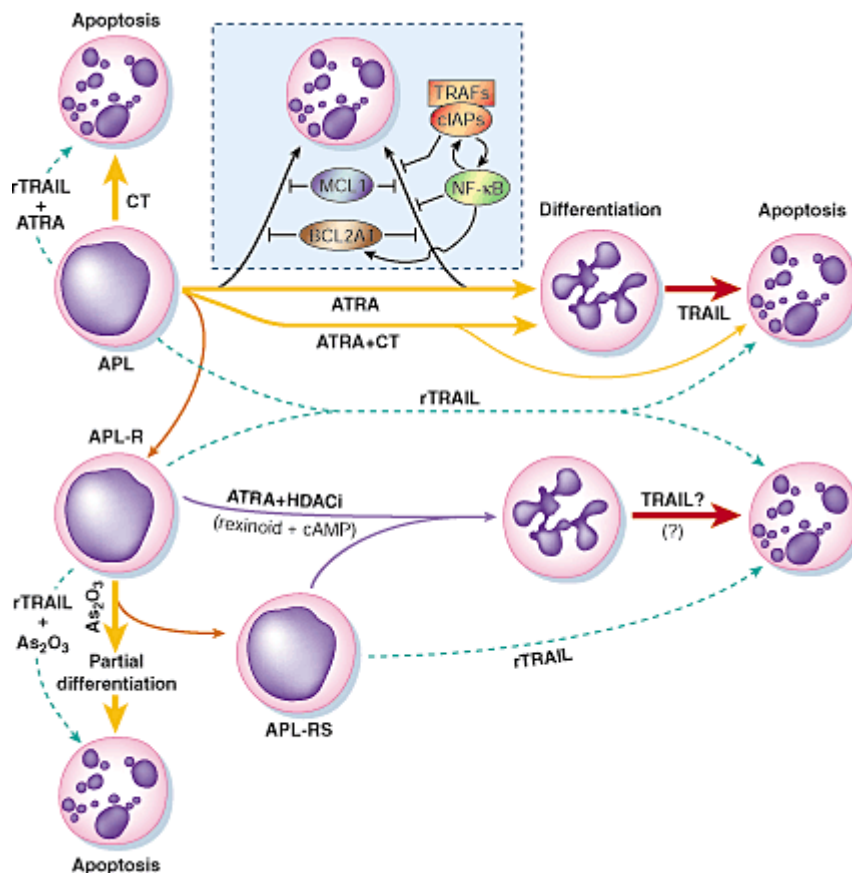
Tab. 14 Koncentrace vitamínu A v séru [112]

4.5.1.4.2 Obsah vitamínu A v potravinách

Vitamin A se vyskytuje pouze v živočišných potravinách. Provitaminy, prekurzory vitamínu A, pocházejí převážně z rostlinných materiálů a jsou v těle s různým stupněm účinnosti přeměňovány na vitamin A. Jejich aktivita je nižší než u retinolu. Nejlepším zdrojem vitamínu A je rybí tuk, vnitřnosti, máslo, sýry a mléko. Provitaminy (karotenoidy) jsou obsaženy v zelenině a ovoci (mrkev, paprika, rajčata, špenát, meruňky, broskve atd.) [111].

4.5.1.4.3 Klinický význam kyseliny retinové

Koncem 80. let 20. století se akutní promyeloidní leukémie (APL) stala nejlépe léčitelným onemocněním ve skupině akutních leukémií dospělých. Umožnil to objev diferenciacních účinků léčebných dávek kyseliny all-trans retinové (ATRA). Leukemické promyelocyty vlivem ATRA vyzrávají a podléhají apoptóze. ATRA také rychle upravuje iniciálně přítomnou koagulopatii, čímž zejména při včasném nasazení výrazně redukuje riziko život ohrožujícího krvácení. Tento lék dokáže sám o sobě navodit kompletní remisi promyelocytární leukémie, pokud však není kombinován s cytostatiky, choroba během několika měsíců relabuje. Zlatým standardem léčby APL je proto kombinace ATRA s antracykliny, nejčastěji s idarubicinem. Indukční léčba obvykle obsahuje tyto dva léky, přičemž ATRA je podávána až do dosažení hematologické remise (délka terapie někdy dosahuje i tří měsíců). Základem konzolidační terapie jsou antracykliny, podávané samostatně nebo v kombinaci s jinými cytostatiky či ATRA [113].



Obr. 53 Indukce diferenciaci a apoptózy v terapii APL

APL léčená chemoterapií (CT), kyselinou retinovou (ATRA), kombinací obou nebo As₂O₃ (žlutá linie). ATRA indukuje diferenciaci, As₂O₃ apoptózu. Léčba těmito látkami může být komplikována vývinem ATRA- nebo As₂O₃ -rezistentními chorobami (APL -R, APL - RS - oranžová linie). Buňky TRAIL vznikají diferenciací při APL (červená linie). Rekombinantní buňky TRAIL (rTRAIL), mohou být využity v terapii APL společně s ATRA a As₂O₃ (modrá přerušovaná linie) vyvoláním hlavního signálu pro apoptózu [114].

Nežádoucí účinky léčby

K poměrně častým a běžným komplikacím léčby ATRA patří horečky, bolesti hlavy, bolesti svalů a kostí, postižení sliznic (suchost) a elevace jaterních a renálních funkcí. Závažnou až život ohrožující komplikací léčby je tzv. diferenciacní syndrom (dříve ATRA syndrom, event. RAS = retinoic acid syndrome) projevující se horečkou, dušností, intersticiálními plicními infiltráty, nárůstem hmotnosti a edémy, v těžkých případech také renálním, hepatálním či multiorgánovým selháním vedoucím někdy až smrti nemocného [113].

4.5.1.4.4 Klinický význam esterů retinolu

Výsledkem správné morfologické a funkční integrity tenkého střeva je soulad mezi dvěma protichůdnými procesy. Na jedné straně je to maximálně efektivní proces absorpce živin a všech potřebných látek včetně specifických transportních mechanismů, na druhé straně potom vysoce účinná komplexní bariérová funkce bránící průniku bakterií, toxinů, antigenů a jiných toxických látek do vnitřního prostředí organismu. Permeabilitou, respektive propustností střeva, lze označit proces, při kterém látky pronikají mezibuněčnými prostory střevního epitelu neřízenou difúzí, jejich průnik závisí na propustnosti mezibuněčných prostor a na jejich koncentračním gradientu bez účasti specifického přenosového mechanismu. Porucha této střevní bariérové funkce může vést k průniku bakterií a jejich toxinů do systémového oběhu s nebezpečím vzniku sepse a možností rozvoje multiorgánového selhání [115].

Hlavní význam stanovení esterů retinolu je i monitorování stavu střevní sliznice po retinol absorpčním testu u pacientů léčených chemoterapií a radioterapií [116].

Současné studie ukazují, že přeměna retinolu na jeho estery je významně redukována v lidských nádorových buňkách [117].

Stanovení esterů retinolu má také velký klinický význam při monitoringu chronické intoxikace vitamínem A, kdy jsou sérové hladiny vitamínu A v normálu [118].

4.5.1.4.4.1 Vitamin A absorpční test

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

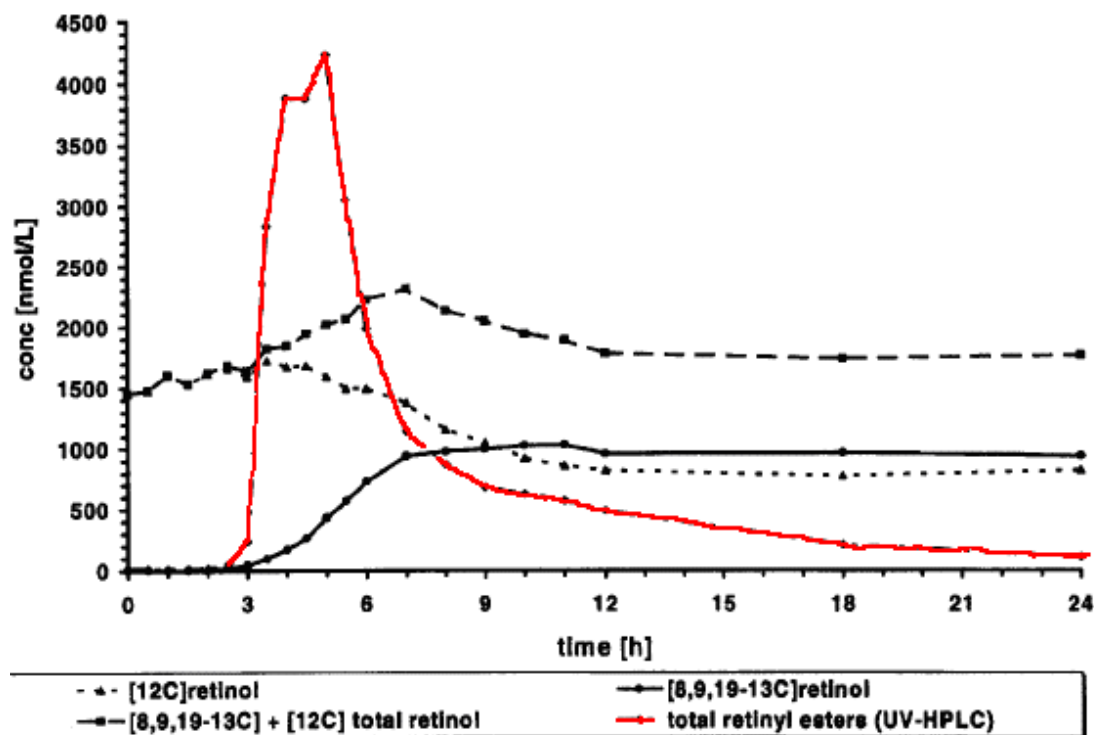
Klinicko-diagnostický proces v oblasti zažívacího ústrojí je založen na řadě specializovaných vyšetření, ke kterým patří zejména moderní zobrazovací metody (endoskopie, sonografie, RTG, CT, NMR) poskytující morfologický obraz orgánů. Nedílnou součástí diagnostiky však tvoří metody biochemické. Přínos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

Změny permeability sliznice tenkého střeva lze zjistit retinol absorpčním testem.

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

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

Obr. 54 zobrazuje hladiny retinolu a retinyl esterů po podání 105 $\mu\text{mol/l}$ (8, 9, 19 C) retinyl palmitátu u zdravých dobrovolníků. Významně zde dochází k vzestupu esterů retinolu (v tomto případě zastoupených retinyl palmitátem, retinyl stearátem a retinyl oleátem) [119]. Retinol absorpční test je často kombinován s testem LAMA.

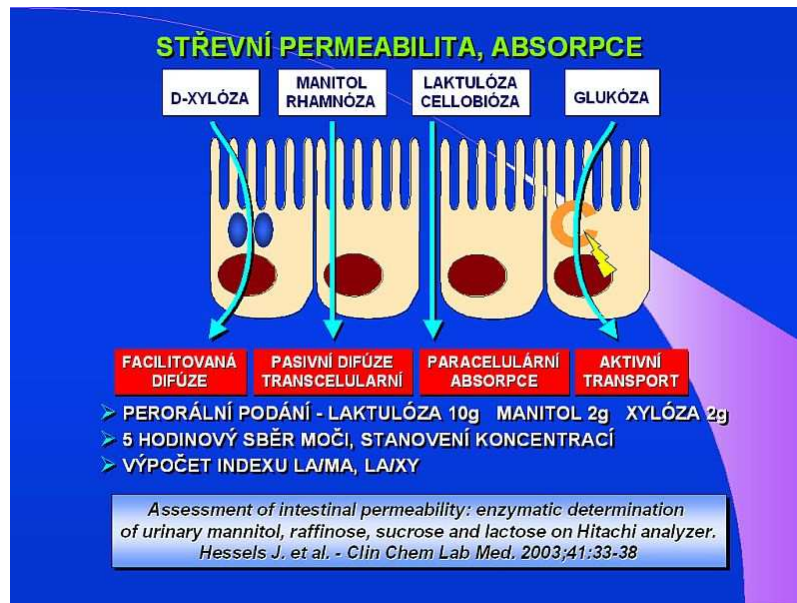


Obr. 54 Grafické znázornění vzestupu esterů retinolu během prvních 24 hodin po podání 105 $\mu\text{mol/l}$ retinyl palmitátu [120].

4.5.1.4.4.2 LAMA test

Pro posouzení slizniční integrity (propustnosti) tenkého střeva se již několik desetiletí používá stanovení vylučování nemetabolizovatelných cukrů v moči po jejich perorálním podání. Obvyklé schéma testu spočívá v perorálním podání dvou cukrů s různou molekulovou hmotností a různým mechanismem absorpce. Monosacharidy jako manitol nebo L-rhamnóza, se vstřebávají transcelulární cestou a odrážejí stupeň absorpce malých molekul (menší než 0,65 nm). Disacharidy (laktulóza nebo celobióza) přecházejí přes paracelulární junkční komplexy a jejich absorpce odpovídá permeabilitě pro velké molekuly (větší než 0,93 nm). Jedním z velmi častých způsobů vyjádření střevní propustnosti je hodnota poměru vyloučeného disacharidu (laktulóza, paracelulární transport) a monosacharidu (manitol; transcelulární transport) v pětihodinovém sběru moči po jejich perorálním podání. Tento způsob do značné míry eliminuje variabilitu způsobenou rozdíly v gastrointestinální motilitě, absorpční kapacitě, renálních funkcích a diuréze. Jiným způsobem vyhodnocení testu je vyjádření množství laktulózy vyloučené v pětihodinovém sběru moči jako procento z perorálně podané dávky nebo přepočítání zjištěné koncentrace laktulózy na kreatinin. Pro stanovení laktulózy a manitolu jsou k dispozici chromatografické (GC, HPLC) a enzymatické analytické metody [115].

Laktulózo/manitolový test lze kombinovat i s podáním D-xylózy, tato verze testu byla vyvinuta v ÚKBD v Hradci Králové. Perorálně je podán roztok 10 g laktulózy, 2 g mannitolu, 2 g D-xylózy a 11 g glukózy ve 100 ml destilované vody, hyperosmolarita roztoku 1500 mosm/l zvyšuje senzitivitu testu. Pacient musí být nalačno (12 hod, obvykle přes noc) a po vypití testovacího roztoku sbírá 5 hodin moč. Analýza jednotlivých cukrů je provedena technikou plynové chromatografie, vypočteny jsou relativní množství jednotlivých cukrů v poměru k podanému množství a konečné indexy permeability LA/MA a LA/XY. Průměrná hodnota LA/MA indexu je u kontrolní skupiny $0,016 \pm 0,008$, indexu LA/XY $0,013 \pm 0,009$. Některé další studie doporučují širší kombinace tří substrátů, např. podání sukralózy, která je stabilní během pasáže tlustým střevem [121].



Obr. 55 Monitorování střevní permeability a absorpce pomocí LAMA testu [122]

4.5.2 Vitamin E



4.5.2.1 Historie

Název tokoferol vznikl spojením dvou řeckých slov: tokos - potomek, pheros - plodit.

Spolu s vitamínem C je nejvíce prostudovaným vitamínem. Tokoferol v doslovném překladu znamená „to, co přináší plodnost“ [123].

Vitamín E byl objeven v roce 1922 dvěma vědci Evansem a Bishopem, kteří pozorovali v pokusech na krysách krmených hlavně sádlem poruchy rozmnožování. Tato porucha se upravovala u pokusných zvířat přidáním semen olejnin do potravy. Neznámá účinná látka byla nazvána faktorem proti sterilitě. Později bylo zjištěno, že kuřata s nedostatkem vitamínu E ve stravě trpí praskáním drobných cév. I u dalších zvířat byly pozorovány abnormality po podání takové stravy, která navozovala deficit vitamínu E, např. nepřírodně tmavé zbarvení tukové tkáně i jiných orgánů obsahujících tuk. Již tehdy se vědci začali domnívat, že vitamin E má vliv na ochranu nenasycených mastných kyselin v těle. Ale trvalo celých 30 let, než bylo potvrzeno, že nejen zvířata, ale i lidé potřebují vitamin E a že je pro ně v potravě nezbytný [124].



Obr. 56 Vitamin E-krystal (obrázek vytvořen stejně jako Obr.č.50) [125]

4.5.2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti

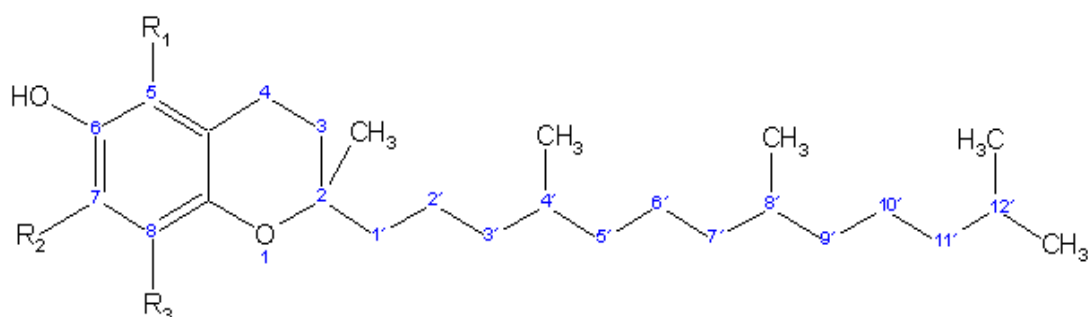
Do skupiny tokoferolů řadíme látky, které jsou odvozeny od tokolu a tokotrienolu.

Tokoferoly tvoří za normální teploty bezbarvé nebo jen slabě nažloutle zbarvené viskózní oleje, které se dají destilovat bez rozkladu za nízkých tlaků. Jsou dobře rozpustné v tucích a lipofilních rozpouštědlech, etheru, petroletheru, chloroformu, hexanu, méně v alkoholu a acetonu. Jsou nerozpustné ve vodě. Při teplotě pod 40°C jsou tokoferoly stabilní vůči silným alkáliím, za vyšších

teplot se rozkládají, estery tokoferolů se zmýdelňují v inertní atmosféře. V kyselém prostředí jsou tokoferoly stabilní a nerozkládají se ani při teplotě 100°C s koncentrovanými minerálními kyselinami. Tokoferoly jsou citlivé vůči vzdušnému kyslíku, rozkládají se v UV světle. Tokoferoly mají silné redukční vlastnosti a snadno se oxidují [126].

Tokoferol je dle ČL 2009 čirá, bezbarvá nebo žlutohnědá viskózní olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, ethanolu, v etheru, v dichlormethanu a v mastných olejích [59].

Tokoferoly



R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	tokol		
R ₁ =CH ₃	R ₂ =CH ₃	R ₃ =CH ₃	α-tokoferol	5,7,8-trimethyltokol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =CH ₃	β-tokoferol	5,8-dimethyltokol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
R ₁ =H	R ₂ =CH ₃	R ₃ =CH ₃	γ-tokoferol	7,8-dimethyltokol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =CH ₃	δ-tokoferol	8-methyltokol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =H	ε-tokoferol	5-methyltokol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂
R ₁ =CH ₃	R ₂ =CH ₃	R ₃ =H	ξ-tokoferol	5,7-dimethyltokol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
R ₁ =H	R ₂ =CH ₃	R ₃ =H	η-tokoferol	7-methyltokol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂

Obr. 57 Nomenklatura tokoferolů [126]

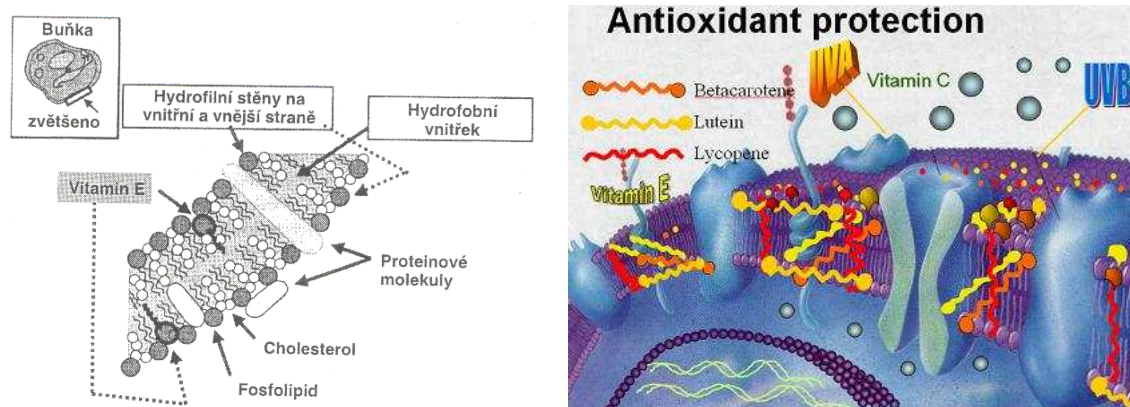
tokoferol (1 mg)	I.U.
d-α-tokoferol	0,92
dl-α-tokoferol	0,68
d-α-tokoferolacetát	1,36
d-α-tokoferolsukcinát	1,31

Tab. 15 Přepočty jednotlivých forem tokoferolů na I.U. [126]

4.5.2.3 Metabolismus

Příjem vitamínu E je vázán na fungující vstřebávání tuků. Poruchy vstřebávání tuků způsobují nedostatek vitamínu E, protože vitamin E se v potravinách vyskytuje rozpuštěný v tucích a je uvolňován a vstřebáván během jejich trávení. V krvi je přenášen lipoproteiny. Nejdříve pronikne do chylomikronů, které ho distribuují do tkání obsahujících lipoproteinlipázy, pak v chylomikronových zbytcích přejde do jater a z jater je roznášen lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL). Je skladován do zásoby v tukové tkáni. Proto je nedostatek vitamínu E spíše spojen s poruchami výše uvedených pochodů, např. chronickou steatorrheou, abetalipoproteinémií, jaterní cholestázou, cystickou fibrozou, a může nastat u pacientů po resekci střeva.

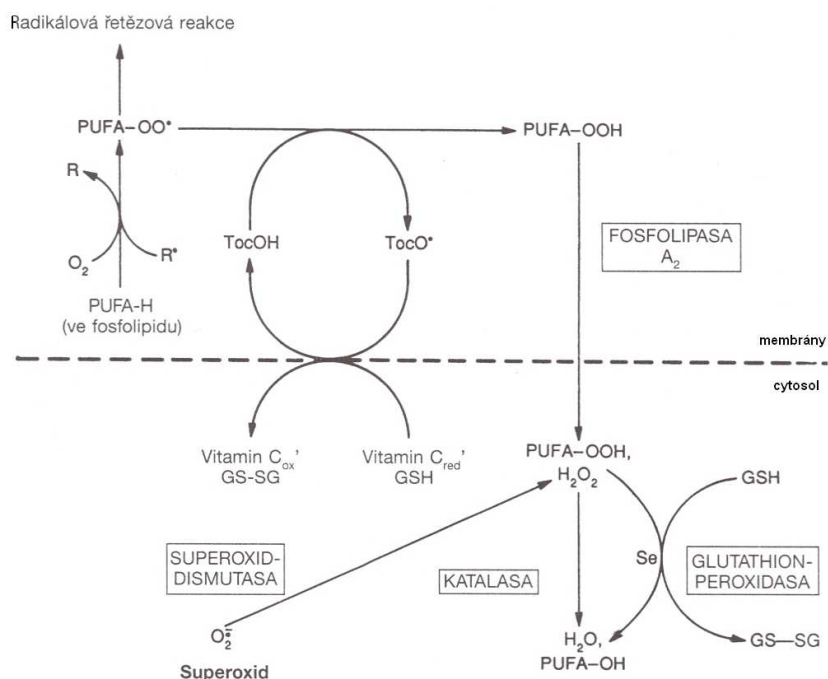
Vitamin E je nejdůležitější přirozený antioxidant, zdá se být v první linii obrany proti peroxidaci polyenových kyselin, vyskytujících se ve fosfolipidech buněčných i nitrobuněčných membránách.



Obr. 58 Buněčná membrána se zabudovaným vitamínem E [127] a model buněčné membrány naznačující další mechanismy antioxidantní ochrany [128]

Fosfolipidy mitochondrií, endoplazmatického retikula a plazmatických membrán mají afinitu k alfa-tokoferolu. Vitamin E se v těchto místech hromadí. Tokoferoly působí jako antioxidanty tím, že přerušují řetězové reakce volných radikálů díky své schopnosti přenášet vodík z fenolové skupiny na volný peroxiradikál peroxidované polyenové kyseliny. Vytvořené volné fenoxo-radikály mohou reagovat s vitamínem C, aby došlo k regeneraci tokoferolu, nebo reagují s dalším volným peroxidovým radikálem tak, že jsou chromanový kruh a postranní řetězec oxidovány na produkt zbavený nepárového elektronu (viz. Obr.59). Tento produkt je pak spojen s kyselinou glukuronovou reakcí hydroxylové skupiny a vyloučen do žluči. Pokud tokoferol reaguje tímto způsobem, není regenerován a musí být (pro pokračování své role v buňce) doplňován. Antioxidační účinky tokoferolu působí při vysoké koncentraci kyslíku, a proto nepřekvapuje, že se

hromadí v takových lipidových strukturách, které jsou vystaveny vyššímu parciálnímu tlaku O_2 , např. v membránách erytrocytů a dýchacího ústrojí.



Obr. 59 Vzájemné ovlivňování a synergismus mezi systémy antioxidantů, které působí v lipidní (membránové) i vodné (cytosolové) fázi buňky [105].

R^\bullet volné radikály, PUFA - OO^\bullet peroxylové volné radikály nenasycených mastných kyselin s více dvojnými vazbami ve fosfolipidech membrány, PUFA - OOH hydroperoxy - formy polyenových mastných kyselin s fosfolipidů membrány uvolněné do cytosolu účinkem fosfolipasy A_2 , PUFA - OH hydroxy - formy polyenových mastných kyselin (s více dvojnými vazbami). TocOH vitamin E (alfa-tokoferol), TcO^\bullet volný radikál alfa-tokoferolu, Se selen, GSH redukovaný glutathion, GS - SG oxidovaný glutathion, který se vrací do redukovaného stavu po reakci s NADPH, katalyzované glutathionreduktasou.

Vitamin E a selen působí synergicky. Glutathionperoxidasa, jejíž nedílnou součástí je selen, představuje druhou linii obrany proti peroxidům, dříve než mohou poškodit membrány a další součásti buněk [105].

4.5.2.4 Klinický význam

Nedostatek vitamínu E může vyvolat vznik anemie u novorozenců, protože u těhotných a kojících žen existují vyšší nároky na obsah tokoferolu v potravě. Anemie novorozenců může být způsobena snížením produkce hemoglobinu a zkrácením životnosti červených krvinek.

Spotřeba vitamínu E se zvyšuje při větším příjmu nenasycených tuků. Příjem vysoce nenasycených olejů, zvýšené vystavení kyslíku (v kyslíkových stanech) nebo nemoci zhoršující vstřebávání tuků mohou vyvolat neurologické potíže způsobné nedostatkem vitamínu E.

U osob s nedostatkem vitamínu K mohou vysoké dávky vitamínu E nepříznivě ovlivnit srážlivost krve [129]. Nedostatek vitamínu E se projeví při dlouhotrvající těžké steatorhey, nebo parenterální výživě, je doprovázen mimo jiné hemolytickou anémií a kreatinurií jako následkem poškození buněčných membrán [75]. Pacienti s nedostatkem vitamínu E trpí především neurologickými potížemi jako jsou poruchy rovnováhy a svalová slabost. Nejvíce ohroženými osobami s vysokou potřebou vitamínu E jsou muži v produktivním věku, ženy po přechodu a obézní jedinci. Potřeba vitamínu E se zvyšuje při stresu, v době klimakteria a při užívání hormonálních přípravků [123].

Zvýšené sérové koncentrace vitamínu E jsou sledovány při hyperlipidemii a obstrukčních jaterních onemocněních. Fyziologické hodnoty jsou uvedeny v tabulce 16. Kolísání mezi jednotlivými dny dosahuje fyziologicky až 15%. Hodnoty menší než 11,5 $\mu\text{mol/l}$ indikují deficitní stav, hodnoty 11,6 - 16,2 $\mu\text{mol/l}$ nízký stav zásob vitamínu E. Za ochranné před kardiovaskulárním onemocněním jsou ale považovány hodnoty vyšší než 30 $\mu\text{mol/l}$ [112].

věk	koncentrace vitamínu E v séru
0 - 1 měsíc	8 - 28 $\mu\text{mol/l}$
1 - 6 měsíc	10 - 31 $\mu\text{mol/l}$
6 měsíců - 6 roků	20 - 30 $\mu\text{mol/l}$
dospělí	19 - 35 $\mu\text{mol/l}$

Tab. 16 Koncentrace vitamínu E v séru

4.5.2.5 Výskyt

Největší množství vitamínu E se nachází v pšeničných klíčcích, rostlinných olejích, ořechách, lněných, sezamových, tykvových či slunečnicových semenech, ovesných vločkách, celozrnných výrobcích, másle, játrech i vejcích.

chřest 100 g	2,5 mg
řepa 100 g	1,5 mg
celer 100 g	0,7 mg
zelí 100 g	0,7 mg
hlávkový salát 100 g	0,6 mg

pórek 100 g	1,3 mg
soja 100 g	6 - 11 mg
mandle 100 g	15 mg
ořechy 100 g	21 mg
obiloviny 100 g	3 - 5 mg
ryže 100 g	1,2 mg
tmavý chléb 100 g	2 - 4 mg
rybí tuk 100 g	26 mg
máslo 100 g	2,4 mg
rostlinné oleje 100 ml	10 - 20 mg



Tab. 17 Hodnoty vitamínu E v jednotlivých potravinách [130]

4.5.3 Stanovení retinoidů a vitamínu E

Pro stanovení vitamínu A v biologickém materiálu je kapalinová chromatografie metodou volby. Většinou je využívána chromatografie na reverzní fázi, ale i na normální fázi. Analýzu lze urychlit zvýšením teploty na 50 - 60°C (ovšem ne vyšší, protože retinol je při vyšších teplotách značně nestabilní). Mobilní fáze se používá v typických průtocích 0,7 - 2,0 ml/min. Retinol silně absorbuje mezi 310 - 370 nm, obvykle se stanovuje při 325 nm. Retinol silně fluoreskuje v nepolárních rozpouštědlech (ex. 320 nm, em. 480 nm).

V poslední době došlo k velkému rozvoji spojení LC-MS. Ionizace za atmosférického tlaku (APCI) byla použita pro identifikaci metabolitů retinolu. Van Breemen a Huang popsali spojení HPLC a elektrospreje s MS pro analýzu kyseliny retinové, retinolu a retinyl acetátu. Spojení HPLC a nukleární magnetické rezonance (NMR) bylo využito pro separaci izomerů kyseliny retinové.

Pro separaci geometrických isomerů retinolu je vhodnější reverzní fáze, Landers a Olson separovali směs čtyřech isomerů ve 12 minutách (11-cis, 13-cis, 9-cis a all-trans retinolu). Mobilní fáze obsahovala směs hexanu, dichlormethanu a isopropyletheru.

Pro separaci kyseliny retinové je preferována reverzní fáze. Kromě MS detekce je využíváno její absorpce při 340 - 356 nm. Kyselina retinová neposkytuje fluorescenci. Elektrochemická detekce retinoidů (i kyseliny retinové) byla popsána při separaci na normální fázi.

Horst separoval na normální fázi kyselinu 13-cis, 9-cis, 9,13-di-cis a all-trans retinovou.

Izokratická eluce na reverzní fázi s použitím methanolu, acetonitrilu nebo jejich směs s přidavkem malého množství amonium acetátu nabízí velmi rychlou separaci 9-cis, 13-cis a all-trans izomerů kyseliny retinové.

Nejběžnějším esterem retinolu je retinyl palmitát. Pro separace retinolu a jeho esterů je doporučována reverzní fáze (ODS, C8, fenylem modifikovaný silikagel) s gradientem mobilní fáze. Estery absorbují v UV oblasti 325 - 340 nm.

HPLC metody pro stanovení vitamínu E lze rozdělit na HPLC na normální a reverzní fázi.

Na normální fázi lze separovat tokoferoly a tokotrienoly (hlavně beta a gama isomery). V tomto případě není nutné odstraňovat ze vzorku nepolární substance (např. triacylglyceroly). Pro tuto separaci jsou jako mobilní fáze často používány následující směsi rozpouštědel: n-hexan obsahující 5% diethyletheru nebo 7% dipropyletheru, 0,2% nebo 0,3% 2-propanolu a 2% - 3% 1,4-dioxanu atd.

Pro stanovení vitamínu E je ovšem stále metodou volby HPLC na reverzní fázi. Výhodná je pro svou nižší citlivost na změnu složení a obsah vody v mobilní fázi a tím vyšší reprodukovatelnost retenčních časů a díky jednodušší a rychlejší regeneraci a reekvilibraci. Na ODS stacionárních fázích dochází k eluci tokoferolů v opačném pořadí (delta-, beta-gama-, alfa-tokoferol). Jako typická mobilní fáze je často používán 100% methanol nebo methanol s malým přídatkem organického modifikátoru (tetrahydrofuran, ethylacetát, chloroform) pro zvýšení rozpustnosti a selektivity analytů. 100% methanol je často používán pro separaci alfa- a gama-tokoferolu.

Pakliže je stanovován vitamin E v séru nebo v plazmě společně s retinolem, karotenoidy a dalšími látkami, je preferována reverzní fáze a je nutno odstranit nepolární součásti vzorku.

Tokoferoly jsou nejčastěji detekovány v UV oblasti (292 nm - 298 nm), poskytují také fluorescenci, excitační maxima v rozmezí 291 nm - 300 nm a emisní 324 nm - 329 nm v závislosti na struktuře jednotlivých tokoferolů. Elektrochemická detekce (CE) je založená na oxidaci tokoferolů a tokotrienolů na chinony. Výhodou EC detekce je její citlivost.

Pro současné stanovení vitamínu A a E je často preferována reverzní stacionární fáze a methanol nebo směs methanolu a vody (95 : 5) jako mobilní fáze s UV detekcí. Jako vnitřní standard je užíván syntetický derivát tokol.

Granado Lorencio separoval retinol, tokoferol společně s vitamínem D a vybranými karotenoidy pomocí UPLC v čase 4,5 minuty. Jako stacionární fáze byla použita hybridní částicová kolona HSS (High Strength Silica, 2,1 × 100 mm, 1,8 μm) s gradientovou elucí a UV - VIS detekcí. V některých pracích bylo UPLC metodiky využito pro stanovení vitamínu A, E, karotenoidů a dalších látek v hovězím séru, mléce apod.

MS detekce poskytuje více informací o analyzovaných látkách a také vyšší citlivost. Analýza v biologickém materiálu je obtížná, protože se často jedná o velmi složité matrice skládající se

z mnoha odlišných látek. Objevuje se řada prací stanovujících vitaminy v potravinách, například spojení LC-APCI-MS pro stanovení vitamínu A, D₃ a E.

Retinol, alfa-tokoferol a beta-karoten v lidském séru byly separovány a detekovány metodou LC-MS-MS skupinou Roberta Andreoli. Analyty byly separovány v čase 6 minut na reverzní stacionární fázi C8 s mobilní fází methanol : dichlormethan (99 : 5) v izokratickém módu. V práci [135] byly porovnány jednotlivé metody pro stanovení vitamínu A a E v séru. Byly porovnány jednotlivé validační parametry, ale i cena, spotřeba rozpouštědel a životnost stacionárních fází. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 18 a 19.

	UPLC kolona	částicová kolona	monolitická kolona
	hybridní částicová kolona C18	reverzní fáze C18	monolitická reverzní fáze C18
rozměry kolony (mm)	100 x 2,1 i.d., 1,7 μm	150 x 4,6 i.d., 5 μm	100 x 4,6 i.d.,
mobilní fáze	100% methanol	100% methanol	100% methanol
průtok mobilní fáze (ml/min)	0,48	1,50	2,50
retenční čas (min)			
retinol	0,80	2,00	0,80
alfa-tokoferol	2,00	5,30	1,40
celkový čas analýzy (min)	2,00	6,00	1,80
tlak v systému ¹ (PSI)	4 800 - 4 900	950 - 1000	470 - 500
spotřeba mobilní fáze ² (ml)	96	900	450
cena kolony (€)	743	394	629
průměrná životnost ³	2 200	700	1 800
cena ^{2,4} (€)	36	72	44
úspora času ^{2,5}	6 h 40 min	-	7 h

¹ systémový tlak po prvním použití kolony, ² počítáno na 100 nástřiků, ³ myšleno jako počet analýz bez jakékoliv změny od prvního použití kolony, ⁴ průměrně počítáno jako spotřeba rozpouštědel a cena kolony, nezahrnuje opotřebením přístroje, ⁵ srovnání monolitické a UPLC kolony s částicovou kolonou

Tab. 18 Porovnání chromatografických podmínek pro stanovení retinolu a alfa-tokoferolu pro jednotlivé stacionární fáze a metody HPLC a UPLC [135]

	retinol			alfa-tokoferol		
	UPLC	částicová kolona	monolitická kolona	UPLC	částicová kolona	monolitická kolona
opakovatelnost nástřiku - plocha (RSD%)	0,51	4,51	5,58	0,62	0,91	5,93
opakovatelnost nástřiku - retenční čas (RSD%)	0,11	0,08	0,10	0,21	0,29	0,37

správnost ^{1,2} (RSD%)	3,78	3,24	5,98	4,61	1,68	2,06
kalibrační rozmezí ³ ($\mu\text{mol/l}$)	0,25 -10,00	0,50-10,00	0,50-10,00	0,50-50,00	0,50-50,00	0,50-50,00
korelační koeficient (R^2)	0,9997	0,9992	0,9999	0,9999	0,9996	0,9997
LOD ($\mu\text{mol/l}$)	0,019	0,02	0,20	0,05	0,10	0,10
LOQ ($\mu\text{mol/l}$)	0,06	0,07	0,07	0,15	0,30	0,30

^{1,2} sérum s obsahem retinolu a alfa-tokoferolu (metoda standardního přídávku), ³ linearita byla měřena pro šest koncentračních úrovní

Tab. 19 Porovnání validačních parametrů pro retinol a alfa-tokoferol při použití jednotlivých stacionárních fází

Kapitola byla vypracována z následujících odkazů:

[105, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144]

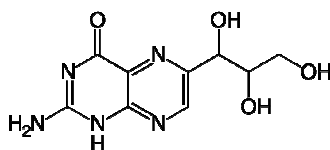
4.5.4 Neopterin



4.5.4.1 Historie

Termín pteridiny byl vytvořen pro název neznámého pigmentu z motýlích křídel (*Lepidoptera - motýli*) a pochází z řeckého slova *pteron* - křídlo [145].

Neopterin byl poprvé izolován v roce 1963 z larev včel. Chemická struktura byla objasněna v roce 1967. O 4 roky později po objevení neopterinu bylo 25 mg této látky izolováno z 500 litrů lidské moči. Zvýšené množství neopterinu v moči bylo pozorováno u lidí trpících fenylketonurií. V roce 1979 publikoval Wachter práci o zvýšených hladinách neopterinu v moči u pacientů s malignitami a infekcemi. Později bylo prokázáno, že produkce neopterinu souvisí s aktivací imunitního systému. Celá řada dalších autorů ve studiích *in vitro* a *in vivo* prokázala, že biosyntéza neopterinu je úzce spjata s aktivací buněčného imunitního systému a že lidské makrofágy produkují neopterin při stimulaci interferonem-gama. Zvýšené hladiny neopterinu v séru i moči byly prokázány v různých patologických situacích, u nefrotického syndromu, autoimunitních onemocnění, inzulinové rezistence, rakoviny pankreatu, kolorektálního karcinomu, akutního infarktu myokardu a celé řady dalších onemocnění [146].



Obr. 60 Neopterin 1-(2-amino-4-hydroxy-pteridin-6-yl)propan-1,2,3-triol

4.5.4.2 Fyzikálně chemické vlastnosti

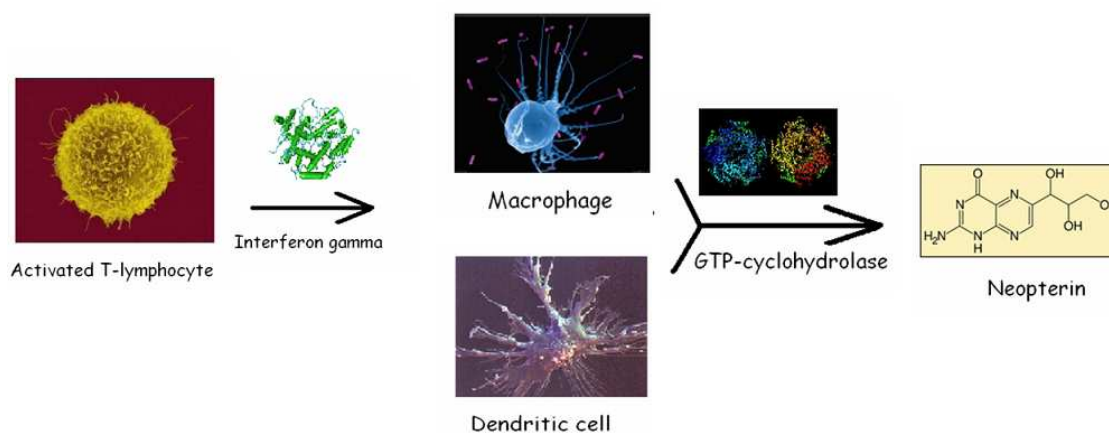
Neopterin patří do skupiny pteridinů. Tato skupina zahrnuje dvě hlavní podskupiny: konjugované a nekonjugované pteridiny. Mezi konjugované pteridiny, které jsou charakteristické poměrně dlouhým postranním řetězcem, řadíme např. vitaminy odvozené od kyseliny listové. Nekonjugované pteridiny (např. neopterin a biopterin) mají jednodušší postranní řetězec v poloze 6 [146].

Neopterin je bílý prášek, dobře rozpustný ve vodě a citlivý na světlo. Proto je doporučeno uchovávat vzorky pro stanovení neopterinu ve tmě. Neopterin je nízkomolekulární látka vykazující silnou fluorescenci ve své oxidované formě [145].

4.5.4.3 Metabolismus a klinický význam

Nejdůležitějšími nekonjugovanými pteridiny, které jsou detekovatelné v lidském organismu, jsou biopterin a neopterin. Biopterin a jeho 5,6,7,8-tetrahydro- forma jsou nezbytnými kofaktory celé řady monooxygenáz aromatických aminokyselin a jsou také odpovědné za konverzi argininu na citrulin a oxid dusnatý [146].

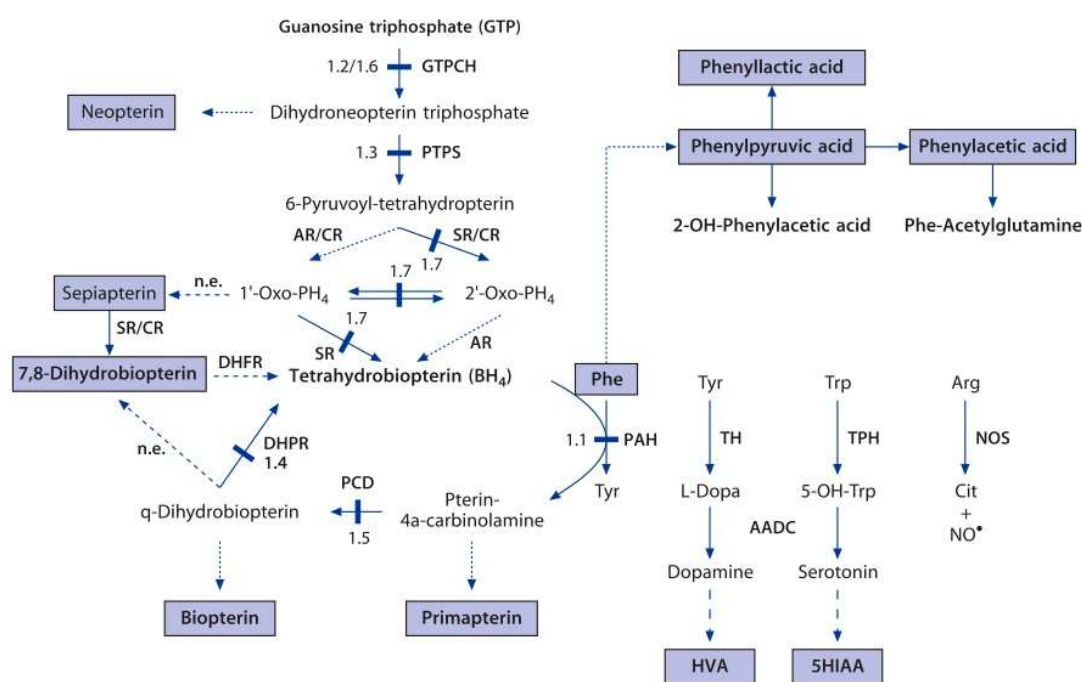
Pakliže T-lymfocyt (TH1) rozezná cizí nebo vlastní modifikovanou buňku, začne produkovat lymfokininy (interferon-gama). Interferon-gama stimuluje monocyto-makrofágový systém, který začne produkovat neopterin. Neopterin je syntetizován enzymem GTP-cyklohydrolázou z guanosintrifosfátu (GTP).



Obr. 61 Mechanismus aktivace imunitního systému s následnou syntézou neopterinu

Neopterin uvolněný do krve je biochemicky inertní, má delší poločas než uvolněné interleukiny, které jsou většinou ihned navázány na receptory cílových buněk. Proto je neopterin vhodným laboratorním markerem aktivace imunitního systému. Monitoring zvýšené hladiny neopterinu je také využíván k diferenciaci diagnostice vrozeného metabolického defektu syntézy biopterinu (atypická fenylketonurie). Kromě zvýšeného fenylalaninu je při tomto onemocnění zvýšená také hladina neopterinu.

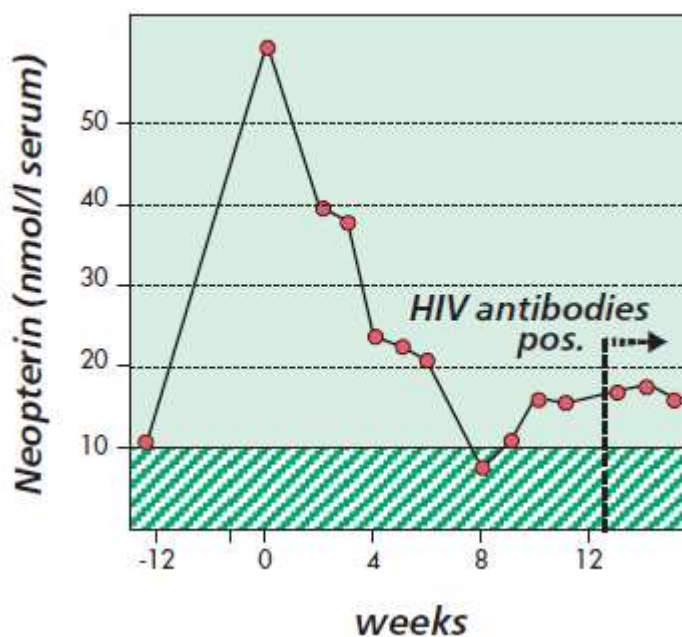
Klinické studie potvrzují možný vliv derivátů neopterinu na cytotoxické účinky makrofágů. Proto může stanovení neopterinu nepřímo signalizovat oxidační stres indukovaný imunitním systémem. Na druhé straně deriváty neopterinu jsou schopny ovlivnit kyslíkové radikály. 7,8-dihydrobiopterin je hlavním scavengerem mnoha reaktivních substancí (H_2O_2 , $HOCl$, NO), zvyšuje expresi pro-onkogenu *c-fos*, z čehož vyplývá, že tato substance může ovlivnit maligní transformaci buněk. Deriváty neopterinu indukují programovanou smrt buňky (apoptózu) [147]. V souvislosti s tímto pozorováním se výzkum v oblasti pteridinů v současné době obrací k takovým onemocněním, jako jsou neurodegenerativní onemocnění mozku, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a mnoho dalších nemocí, které provázejí ztráty a změny nervových buněk [146].



Obr. 62 Schéma syntézy neopterinu a jeho derivátů [148]

infekční onemocnění	intracelulární bakterie, viry, paraziti prognóza HIV infekce
autoimunitní onemocnění a jiná zánětlivá onemocnění	revmatoidní artritida x osteoartritida, systémový lupus erythematoses, Wegnerova granulomatoza , Crohnova choroba, ulcerativní kolitida
maligní onemocnění	prognóza gynekologických a hematologických malignit, bronchiální karcinom, karcinom prostaty, gastriontestinální karcinom
transplantace	rozpoznání imunologických komplikací jako rejekce nebo infekce
monitorování léčby	imunomodulační terapie cytokininy, při nemocích vedoucích ke zvýšené hladině neopterinu (HIV, antibakteriální léčba tuberkulózy...)

Tab. 20 Monitorování hladin neopterinu v klinické diagnostice [147]



Obr. 63 Hladina neopterinu v séru po nakažení organismu virem HIV [147]

4.5.4.4 Koncentrace neopterinu v biologických tekutinách

Jak již bylo zmíněno, neopterin je nízkomolekulární substance biologicky i chemicky stabilní v tělních tekutinách, který může být snadno měřen v rutinních laboratořích. Neopterin je vylučován ledvinami, změny sérových koncentrací neopterinu ovlivňují jeho hladinu v moči. Stanovení 7,8-dihydroneopterinu není vhodné pro rutinní laboratoře, tento derivát neopterinu je velmi nestabilní (snadno se oxiduje). Neopterin je citlivý na přímé sluneční světlo, proto by

vzorky měly být uchovány ve tmě. Nejlépe prozkoumané hladiny neopterinu jsou v moči a séru [145].

Nejčastěji je neopterin stanovován v moči (neinvazivní metoda), získanou hodnotu je nutno přepočítat na koncentraci kreatininu.

věk	pohlaví	koncentrace neopterinu - střední hodnota (μmol/mol kreatininu) (SD)	horní hranice normálních koncentrací
< 3 dny	M, Ž	972 (661)	-
4.den	M, Ž	1510 (641)	-
5.den	M, Ž	1602 (657)	-
1. měsíc	M, Ž	906 (527)	-
3. - 8. měsíc	M, Ž	560 (53)	-
1. - 4. rok	M, Ž	267 (94)	432
4. - 7. rok	M, Ž	226 (76)	405
7. - 12. rok	M, Ž	181 (73)	374
12. - 15. rok	M, Ž	171 (73)	343
15. -18. rok	M	144 (65)	320
18. - 25. rok	M	123 (30)	195
26. - 35. rok	M	101 (33)	182
36. - 45. rok	M	109 (28)	176
46. - 55. rok	M	105 (36))	197
56. - 65. rok	M	119 (39)	218
> 65 let	M	133 (38)	119
18. - 25. rok	Ž	128 (33)	208
26. - 35. rok	Ž	124 (33)	209
36. - 45. rok	Ž	140 (39)	239
46. - 55. rok	Ž	147 (32)	229
56. - 65. rok	Ž	156 (35)	249
> 65 let	Ž	151 (40)	251

Tab. 21 Koncentrace neopterinu v moči [145]

Hladina neopterinu v séru a v plazmě se příliš neliší, vzorky jsou stabilní tři dny při pokojové teplotě. Pro delší skladování (týden) se doporučuje teplota + 4°C. Teplota - 20°C je vhodná pro dlouhodobé skladování (3 měsíce).

věk (roky)	pohlaví	koncentrace neopterinu - střední hodnota (nmol/l) (SD)	horní hranice normálních koncentrací
0 -1 8	M, Ž	6,78 (0,22)	13,5
19 - 75	M, Ž	5,34 (0,14)	8,7
> 75	M, Ž	9,67 (0,79)	19,0

Tab. 22 Koncentrace neopterinu v séru [145]

Stanovení neopterinu v mozkomíšním moku je komplikované díky invazivnosti odběru tohoto biologického materiálu. Proto není koncentrace neopterinu v mozkomíšním moku příliš prozkoumána. Klinické studie zabývající se těmito stanoveními zahrnují většinou pacienty s bolestmi hlavy, neurologickými a/nebo psychiatrickými onemocněními. Hladina neopterinu v mozkomíšním moku je nižší než v séru. Frederikson 1987 stanovil u devatenácti pacientů rozmezí 1,25 - 3,30 nmol/l (n = 19, SD = 0,6), Griffin v roce 1991 hodnotu 8,8 nmol/l (n = 46, SD = 2,6). Stejně tak je invazivní metodou i odběr synoviální tekutiny, proto i v těchto klinických studiích nejsou dostatečně velké skupiny pacientů pro přesné určení fyziologické koncentrace neopterinu. Marketer-Alzer 1986 stanovil neopterin u 30 pacientů se zánětlivým onemocněním kloubů a traumaty. Hladiny neopterinu v synoviální tekutině u zdravých kontrolních pacientů (n = 30) byly v rozmezí 2,0 - 8,0 nmol/l oproti pacientům se zánětlivým onemocněním kloubů, kde koncentrace dosahovaly až 30 nmol/l.

Normální koncentrace neopterinu ve slinách byla zkoumána dvěma skupinami (Kato et al. 1989, Reibnegger et al. 1990) [149, 150] Obě studie ukazují na shodné hodnoty 1,0 - 4,6 nmol/l u zdravých jedinců. Tato hodnota je výrazně nižší než u HIV pozitivních pacientů, u kterých se hladina neopterinu ve slinách pohybuje kolem 6,5 nmol/l [145].

4.5.5 Kynurenin a tryptofan

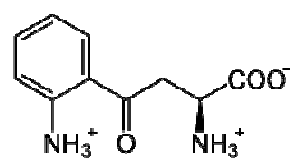


4.5.5.1 Kynurenin

Kynurenin je metabolitem esenciální aminokyseliny tryptofanu, byl identifikován v moči dospělých samic lososa (*Oncorhynchus masou*) jako nehormonální feromon [151]. Fyziologické koncentrace kynureninu v séru jsou 1,92 $\mu\text{mol/l}$ [152]. Kynurenin se fyziologicky nachází v moči, jeho koncentrace je nutno přepočítat na hladinu kreatininu. Koncentrace kynureninu v moči je 10 $\mu\text{mol/l}$ [153].

4.5.5.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti kynureninu

Kynurenin, 2-Amino-4-(2-aminofenyl)-4-oxo-butanová kyselina, neposkytuje fluorescenci, v mnoha pracích [154, 155] je uváděna UV detekce kynureninu při 360 a 365 nm nebo fluorescenční detekce po derivatizaci [156, 157]. Rozpustnost kynureninu ve vodě je 986 mg/ml [158].



Obr. 64 Kynurenin



Obr. 65 Tryptofan

4.5.5.2 Tryptofan

Tryptofan byl objeven stejně jako neopterin a vitamin A Sirem Frederickem Gowlandem Hopkinsem v roce 1901, poprvé ho popsal jako esenciální aminokyselinu, kterou si tělo neumí samo vytvořit [159]. Tryptofan, je prekurzorem serotoninu a niacinu [160].

věk	koncentrace tryptofanu v plazmě
-----	---------------------------------

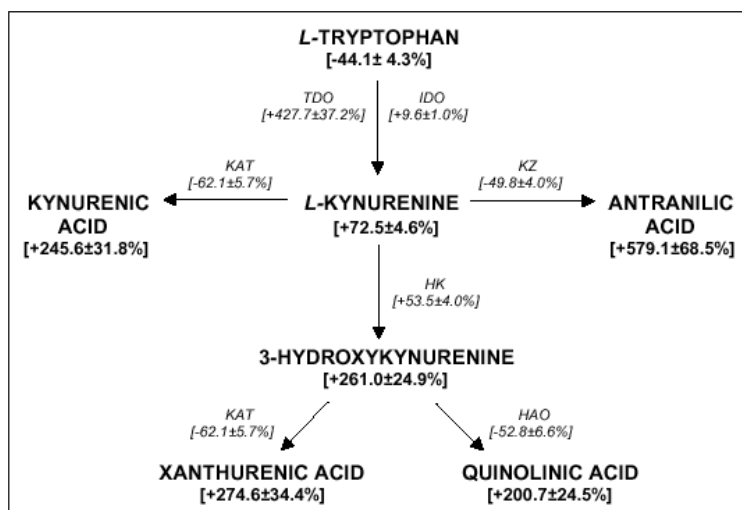
dospělí	25 - 73 $\mu\text{mol/l}$
nedonošené děti (1. den)	15 - 45 $\mu\text{mol/l}$
doonošené děti (1. den)	25 - 73 $\mu\text{mol/l}$

Tab. 23 Koncentrace kynureninu v plazmě [160]

Vysoký obsah tryptofanu se nachází v avokádu, banánech, mléčných výrobcích, v krůtím mase, lososu atd.

4.5.5.3 Metabolismus a klinický význam

Hlavním produktem rozkladu L-tryptofanu v kynureninové dráze je L-kynurenin, který je v organizmu přeměňován na další produkty: 3-hydroxykynurenin (3-HKYN), antranilová, kynureninová, xanthurenová (XA) a chinolinová (QA) kyselina, která je vysoce neurotoxická.



Obr. 66 Schéma metabolismu kynureninu a tryptofanu [161]

Zvýšená degradace tryptofanu byla pozorována při onemocněních a stavech souvisejících s aktivací buněčného imunitního systému, jako jsou infekce, autoimunitní a maligní onemocnění, ale také např. v těhotenství [162, 163].

Proto poruchy v metabolismu tryptofanu přispívají k modulaci oxidativního stresu ve tkáních a změnám ve stimulaci glutamátových receptorů, což může způsobit neurodegenerativní poruchy (Parkinsonova, Huntingtonova a Alzheimerova choroba, sclerosis multiplex atd.) [164].

Během dlouhodobé aktivace buněčného imunitního systému (chronické infekce) dochází ke snížení sérové koncentrace volného tryptofanu, snižuje se produkce serotoninu, což může zapříčinit vznik mentálních poruch a depresí [165].

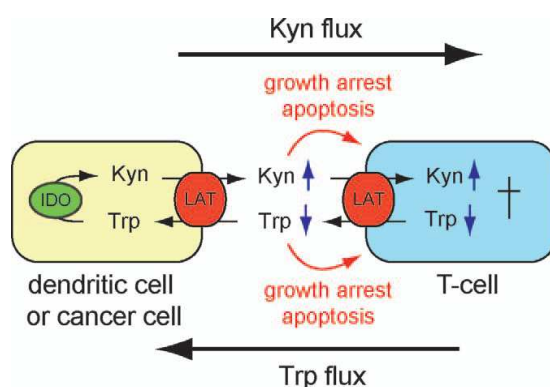
Při onemocnění ledvin je katabolismus tryptofanu přes kynureninovou dráhu zvýšen. Dochází k vzestupu derivátů kynureninu v plazmě a další progresi choroby [166].

Patologicky zvýšená koncentrace kynureninu provází mnoho onemocnění. Jmenovat můžeme HIV, schizofrenii, autoimunitní choroby (revmatoidní artritida), kardiovaskulární onemocnění nebo malignity (hematologické neoplasie, kolorektální karcinom). Velmi významně je koncentrace kynureninu zvýšena při karcinomu prsu.

Ke zvýšení poměru kynurenin/tryptofan dochází zejména v pokročilém stádiu onemocnění a těsně před smrtí pacienta. Hladiny tryptofanu jsou významně nižší při poklesu váhy, například během anorexia nervosa. Se zvýšením váhy se koncentrace tryptofanu opět upraví.

Stanovení hladin kynureninu a tryptofanu umožňuje monitorovat aktivitu imunitního systému při jednotlivých onemocněních a přispět tak ke zlepšení léčby, popřípadě vývoji nových léčiv [167].

Podle posledních studií, které zkoumaly přeměnu tryptofanu na kynurenin v nádorových buňkách (enzymem indoleamin 2,3-dioxygenázou - IDO), je klíčem transportní protein LAT, přítomný v mnoha typech nádorových buněk, který transportuje tryptofan dovnitř buněk a kynurenin ven, což způsobuje vyšší hladinu kynureninu vně buňky a tím vyšší toxicitu pro T-buňky. Vědci se také domnívají, že tento cyklus může probíhat i v buňkách u autoimunitních onemocnění, kdy dochází k zablokování přeměny tryptofanu na kynurenin (deficit IDO nebo LAT1). T-buňky nemohou být toxicitou kynureninu udrženy pod kontrolou a napadají tak vlastní organismus.



Obr. 67 Model výměny kynureninu a tryptofanu v nádorových buňkách:

Nádorová buňka postupně vyčerpá zásoby tryptofanu v okolí, který vymění za toxický kynurenin. T-buňky potom nemají dostatek tryptofanu pro svou potřebu a navíc jsou obklopeny toxickým kynureninem [168].

Thijs Kaper vyvinul detekční systém FRET (fluorescence resonance energy transfer) s nanosenzorem pro tryptofan, který umožňuje monitorovat koncentraci a umístění tryptofanu

v buňce. Lze tak monitorovat pohyb tryptofanu a kynureninu v buňce. Tento systém může významným způsobem ovlivnit výzkum v oblasti onkologie a imunologie [168, 169].



Obr. 68 FRET nanosenzor v spojení s mikroskopem [170]

4.5.6 Kreatinin

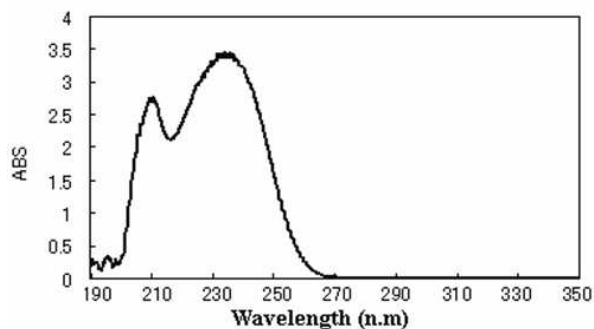
Americký profesor španělského původu Severo Ochoa se zabýval izolací kreatininu z moči, v roce 1929 společně s profesorem José G. Valdecasem vyvinuli metodu pro stanovení kreatininu ve svalech. Publikace byla ihned přijata [171].



Obr. 69 Profesor Severo Ochoa

4.5.6.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Kreatinin je cyklický imid kreatinu (= kyseliny N-methylguanidinoctové) s relativní molekulovou hmotností 113,12. Je slabě rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v acetonu, etheru a chloroformu. Absorpční maximum kreatininu je při 235 nm.



Obr. 70 Absorbanční křivka kreatininu v dialyzátu [172]

4.5.6.2 Metabolismus a klinický význam

Kreatinin vzniká ve svalové tkáni jako konečný metabolit kreatinu a kreatinfosfátu. Vylučuje se glomerulární filtrací a při průtoku tubuly se množství kreatininu v primární moči nemění. Toto však platí jen při fyziologické koncentraci kreatininu v séru. Při zvýšené kreatininémii hraje roli i

tubulární sekrece. Přes tuto skutečnost je vylučování kreatininu do moči považováno za odraz glomerulární filtrace a vyšetření známé jako clearance endogenního kreatininu je dosud nejběžnější funkční zkouškou ledvin.

Horní hranice referenčního rozmezí při běžně užívané Jaffého metodě stanovení kreatininu je asi 120 $\mu\text{mol/l}$. Ženy mívají hodnoty nižší vzhledem k menší svalové hmotě. Výrazně nižší hodnoty kreatininémie nacházíme v dětském věku (viz tabulka 24).

Zvýšenou koncentraci sérového kreatininu pozorujeme při funkčním i anatomickém selhání ledvin, obstrukční uropatii apod. Na rozdíl od močoviny kreatinin výrazně stoupá u chronického selhání ledvin, zatímco u akutních stavů a zejména u funkčního selhání ledvin bývá kreatininémie zvýšená jen mírně. U těžkého selhání ledvin se může koncentrace kreatininu pohybovat v hodnotách nad 1000 $\mu\text{mol/l}$, vzácně i nad 1500 $\mu\text{mol/l}$. Na umělou ledvinou napojujeme pacienta, pokud kreatininémie přesáhne 700 - 800 $\mu\text{mol/l}$.

Stanovení hladiny kreatininu je specifitějším ukazatelem porušené funkce ledvin než stanovení močoviny. Zvýšená produkce kreatininu, pozorovaná po nadměrné fyzické námaze nebo velkém příjmu bílkovin, totiž zvyšuje kreatininemii jen málo.

Fyziologicky snížená koncentrace kreatininu v séru následkem glomerulární filtrace je kromě dětského věku také v těhotenství. Nižší hodnotu koncentrace plazmatického kreatininu pozorujeme také u osob s malou svalovou hmotou, s jejím úbytkem při dlouhodobém pobytu na lůžku a u nemocných s myodystrofií [75].

Stanovení kreatininu v moči

Toto stanovení se užívá ve třech případech:

- při odhadu glomerulární filtrace výpočtem (clearance endogenního kreatininu)
 - pro odhad úplnosti sběru moči (odpad kreatininu močí vztažený na kg hmotnosti se pohybuje v poměrně úzkém rozmezí, je-li odpad kreatininu nižší než očekávaná hodnota zmenšená o 30%, můžeme téměř s jistotou soudit na neúplný sběr moči)
 - pro standardizaci odpadu látek močí, chybí-li sběr moči (přepočít koncentrace stanovované látky v moči na 1 mmol kreatininu eliminuje vliv různé koncentrace moči)
- [75].

	věk/období	koncentrace $\mu\text{mol/l}$	pozn.
plodová voda	≤ 27 týden těhotenství	72 - 99	
	30 - 34 týden těhotenství	99 - 162	
	35 - 40 týden těhotenství	162 - 360	
krev	dospělí	44 - 97	Ž (Jaffé)
		53 - 106	M (Jaffé)
	novorozenci	71 - 124	(Jaffé)
	1.rok	≤ 44 / ≤ 55	Ž / M (Jaffé)
	2. - 3. rok	≤ 53 / ≤ 62	Ž / M (Jaffé)
	4. - 7. rok	≤ 62 / ≤ 71	Ž / M (Jaffé)
	8. - 10. rok	≤ 71 / ≤ 80	Ž / M (Jaffé)
	11. - 12. rok	≤ 80 / ≤ 88	Ž / M (Jaffé)
	13. - 17. rok	≤ 97 / ≤ 106	Ž / M (Jaffé)
18. - 20. rok	≤ 106 / ≤ 115	Ž / M (Jaffé)	
moč	dospělí	124 - 230 $\mu\text{mol/kg/den}$	
	dospělí	5,3 - 16 mmol/den	Ž
	dospělí	7 - 18 mmol/den	M
	děti	71 - 195 $\mu\text{mol/kg/den}$	

Tab. 24 Koncentrace kreatininu v biologických tekutinách [160]

4.5.6.2.1 Clearance (endogenního) kreatininu

Asi 1 - 2% tělesného kreatinu obsaženého v mozku a především ve svalech je denně přeměněno na kreatinin, který se jako odpadní látka vylučuje ledvinami. Při normální funkci ledvin tedy odpovídá clearance kreatininu glomerulární filtraci. S pokračující renální insuficiencí však klesá clearance kreatininu pomaleji, než odpovídá skutečnému poklesu glomerulární filtrace. Dalším důvodem, proč clearance kreatininu neodpovídá zcela glomerulární filtraci, je skutečnost, že nejběžněji užívaná metoda stanovení (Jaffého reakce) není pro kreatinin specifická a stanovuje navíc množství tzv. Jaffé-pozitivních chromogenů.

4.5.6.2.2 Jaffého reakce

Jaffého reakce není zcela specifická. Činidlem je alkalický roztok kyseliny pikrové, který tvoří barevný adukt s kreatininem, ale i s dalšími tzv. Jaffé-pozitivními chromogeny (kolem 50 látek), s činidlem také reagují alfa-ketokyseliny (např. pyruvát, kyselina askorbová, glukóza, ketolátky, guanidin a bílkoviny). Skutečné hodnoty kreatininu bývají proto za normálních podmínek o 9 - 18 mmol/l nižší. Za patologických stavů může být podíl nespecifických chromogenů výrazně zvýšen (např. u nekompensovaného diabetika až 180 mmol/l). Měření absorbance se provádí buď v rovnovážném stavu (inkubace 10 až 15 minut při pokojové teplotě), nebo kineticky. Nejčastěji se používá stanovení v modifikaci podle Bartelse a Ullmanna [173].

4.5.6.2.3 Enzymatický test

Principem metody je hydrolýza kreatininu kreatininázou na kreatin. Vytvořený kreatin je kreatinázou hydrolyzován na sarkosin a močovinu. Sarkosinoxidáza katalyzuje oxidační demetylací sarkosinu, jejímž produktem je glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Vytvořený peroxid vodíku reaguje za přítomnosti peroxidázy (POD) kvantitativní oxidační kondenzací s N-(3-sulfopropyl)-3-metoxy-5-metylanilinem (HMMPS) a 4-aminoantipyrinem za vzniku modrého pigmentu. Koncentrace kreatininu je úměrná změně absorbance při 600/700 nm.



[174]

Podíl chromogenů na vzniklém zabarvení v séru a v moči je rozdílný a mění se při různých chorobných stavech. Přes všechny výhrady zůstává stanovení clearance kreatininu nejužívanější metodou pro odhad glomerulární filtrace. Existují pro to dva důvody:

- kreatinin je látka vznikající v organizmu a nemusí se přivádět v infuzi, jeho produkce jen velmi málo kolísá, vyloučíme-li nadměrný přívod masa a přílišnou fyzickou námahu
- metoda stanovení je levná a jednoduchá

Výpočet clearance kreatininu:

$$Cl_{kr} = (\text{ml/s}) = U_{kr} \cdot V/P_{kr} = GF$$

U_{kr} a P_{kr} jsou koncentrace kreatininu v moči a v séru

V je diuréza v ml/s

Aby se vyloučil vliv nestejně velikosti těla, hmotnosti a konstituce, přepočítává se tato hodnota na ideální povrch těla, tj. 1,73 m². Skutečná hodnota (S) se pak přepočítá, existuje i řada vzorců vycházejících z hmotnosti (m) a výšky (h) pacienta. Např.:

$$GF = GF/S$$

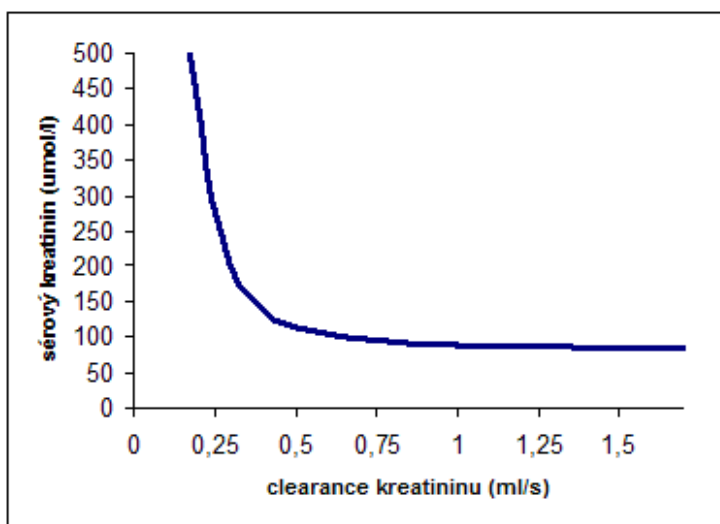
$$S = 0,0167 \cdot \sqrt{m \cdot h}$$

Referenční rozmezí je 1,3 - 2,8 ml/s/1,73 m²

Nejčastější chyby při stanovení clearance kreatininu

- neúplný sběr moči
- nepromíchaná moč sbíraná do více nádob při polyurii
- zaslání vzorku ranní moči místo moči sbírané za časové období
- nesprávný výpočet povrchu těla u obézních osob a pacientů s velkou retencí tekutin
- sběr moči kratší období (např. přes noc) - glomerulární filtrace totiž jeví cirkadiální rytmus s nejmenší hodnotou v noci

Sérová koncentrace kreatininu velmi dobře koreluje s hodnotou glomerulární filtrace. Při větším poklesu glomerulární filtrace (pod hodnotu 0,8 ml/s) je stanovení clearance kreatininu zbytečné a zcela vystačíme s hodnotou sérového kreatininu. Naproti tomu menší pokles glomerulární filtrace nelze podle sérového kreatininu rozpoznat a právě pro odhalení počátečních fází renálního onemocnění má stanovení clearance kreatininu největší význam [75].

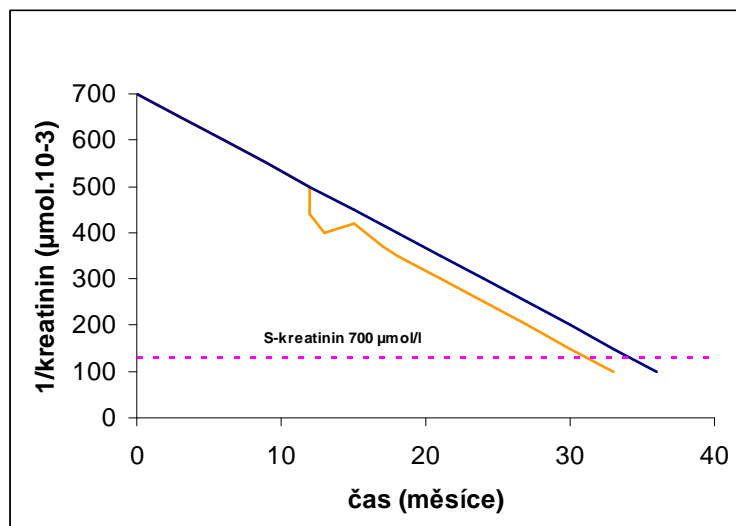


Obr. 71 Závislost sérového kreatininu na clearance kreatininu

4.5.6.3 Prognostický význam převrácené hodnoty sérového kreatininu

S progresí chronického onemocnění ledvin postupně klesá glomerulární filtrace a stoupá sérový kreatinin. Bylo zjištěno, že převrácené hodnoty sérové koncentrace kreatininu vynesené

v závislosti na čase leží na přímce. Jejím prodloužením můžeme zjistit, kdy nemocný dosáhne hodnoty kreatininu 700 $\mu\text{mol/l}$, která je považována za indikaci zahájení hemodialyzační léčby. Tento časový interval se však může zkrátit. Interkurentní onemocnění (dehydratace, močová infekce) mohou vést k dočasnému zhoršení renální funkce, která se po překonání komplikace obvykle nevrací k původní hodnotě, ale zůstává o něco nižší [75].



Obr. 72 Převrácená hodnota kreatinémie jako ukazatel vývoje renální insuficience. Žlutá křivka naznačuje stav po proběhlém onemocnění.

4.5.7 Stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu, tryptofanu v biologickém materiálu

První měření neopterinu v moči pacientů s malignitami a virovými infekcemi pomocí HPLC bez úpravy vzorků moči použil Wachter v roce 1979. Tuto metodu potom pro klinické aplikace dále zpracoval Hausen 1982. Modifikovanou verzi pro stanovení neopterinu v séru vypracoval Werner 1987. Následně potom další autoři publikovali použití radioimmunoassay (RIA) techniky pro stanovení neopterinu v různých biologických vzorcích. Korelace mezi stanovením RIA a HPLC je dobrá a technika RIA je využívána pro rutinní stanovení. Její hlavní nevýhodou je práce s radionuklidy. Tyto dvě techniky jsou v současné době nejčastěji užívanými metodami pro stanovení neopterinu v biologických materiálech.

ELISA je také jednou z komerčně dostupných metod. Principem metody je vazba antigen-protilátka. Neznámé množství antigenu soutěží s ukotveným antigenem značeným enzymem o vazbu v roztoku rozpuštěnými protilátkami. Následně je nenavázaný antigen vymyt pryč. Intenzita zbarvení je pak nepřímo úměrná koncentraci antigenu. Nicméně stanovení HPLC je dosud považováno za standardní techniku a referenční metodu. Využívané stacionární fáze pro stanovení neopterinu v séru nebo v moči jsou částicové reverzní fáze C18, popřípadě C8 o velikostech 250 x 4,0 mm a 4,6 mm s velikostí částic 7 - 3 μ m.

A. A. Dutov použil pro separaci neopterinu reverzní fázi C16 o velikosti 100 x 4,0 mm s 5 μ částicemi.

Neopterin a jeho deriváty byly také separovány pomocí hybridní stacionární fáze obsahující ethylenové můstky a amidovou skupinu (BEH-amid) HILIC. Neopterin a jeho tři deriváty byly separovány do osmi minut. Byly testovány různé poměry mobilní fáze ve složení amoniumacetátový pufr 50 mmol/l : acetonitril. Nejlepší separace bylo dosaženo v rozmezí pH 4,8 - 7,8 při nižších koncentracích pufru.

Mobilní fázi pro stanovení kynureninu tvoří nejčastěji fosfátový pufr o koncentraci 15 mmol/l o pH 6,4 - 6,8 a průtoku 0,8 - 1,5 ml/min, popřípadě směs acetonitrilu a vody (1 : 99).

Neopterin je detekován fluorescenčně při vlnových délkách exc. 353 nm a em. 438 nm (popř. ex. 350, em. 450 nm). Pro korekci diurézy je nutno stanovit také kreatinin, který je nejčastěji detekován v UV oblasti při 235 nm.

Mobilní fázi tvoří směs vody někdy s přidavkem octanu amonného (0,1 M pH 4,6), kyseliny octové nebo fosfátového pufru a malé procento organického rozpouštědla (acetonitril, methanol). Jianxing Zhao vyvinul metodu pro stanovení kynureninu, kyseliny kynureninové a tryptofanu

s použitím vodné mobilní fáze obsahující směs octanu amonného (20 mmol/l), octanu zinečnatého (3 mmol/l) a 7% acetonitrilu. Nejčastější průtoky jsou v rozmezí 0,5 - 1,9 ml/min.

Kynurenin neposkytuje fluorescenci, proto bývá derivatizován nebo stanovován v UV oblasti při 230 nm. Tryptofan poskytuje fluorescenci (ex. 254 nm, em. 404 nm). Kynurenin a tryptofan lze stanovit také elektrochemicky .

Doposud nebyla vyvinuta metoda pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v séru.

Kapitola vypracována z následujících odkazů:

[145, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191]

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část je rozdělena na dvě části. První se zabývá vybranými vyvinutými metodami:

- Miniaturizace metody pro stanovení vitaminů A a E
- Stanovení kyseliny retinové v séru
- Stanovení neopterinu, kreatininu a kynureninu v moči
- Stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v séru
- Testování deep-UV-LED jako vhodného zdroje pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze

Druhá část, klinická, uvádí komentář k jednotlivým biomedicínským studiím.

5.1 Vybrané vyvinuté metodiky

5.1.1 Miniaturizace metody pro stanovení vitaminu A, E v séru

5.1.1.1 Úvod

V současné době jsou kladeny stále vyšší požadavky na stanovení látek v biologickém materiálu. Skupiny pacientů pro validní statistické vyhodnocení musí být stále větší, což znamená, že laboratoře jsou nuceny zpracovávat stále větší skupiny vzorků. Miniaturizace SPE extrakce v kombinaci s využitím monolitických stacionárních fází umožňuje zpracovat v krátkém čase velké série s malou spotřebou vzorku i rozpouštědel, což významně přispívá k ochraně životního prostředí.

5.1.1.2 Cíl

Cílem bylo vyvinout rychlou a jednoduchou metodu pro stanovení retinolu, alfa- a gama-tokoferolu v lidském séru s využitím monolitické kolony a speciálního autosampleru pro mikrotitrační destičky. Nově vyvinutá metoda navazuje na metodu stanovení retinolu a alfa-tokoferolu v séru s externí kalibrací na HPLC přístroji Perkin Elmer (Norwalk, USA) a liquid-liquid extrakcí [192] a na vyvinutou SPE extrakci pro tyto látky s vnitřní standardizací s využitím SPE kolonek Spe-ed Applier Separations (Allentown, USA).

5.1.1.3 Pracovní postup

Nejdříve byla vyvinuta SPE extrakce pro stanovení retinolu a alfa-tokoferolu v séru s vnitřní kalibrací, metoda byla optimalizována a plně validována na přístroji Perkin Elmer. Metodika SPE

extrakce s vnitřní kalibrací vycházela z metody SPE s vnější kalibrací [193]. Následně byl mezi analyty zahrnut gama-tokoferol, SPE postup byl miniaturizován a HPLC metoda převedena na přístroj Prominence LC 20 Shimadzu (Kyoto, Japonsko).

5.1.1.4 Výsledky

5.1.1.4.1 Extrakční postup SPE metody s vnitřním standardem

Vzorek krve byl odebrán z periferní žíly po dvanáctihodinovém lačnění, následně bylo centrifugací (1600 x g, 10 min, 4°C) separováno sérum.

Jako vnitřní standard byl testován tokoferol acetát a tokol. Před SPE extrakcí byl do zkumavky přidán roztok interního standardu a odpařen do sucha (4 µl - výsledná koncentrace = 20 µmol/l), následně bylo do téže zkumavky napipetováno 250 µl séra. Jako deproteinační činidlo byl použit chlazený ethanol (650 µl) po dobu 8 minut při 4°C. Deproteinovaný vzorek byl centrifugován (2000 x g, 15 minut, 4°C). V průběhu centrifugace byly aktivovány SPE kolonky (1 ml methanolu a 1 ml vody). Jako eluční činidlo byl použit hexan (2 ml). Eluát byl odpařen při 45°C dosucha, rozpuštěn v 250 µl methanolu a nastříknut do HPLC systému.

Jako SPE sorbent byly použity kolonky Spe-ed naplněné stacionární fází C18/18% (500 mg/3 ml) Applier Separations (Allentown, USA).



Obr. 73 Vakuový manifold pro SPE extrakci



Obr. 74 HPLC set Perkin Elmer



Obr. 75 Kolony Spe-ed C18 pro SPE extrakci

Parametry HPLC metody pro stanovení retinolu a alfa-tokoferolu s vnitřní kalibrací po SPE extrakci na přístroji Perkin Elmer:

Stacionární fáze: monolitická kolona Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Germany)

Mobilní fáze: methanol

Vnitřní standard: tokol c = 20 $\mu\text{mol/l}$

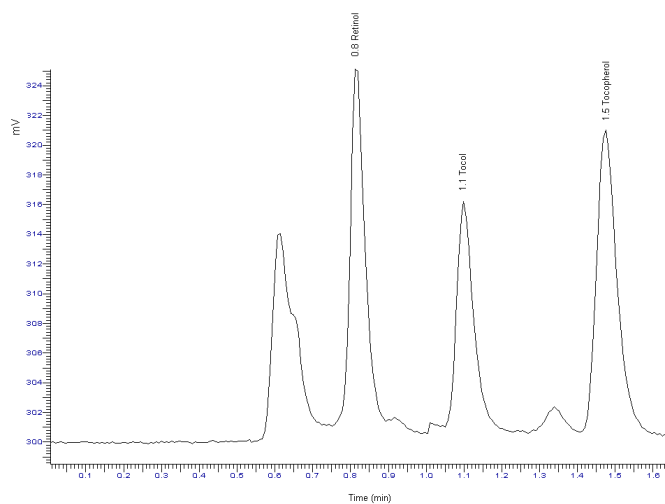
Průtok: 2,5 ml/min

Nástřik: 50 μl

Teplota: 25°C

Detekce: DAD (325 nm - retinol, 295 nm alfa-tokoferol a tokol)

Čas analýzy: 2 minuty



Obr. 76 Chromatogram lidského séra po SPE extrakci (retinol 2 $\mu\text{mol/l}$, alfa-tokoferol 20 $\mu\text{mol/l}$, tokol - IS)

Chromsystems lyofilizované sérum	naměřená hodnota/rozmezí	výtěžnost	opakovanost extrakce (plocha píku) RSD %
retinol	1,41/1,03 - 1,55 $\mu\text{mol/l}$	109,67	3,04
alfa-tokoferol	15,78/14,21 - 21,3 $\mu\text{mol/l}$	88,93	3,97

Tab. 25 Vybrané validační parametry SPE extrakce s vnitřní kalibrací, správnost - výtěžnost

5.1.1.4.2 Miniaturizace SPE extrakce

5.1.1.4.2.1 Parametry HPLC metody na přístroji Prominence LC 20

Stacionární fáze: monolitická kolona Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Německo)

Mobilní fáze: methanol

Průtok: 2,5 ml/min

Nástřik: 20 μl

Teplota: 25°C

Detekce: DAD (325 nm - retinol, 295 nm alfa- a gama-tokoferol)

Čas analýzy: 1,8 minuty

5.1.1.4.2.2 Příprava vzorku

Vzorek krve byl odebrán z periferní žíly po dvanáctihodinovém lačnění, následně bylo centrifugací (1600 x g, 10 min, 4°C) separováno sérum.

Výsledný extrakční postup:

50 μl séra bylo deproteinováno chlazeným ethanolem (170 μl) po dobu 8 minut při 25°C. Po centrifugaci (2000 x g, 20 minut, 4°C) byl odebrán supernatant a aplikován na aktivovaný sorbent SPE destičky (aktivace pomocí 500 μl methanolu a 500 μl vody).

Jako eluční činidlo byl použit hexan (400 μl). Po eluci byl vzorek odpařen do sucha při 45°C ve vakuovém koncentrátoru a následně rozpuštěn v 50 μl methanolu.

Jako SPE sorbent byly použity destičky Spe-ed naplněné stacionární fází C18/18% (100 mg/2 ml) Applier Separations (Allentown, USA).



Obr. 77 Vakuový manifold pro mikrotitrační destičky



Obr. 78 Mikrotitrační destičky pro SPE



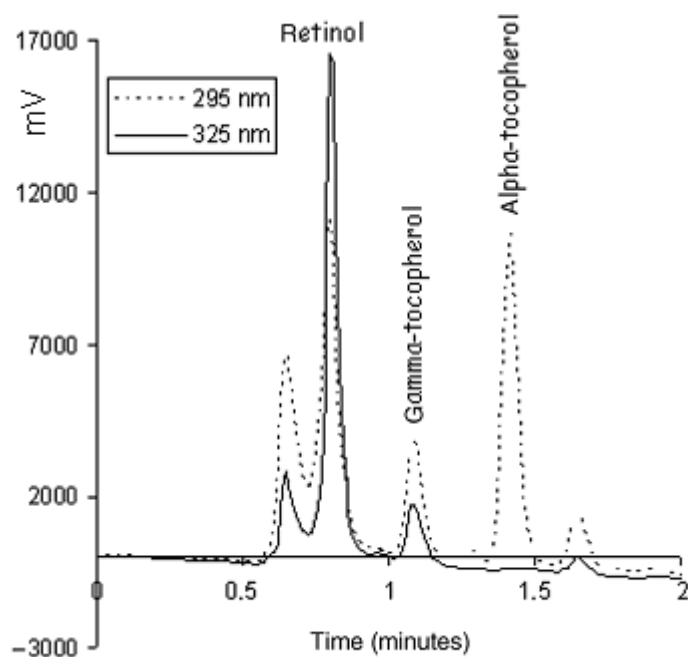
Obr. 79 Rotory na mikrotitrační destičky pro centrifugaci, odpařování a třepání



Obr. 80 HPLC set Prominence LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)



Obr. 81 Rack Changer - autosampler pro mikrotitrační destičky



Obr. 82 Chromatogram lidského séra po miniaturizaci SPE extrakce (retinol 1,95 $\mu\text{mol/l}$, gama-tokoferol 0,55 $\mu\text{mol/l}$, alfa-tokoferol 28,51 $\mu\text{mol/l}$)

5.1.1.4.2.3 Validace

Metoda byla plně validována dle platných norem [60, 61, 63, 65, 66]. Validace byla rozdělena na dvě části: test způsobilosti systému a vlastní validaci metody.

5.1.1.4.2.3.1 Test vhodnosti systému (SST)

Počet teoretických pater (N): byl vypočítán dle vzorce $N = 5,545 \cdot (t_R/W_{0,5})$

$W_{0,5}$ je šířka píků v polovině výšky, t_R je retenční čas

Výškový ekvivalent teoretického patra (HETP, H): $HETP = L/N$

N počet teoretických pater, L je délka kolony

Asymetrie píku (T): $T = W_{0,05}/2f$

$W_{0,05}$ šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, f kratší část úsečky, která vznikne protnutím ramen píku a je rozdělena kolmicí spuštěnou z vrcholu na dvě části

Rozlišení píků (R): $R_{ij} = 2 \cdot (T_R - T_{Rj}) / (W_i + W_j)$

T_{R2} , T_{R1} retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků

W_i , W_j úsek na základní linii (šířka píku na základně)

	W _{0,05} (min)	T _R (min)	N	HETP (μm)	W _{0,01} (min)	f (min)	T	W (min)	T _R (min)	R
retinol	0,04	0,799	2213	45	0,27	0,05	1,20	0,210	0,80	1,29
gama- tokoferol	0,05	1,290	3280	30	0,05	0,02	1,26	0,170	1,29	0,65
alfa- tokoferol	0,05	1,412	3936	28	0,13	0,04	1,52	0,202	1,41	

Tab. 26 SST-vybrané validační parametry

Opakovatelnost nástřiku a opakovatelnost extrakce: Pro opakovatelnost nástřiku a opakovatelnost extrakce byla vypočítána relativní směrodatná odchylka RSD retenčního času a plochy píku z deseti vzorků. Opakovatelnost extrakce a nástřiku je uvedena v tabulce 28.

5.1.1.4.2.3.2 Vlastní validace metody

Správnost: Správnost byla stanovena jako výtěžnost na dvou koncentračních úrovních použitím lyofilizovaného kontrolního séra pro vitamin A, E firmy Chromsystems Do séra byl metodou standardního přídatku přidán gamma-tokoferol. Hodnoty retinolu a alfa-tokoferolu byly vždy v daném koncentračním rozmezí kontrolního séra. Výtěžnost extrakce analytů je uvedena v tabulce 28.

control set Chromsystems	Level 1 (naměřená hodnota/rozmezí)	Level 2 (naměřená hodnota/rozmezí)
retinol	1,67/1,42 - 2,13	3,22/2,75 - 4,12
alfa-tokoferol	14,1/14,1 - 24,2	27,3/26,7 - 46,1

Tab. 27 Střední hodnoty a rozmezí pro stanovení vitamínu A a E v kontrolním séru Chromsystems

Linearita: Linearita byla statisticky zpracována dle programu LINREGRE, vyvinutém na Katedře biofyziky a fyzikální chemie FaF HK a stanovena v rozsahu šesti koncentračních úrovní (n = 3) pro každý analyt, tj. v rozmezí 0,25 - 10,0 μmol/l pro retinol, 0,5 - 50 μmol/l pro alfa-tokoferol, 0,5 - 50 μmol/l pro gama-tokoferol.

Limit detekce a kvantifikace (LOD, LOQ): LOD a LOQ byl vypočítán jako pětinasobek a desetinásobek směrodatné odchylky šumu [70].

	retinol	gama-tokoferol	alfa-tokoferol
opakovatelnost extrakce - koncentrace (RSD %)	5,65	1,66	5,51
opakovatelnost extrakce - retenční čas (RSD %)	0,41	0,38	0,83
správnost (% výtěžnost L1/L2)	93,9/78,9	85,6/88,9	73,4/75,8
opakovatelnost nástřiku n = 10 (RSD %)	5,65	1,66	5,51
kalibrace - rozsah ($\mu\text{mol/l}$)	0,25 - 10,00	0,5 - 50,00	0,5 - 50,0
rovnice	$Y = 24488,31x + 7277,149$	$Y = 1681x - 26,198$	$Y = 1380,7 x - 85,139$
korelační koeficient	0,9998	0,9999	0,9999
LOD ($\mu\text{mol/l}$)	0,130/0,037	0,006/0,0025	0,09/0,039
LOQ ($\mu\text{mol/l}$)	0,27/0,077	0,01/0,0041	0,19/0,083

Tab. 28 Vybrané validační parametry - opakovatelnost, správnost, linearita, limit detekce a kvantifikace (L1/L2 - koncentrační úrovně)

Selektivita: Selektivita metody byla testována pomocí DAD detektoru porovnáním absorpčních spekter analytu a standardu.

Stabilita: Stabilita zásobních a pracovních roztoků byla testována při teplotách 4°C, - 25°C, - 80°C. Zásobní a pracovní roztok standardu retinolu je stabilní po dobu šesti měsíců při teplotě - 25°C, roztoky alfa- a gama-tokoferolu po dobu šesti měsíců při teplotě 4°C. Stabilita vitamínu A a E v séru byla zjištěna v předchozích studiích.

5.1.1.5 Závěr

Kombinace monolitických stacionárních fází s moderním SPE sorbentem výrazně urychlila a zjednodušila preanalytickou i analytickou fázi. Díky miniaturizaci SPE metody došlo ke snížení spotřeby vzorku i rozpouštědel (viz. tabulka 29). Autosampler Rack Changer SIL - 20AC uchovává extrahované vzorky před analýzou v chladu a temnu. Speciální krytka na destičkách zabraňuje odpaření a zakoncentrování vzorku.

	LLE (serie 8 vz)	SPE (serie 8 vz)	miniSPE (serie 96 vz)
čas potřebný na zpracování/vz	5 minut	6,6 minut	0,7 minut
spotřeba rozpouštědel/ vz	3 400 µl	4 875 µl	1920 µl
spotřeba vzorku	500 µl	250 µl	50 µl

Při kalkulaci času potřebného na zpracování jednoho vzorku byla započítána doba na pipetování, odebrání supernatantu atd.

Tab. 29 Porovnání jednotlivých extrakčních metodik

Tato metoda byla vyvinuta pro klinické sledování nutričního stavu pacientů Kliniky gerontologické a metabolické a onkologických pacientů po chemoterapii a radioterapii ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

Předepsaná metoda byla včetně praktického použití publikována v časopise *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* s IF 1,703. Na toto téma byla v naší laboratoři vypracována a obhájena diplomová práce Mgr. Kláry Dědečkové a Erasmus report portugalské studentky Catii Ascensao z University of Porto v Portugalsku [194, 195].

5.1.2 Stanovení kyseliny retinové v séru

5.1.2.1 Úvod

Monitorování sérových hladin all-trans retinové kyseliny je důležité zejména u pacientů s akutní promyeloidní leukémií léčených touto kyselinou. Vysoké dávky kyseliny retinové mohou způsobit tzv. retinoidní syndrom, který se projevuje vysokými horečkami, hypotenzí, akutní respirační tísní, pleurálními a perikardiálními výpotky, dušností, edémem, zvýšením hmotnosti, hepatálním, renálním a multiorgánovým selháním.

Metabolismus kyseliny 13-cis retinové a all-trans retinové je často pozměněn během některých nádorových onemocnění. Retinoidy jsou také aktivně zkoumány pro prevenci nádorových onemocnění.

5.1.2.2 Cíl

Cílem bylo vyvinout metodu pro stanovení kyseliny retinové, retinolu, alfa- a gama-tokoferolu v séru s vnitřní standardizací pro monitoring v klinickém výzkumu.

5.1.2.3 Výsledky

5.1.2.3.1 Parametry HPLC metody

HPLC set: Perkin Elmer (Norwalk, USA)

Vnitřní standard: tokol 20 $\mu\text{mol/l}$

Stacionární fáze: monolitická kolona Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Německo)

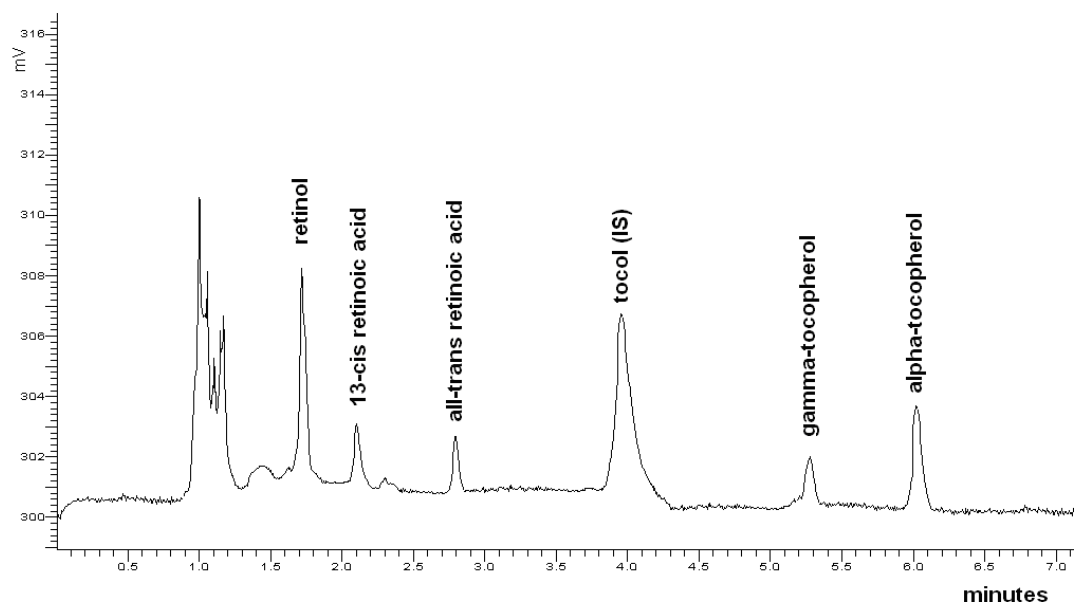
Mobilní fáze a průtok: Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitril (ACN) a 1% ammonium acetát (AMC) o pH 7,0 v poměru 95 : 5 (v/v). Kolona byla nejdříve reekvilibrována mobilní fází ACN/AMC 98 : 2 po dobu 1 minuty při průtoku 2,0 ml/min. Pro separaci látek byla použita mobilní fáze ACN/AMC 95 : 5 (v/v), po dobu 4 minut při průtoku 1,5 ml/min, následně 3 minut při průtoku 3,2 ml/min.

Nástřik: 20 μl

Teplota: 25°C

Detekce: DAD (325 nm - retinol, all-trans a 13-cis kyselina retinová, 295 nm alfa-, gama-tokoferol a tokol - IS)

Čas analýzy: 7,2 minuty



Obr. 83 Chromatogram lidského séra (retinol 0,99 $\mu\text{mol/l}$, all-trans retinová kyselina 0,33 $\mu\text{mol/l}$, 13-cis retinová kyselina 0,50 $\mu\text{mol/l}$, tokol-IS, gama-tokoferol 7,44 $\mu\text{mol/l}$, alfa-tokoferol 22,56 $\mu\text{mol/l}$)

5.1.2.3.2 Extrakční postup SPE metody s vnitřním standardem

Výsledný extrakční postup vychází z metody pro stanovení vitamínu A a E v séru s vnitřní standardizací. Odlišnost nového pracovního postupu spočívá ve snížení teploty odpařování a způsobu skladování biologického materiálu. Analyzové sérum je nutno uchovávat ve tmě a během extrakce je zapotřebí používat pouze tmavé laboratorní sklo.

Vzorek krve byl odebrán z periferní žíly po dvanáctihodinovém lačnění, následně bylo centrifugací (1600 x g, 10 min, 4°C) separováno sérum.

Jako vnitřní standard byl zvolen tokol. Před SPE extrakcí byl do zkumavky přidán roztok interního standardu a odpařen do sucha (4 µl - výsledná koncentrace = 20 µmol/l), následně bylo do téže zkumavky napipetováno 250 µl séra. Jako deproteinační činidlo byl použit chlazený ethanol (650 µl) po dobu 8 minut při 4°C. Deproteinovaný vzorek byl centrifugován (2000 x g, 15 minut, 4°C). V průběhu centrifugace byly aktivovány SPE kolony (1 ml methanolu a 1 ml vody). Jako eluční činidlo byl použit hexan (2 ml). Eluát byl odpařen při 35°C dosucha, rozpuštěn v 250 µl methanolu a nastříknut do HPLC systému.

Jako SPE sorbent byly použity kolony Spe-ed naplněné stacionární fází C18/18% (500 mg/3 mL) Applier Separations (Allentown, USA)

Metoda byla validována využitím stejných validačních parametrů jako metoda v kapitole 4.1.1

5.1.2.3.3 Vybrané validační parametry

	W _{0,05} (min)	T _R (min)	N	HETP (µm)	W _{0,01} (min)	f (min)	T	W (min)	T _R (min)	R
retinol	0,07	1,77	3745	27	0,17	0,0688	1,21	0,20	1,77	1,68
13-cis retinová kyselina	0,06	2,13	4313	23	0,16	0,06	1,25	0,23	2,13	2,99
all-trans retinová kyselina	0,52	2,90	8290	12	0,25	0,11	1,15	0,29	2,90	3,71
tokol	0,78	3,96	8821	11	0,47	0,23	1,00	0,29	3,96	5,64
gama- tokoferol	0,12	5,49	8236	12	0,25	0,12	1,08	0,28	5,49	2,83
alfa- tokoferol	0,12	6,34	9668	10	0,34	0,13	1,38	0,34	6,34	

Tab. 30 Vybrané validační parametry SST

analyt	level			přesnost (intra-day) opakovatelnost metody	
	vypočítaná c ($\mu\text{mol/l}$)	změřená c ($\mu\text{mol/l}$)	recovery (%)	n	plocha (RSD %) / retenční čas (RSD %)
retinol	1,64	1,35	82,30	10	2,39/1,95
	3,58	3,05	85,19	10	2,89/0,64
13-cis retinová kyselina	1,00	1,00	100,00	10	1,31/1,22
	2,20	2,06	93,64	10	2,90/0,95
all-trans retinová kyselina	1,00	0,74	74,00	10	2,67/2,13
	2,20	1,55	70,50	10	2,19/2,10
alfa-tokoferol	10,00	9,81	98,10	10	2,16/1,38
	20,00	17,39	87,00	10	3,09/1,59
gama-tokoferol	17,60	15,17	88,71	10	1,94/1,49
	36,70	28,03	77,10	10	2,69/1,44

Tab. 31 Vybrané validační parametry: výtěžnost a přesnost (c - koncentrace)

analyt	rovnice kalibrační přímky	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
retinol	$Y = 0,8247x + 0,0177$	0,9998	0,03	0,06
13-cis retinová kyselina	$Y = 0,779x - 0,0104$	0,9997	0,04	0,09
all-trans retinová kyselina	$Y = 0,7038x + 0,0434$	0,9995	0,06	0,12
gama-tokoferol	$Y = 0,0341x + 5 \cdot 10^{-5}$	0,9999	0,60	1,20
alfa-tokoferol	$Y = 0,027x - 0,0133$	0,9998	1,00	2,00

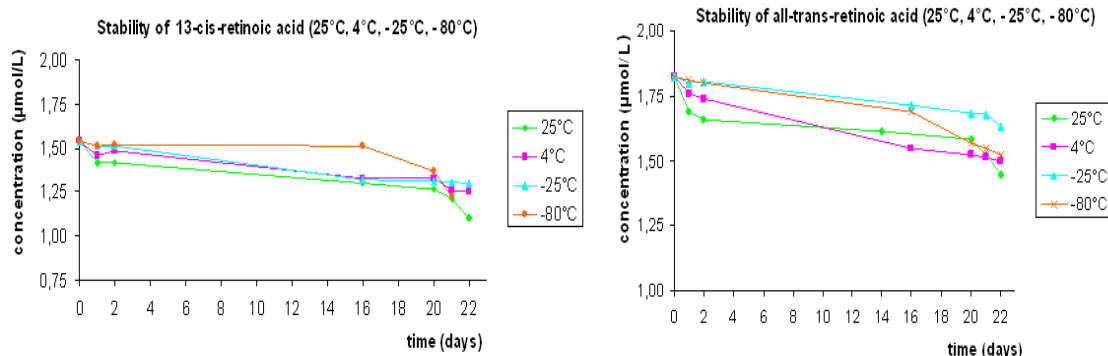
Tab. 32 Vybrané validační parametry: linearita, LOD a LOQ

Robustnost

Robustnost byla měřena jako změna pH a složení mobilní fáze. Retenční časy analytů nebyly ovlivněny změnou pH mobilní fáze kromě kyseliny retinové (14%). Malé změny složení mobilní fáze (12%) ovlivní retenci tokoferolů (9%) a plochy všech analytů (5%). Rozlišení látek všech zůstává zachováno.

Stabilita

Stabilita analytů byla stanovena u pracovních a zásobních roztoků. Kyselina retinová je velmi citlivá na světlo, proto byly všechny vzorky pro stabilitní studii uchovávány ve tmě. Před analýzou byl vždy připraven směsný vzorek z roztoků jednotlivých standardů (retinol, alfa-, gama-tokoferol, 13-cis a all-trans kyselina retinová). Bylo zjištěno, že tuto směs nelze skladovat pro další použití, proto musela být před každou analýzou připravena z jednotlivě skladovaných roztoků. Roztoky byly uchovávány při teplotách 25°C, 4°C, - 25°C a - 80 °C. Kyselina retinová je stabilní při teplotě - 25°C po dobu 22 dní, kyselina 13-cis retinová při teplotě - 80°C po dobu 16 dní. Zásobní a pracovní roztok standardu retinolu je stabilní po dobu šesti měsíců při teplotě - 25°C, roztoky alfa- a gama-tokoferolu po dobu šesti měsíců při teplotě 4°C.



Obr. 84 Stabilita kyseliny all-trans a 13-cis retinové v zásobním roztoku při jednotlivých teplotách

5.1.2.4 Závěr a diskuze

Tato metoda může být použita pro monitorování hladin kyseliny retinové, retinolu a alfa- a gama-tokoferolu v séru u pacientů s promyeloidní leukémií léčených kyselinou retinovou. Metoda díky použití monolitické stacionární fáze umožňuje separaci pěti látek během sedmi minut. Použití amonium acetátu zlepšuje symetrii píku látek s karboxylovou skupinou (kyselina retinová). Amonium acetát je chemicky stabilní ve vodě i v methanolu a vhodný k maskování zbytkových silanolových skupin. Metoda byla publikována v časopise *Journal of Separation Science* s IF 2,551. Na toto téma byla v naší laboratoři vypracována a obhájena diplomová práce Mgr. Hany Vlčkové [196].



Obr. 85 Tretinoin (Vesanoïd)

5.1.3 Stanovení neopterinu, kreatininu a kynureninu v moči

5.1.3.1 Úvod

Pro vývoj této metody jsme použili novou hybridní stacionární fázi tzv. Gemini-Twin technologii, která umožnila měřit větší série vzorků (až 1000 analýz/1 kolonu) než v případě polymerní kolona Asahipack C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, která byla použita v předchozích stanoveních. Hybridní stacionární fáze je kombinace polymeru a silikagelu, což přináší řadu výhod. Stacionární fáze je mechanicky odolnější a má vyšší účinnost než polymer, přitom vydrží větší rozsah pH (1 - 12) než silikagel.

5.1.3.2 Cíl

Cílem bylo vyvinout a validovat HPLC metodu pro stanovení neopterinu, kynureninu, kreatininu a kyseliny močové v moči s jednoduchou přípravou vzorku, která bude vhodná pro měření velkých sérií vzorků.

5.1.3.3 Výsledky

5.1.3.3.1 Parametry HPLC metody na přístroji Prominence LC 20

Stacionární fáze: hybridní částicová kolona Gemini-Twin C18, 3,0 x 150 mm, 5 µm, 110 Å

Mobilní fáze: fosfátový pufr ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 15 mmol/l, pH 6,45

Průtok: 0,8 ml/min

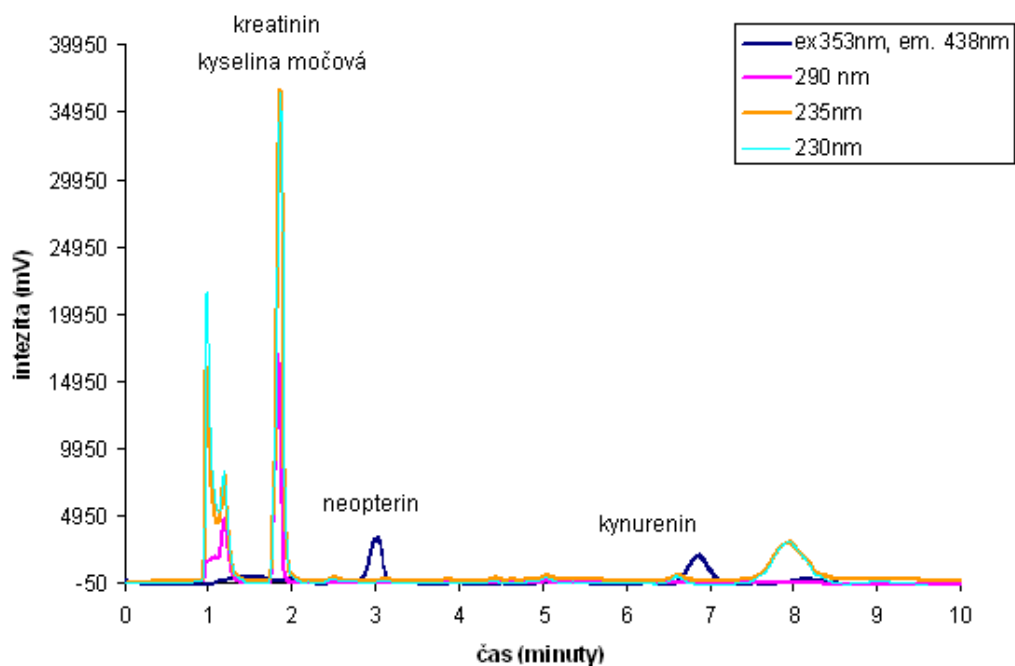
Nástřik: 1 µl

Teplota: 25°C

Detekce: DAD: 235 nm - kreatinin, 290 nm - kyselina močová, 230 nm - kynurenin,

Fluorescenční detekce: neopterin excitační vlnová délka 353 nm, emisní vlnová délka 438 nm

Čas analýzy: 10 minut



Obr. 86 Separace neopterinu, kreatininu, kynureninu a kyseliny močové v moči

5.1.3.3.2 Příprava vzorku

Dříve byla moč před analýzou centrifugována v mikrocentrifuze po dobu 45 s při $12\,000 \times g$, naředěna 1 : 10 fosfátovým pufrům o pH 6,45 a filtrována pomocí 0,2 μm filtrů. Tento proces byl převeden na mikrotitrační destičky obsahující filtry s použitím speciálního manifoldu pro tyto destičky.



Obr. 87 Starší, časově náročný způsob přípravy vzorku



Obr. 88 Zařízení pro filtraci vzorků s využitím mikrotitračních destiček

5.1.3.3 Vybrané validační parametry

	rovnice kalibrační přímky	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
neopterin	$Y = 322,65x - 145,98$	0,9998	0,000004	0,00001
kreatinin	$Y = 520,45x - 6851,1$	0,9996	0,004400	0,00148
kynurenin	$Y = 726726x - 9582,9$	0,9991	0,000174	0,00058

Tab. 33 Vybrané validační parametry: LOD, LOQ a linearita [70]

	T_R (min)	N	HETP (μm)	T
neopterin	3,01	9415	16	1,25
kreatinin	1,81	4356	34	1,00
kynurenin	6,71	5204	29	1,40

Tab. 34 Vybrané validační parametry SST

Při vývoji metody jsme testovali celkem 12 typů stacionárních fází jako nejvhodnější jsme vybrali tyto fáze: Poroshell, částicovou kolonu a monolitickou kolonu.

- Ascentis Express C18, 150 x 3 mm, Supelco (Bellefonte, USA), průtok 0,3 ml/min
- Synergi 4 μ HYDRO - RP 80 A, 150 x 3 mm, Phenomenex (Torrance, USA), průtok 0,6 ml/min
- Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo), průtok 1,2 ml/min

Byly hodnoceny následující validační parametry:

- Účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater N
- Asymetrie píků T
- Rozlišení píků R

- Opakovatelnost metody (extrakce) vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka RSD
- Opakovatelnost nástřiku vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka RSD

opakovatelnost nástřiku (RSD %)	neopterin		kreatinin		kys. močová		kynurenin	
	T _R	plocha	T _R	plocha	T _R	plocha	T _R	plocha
Ascentis Express C18, 150 x 3 mm	0,19	1,00	0,16	0,76	0,11	1,07	0,23	2,90
Synergi 4 μm HYDRO - RP 80 Å, 150 x 3 mm	0,03	0,89	0,18	0,30	0,24	0,47	0,37	0,94
Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm	0,14	2,26	0,22	2,84	0,29	0,93	0,46	2,13

Tab. 35 Opakovatelnost nástřiku (retenční čas a plocha píku) pro jednotlivé stacionární fáze

Validační parametry jednotlivých stacionárních fází

- Ascentis Express C18, 150 x 3 mm, Supelco (Bellefonte, USA), průtok 0,3 ml/min, celkový čas analýzy: 9 minut

	T _R (min)	N	HETP (μm)	T
neopterin	3,80	4144	36	1,25
kreatinin	2,79	1978	78	1,17
kynurenin	7,24	9181	16	1,00
kyselina močová	2,46	1847	81	1,19

Tab. 36 Účinnost, výškový ekvivalent teoretického patra a asymetrie píku u kolony Ascentis Express

- Synergi 4 μ HYDRO - RP 80 A, 150 x 3 mm, Phenomenex (Torrance, USA), průtok 0,6 ml/min, celkový čas analýzy: 10 minut

	T _R (min)	N	HETP (μm)	T
neopterin	3,89	1889	79	1,14
kreatinin	2,59	3951	38	1,50
kynurenin	9,44	11188	13	1,28
kyselina močová	2,18	4110	37	1,07

Tab. 37 Účinnost, výškový ekvivalent teoretického patra a asymetrie píku u kolony Synergi Hydro-RP

- Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo), průtok 1,2 ml/min, celkový čas analýzy: 5 minut

	T _R (min)	N	HETP(μm)	T
neopterin	2,17	2377	42	1,06
kreatinin	1,67	5010	20	1,20
kynurenin	4,16	5691	18	1,13
kyselina močová	1,51	6578	15	1,20

Tab. 38 Účinnost, výškový ekvivalent teoretického patra a asymetrie píku u kolony Chromolith

Rozlišení:

Během měření jednotlivých vzorků moči jsme při absorbanci 290 nm identifikovali pík kyseliny močové v čase 1,78 min. Pík kreatininu při 235 nm byl v čase 1,81 min. Kyselina močová by ve stanovení neměla vadit, protože tato látka neabsorbuje při 235 nm a její koncentrace (výška píku) je vždy v moči nižší, nicméně by bylo možno tyto dvě látky separovat, např. upravením složení mobilní fáze.

5.1.3.4 Závěr

Jako nejvhodnější chromatografická kolona podle stanovených validačních parametrů, byla vybrána kolona Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo) s průtokem 1,2 ml/min, vzhledem k výraznému zkrácení doby analýzy. Ovšem při hodnocení jednotlivých ploch píků směsného vzorku standardu, se zdá, že kolona Chromolith Performance výrazně snižuje LOD a LOQ stanovovaných analytů v séru. Proto je nutno tento parametr u jednotlivých kolon ještě prověřit a aplikovat ho na koncentrace těchto látek v lidské moči. Podle prvního jednoduchého srovnání je nejvhodnější kolonou kolona Ascentis Express, ovšem tato kolona generuje velmi vysoké zpětné tlaky a její životnost při stanovování vzorků biologického materiálu není velmi dlouhá, což naopak neplatí v případě kolony Chromolith. Ve vývoji a optimalizaci této metody se bude dále pokračovat.

plocha píku	Ascentis Express C18, 150 x 3 mm	Synergi HYDRO - RP 4 μ, 80 Å, 150 x 3 mm	Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm	Gemini-Twin C18, 3,0 x 150, 5 μm
neopterin	64912	36218	21149	32984
kreatinin	1066074	521835	266303	435660
kynurenin	25215	12352	636	10259
kys. močová	94899	138333	7211	37156

Tab. 39 Porovnání ploch píků směsi standardů u jednotlivých kolon

Na toto téma byla v naší laboratoři vypracována a obhájena diplomová práce Mgr. Veroniky Prokopové a Erasmus report portugalské studentky Mary Martins z University of Porto v Portugalsku [197, 198].

5.1.4 Stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru

5.1.4.1 Úvod

Výhodou stanovení neopterinu a dalších analytů v séru je jeho využití u pacientů, u kterých nelze stanovit hladinu neopterinu v moči, zejména při onemocnění ledvin. U pacientů s pokročilým onemocněním ledvin (včetně selhání ledvin) se velice často objevuje tzv. "mikrozánět" podmíněný "uremií" nebo "dialýzou". Tento zánět prokazatelně zhoršuje jejich prognózu. Měření neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v séru by tedy mohlo vypovídat o probíhajícím mikrozánětu a efektivitě jeho léčby. Dále je popisováno zvýšení neopterinu při rejekci transplantované ledviny, což je příčinou zhoršení funkce štěpu. Neopterin se tak může stát důležitým prognostickým markerem u řady onemocnění, např. při selhání ledvin u diabetes mellitus, při aterosklerotickém či nádorovém poškození ledvin, u pacientů léčených hemodialýzou. Stejným způsobem se uplatňuje stanovení neopterinu v séru v gerontologii.

5.1.4.2 Cíl

Cílem bylo vyvinout jednoduchou, rychlou metodu pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru, kterou by bylo možno použít pro velké série vzorků.

5.1.4.3 Výsledky

Pro tuto metodu jsme testovali následující monolitické stacionární fáze:

- Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
- Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 3,0 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
- Chromolith Performance RP - 18e, 50 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)

Monolitické kolony byly zkoušeny na směsi standardů jednotlivých látek s různými průtoky mobilní fáze. Jako mobilní fáze byl vždy použit fosfátový pufr (15 mMol/l, pH 6,45). Dle testovaných parametrů (HETP a T) byla vybrána kolona Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm jako stacionární kolona s nejvyšší účinností.

Porovnávání validační parametry jednotlivých kolon s vybranými průtoky:

kolona	neopterin		kreatinin		kynurenin		tryptofan	
	plocha	HETP	plocha	HETP	plocha	HETP	plocha	HETP
monolit 4,6 x 100 (1,5 ml/min)	20705	54	668210	31	1723	13	625926	11
monolit 3,0 x 100 (1,5 ml/min)	21261	235	67635	219	1343	74	627613	23
monolit 3,0 x 100 (1,0 ml/min)	29149	165	109923	134	2802	32	837241	20
monolit 3,0 x 100 (grad ml/min)	54520	93	2010612	56	4035	18	472368	6

Tab. 40 Výškový ekvivalent teoretického patra pro kolony Chromolith [69]

kolona	neopterin		kreatinin		kynurenin		tryptofan	
	T _R	T faktor	T _R	T faktor	T _R	T faktor	T _R	T faktor
monolit 4,6 x 100 (1,5 ml/min)	1,87	1,23	1,44	1,70	3,70	1,27	8,74	1,30
monolit 3,0 x 100 (1,5 ml/min)	0,84	1,14	0,59	1,65	1,58	1,19	3,74	0,76
monolit 3,0 x 100 (1,0 ml/min)	1,14	1,21	0,88	1,88	2,70	0,88	4,85	0,86
monolit 3,0 x 100 (grad ml/min)	2,24	1,30	1,70	1,51	4,12	1,01	6,22	0,81

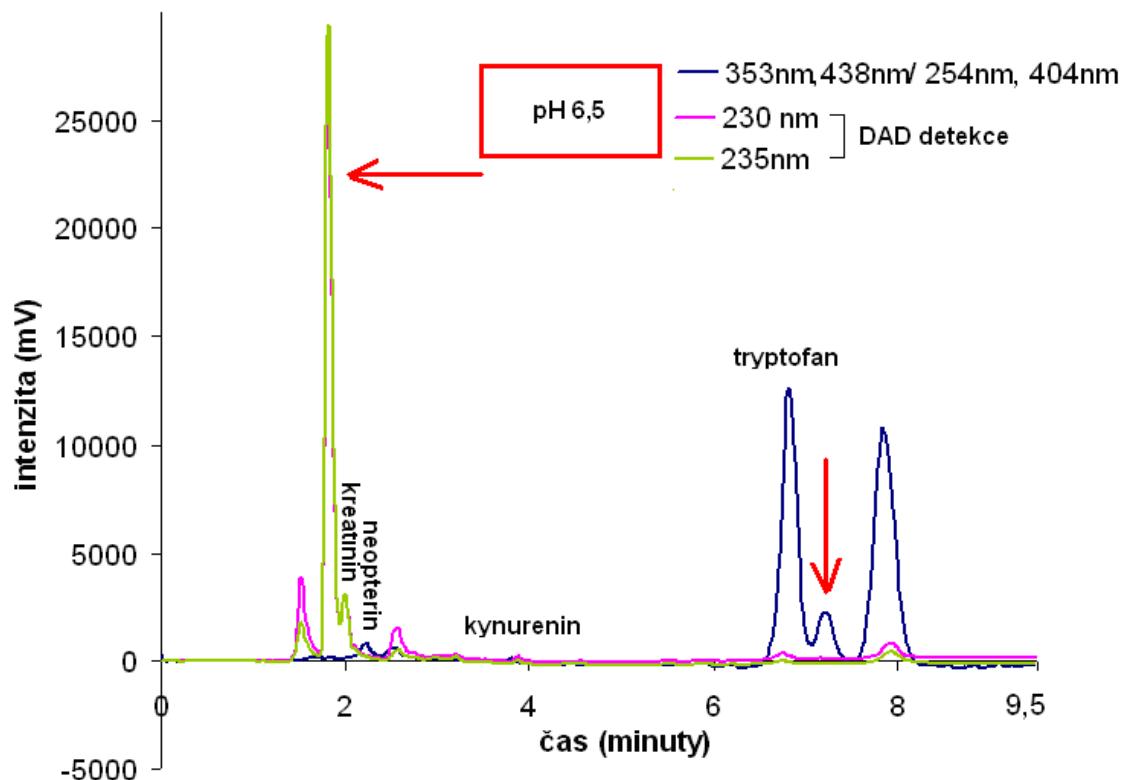
Tab. 41 Retenční časy jednotlivých analytů a asymetrie píků pro jednotlivé kolony Chromolith [69]

Při nástřihu biologického materiálu na kolonu nedošlo u některých sér k úplné separaci píku kreatininu a tryptofanu (koeluce s nečistotou). Nečistotu nebylo možno z extraktu odstranit ani změnou podmínek úpravy vzorku, protože bylo nutno zachovat jednoduchost a rychlost přípravy. Vzorek byl pouze centrifugován, deproteinován a filtrován. Nečistotu se nepodařilo separovat ani zapojením dvou monolitických kolon Chromolith Performance RP - 18e, 100 x 4,6 mm, navíc došlo k velké retenci neopterinu a tryptofanu a následnému prodloužení času analýzy. Výsledná metoda byla vyvinuta využitím sériového zapojení dvou monolitických kolon Chromolith Performance RP - 18e, 50 x 4,6 mm (předseparace) a 100 x 3,0 mm (separace - zlepšení tvaru píků) a zařazením monolitické předkolony (předčištění vzorku).

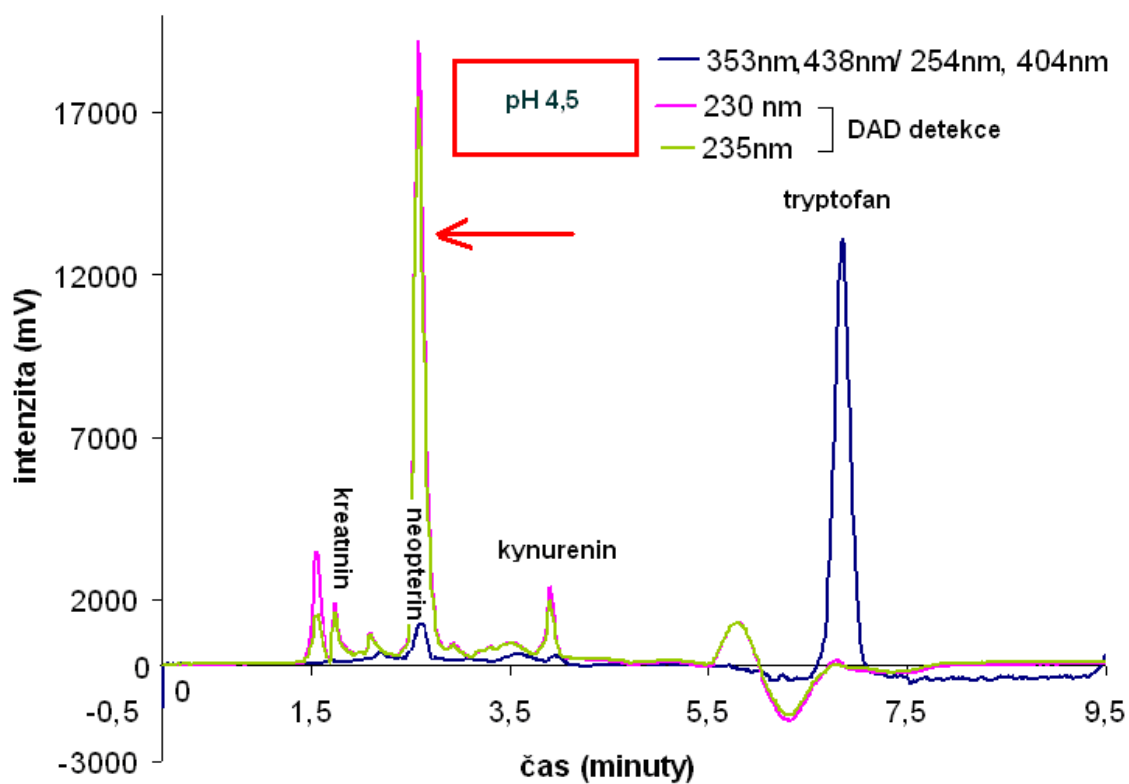


Obr. 89 Spojení monolitických kolon s předkolonou použité pro separaci látek (50 x 4,6 mm + 100 x 3,0 mm)

Později bylo zjištěno, že separaci nečistoty lze významně ovlivnit změnou pH mobilní fáze. Jako nejoptimálnější se jevílo pH 4,5.



Obr. 90 Séroum pacienta s onkologickým onemocněním při pH mobilní fáze 6,5 (šipky naznačují nečistoty)



Obr. 91 Séroum pacienta s onkologickým onemocněním při pH mobilní fáze 4,5 (šipky naznačují nečistoty). Stejný vzorek séra jako na Obr. 90

5.1.4.3.1 Parametry HPLC metody na přístroji Prominence LC 20

Stacionární fáze: Chromolith Performance RP - 18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm, předkolona

Chromolith RP - 18e, 10 x 4,6 mm

Mobilní fáze: fosfátový pufr ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 15 mmol/l, pH 4,51

Průtok: 1 ml/min - 3,09 min, 2,3 ml/min - 5,1 min

Nástřík: 1 μl

Teplota: 25°C

Detekce: DAD: 235 nm - kreatinin, 230 nm - kynurenin

Fluorescenční detekce: neopterin excitační vlnová délka 353 nm, emisní vlnová délka 438 nm,
tryptofan excitační vlnová délka 254 nm, emisní vlnová délka 404 nm

Čas analýzy: 9,5 minuty

5.1.4.3.2 Příprava vzorku

K 200 μl séra bylo přidáno 100 μl fosfátového pufru (mobilní fáze). Směs byla deproteinována 100 μl ethanolu, promíchána a ponechána 10 minut při - 27°C (pro zlepšení deproteinace). Následně byla směs centrifugována (10 minut 14 000 x g) a supernatant byl filtrován s použitím mikrotitračních destiček s filtry (2 μm). Filtrát byl nastříknut do HPLC systému.

5.1.4.3.3 Validace

Metoda byla plně validována dle platných norem [63, 65, 66].

Vybrané validační parametry:

	rovnice kalibrační přímky	korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
neopterin	$Y = 261,93x + 1284,53$	0,9999	0,00050	0,00167
kreatinin	$Y = 232,47x - 296,73$	0,9999	0,25948	0,98493
kynurenin	$Y = 543,55x - 118,41$	0,9999	0,69505	0,23168
tryptofan	$Y = 7521,98x - 15790,80$	0,9999	0,161158	0,53719

Tab. 42 Linearita, LOD a LOQ

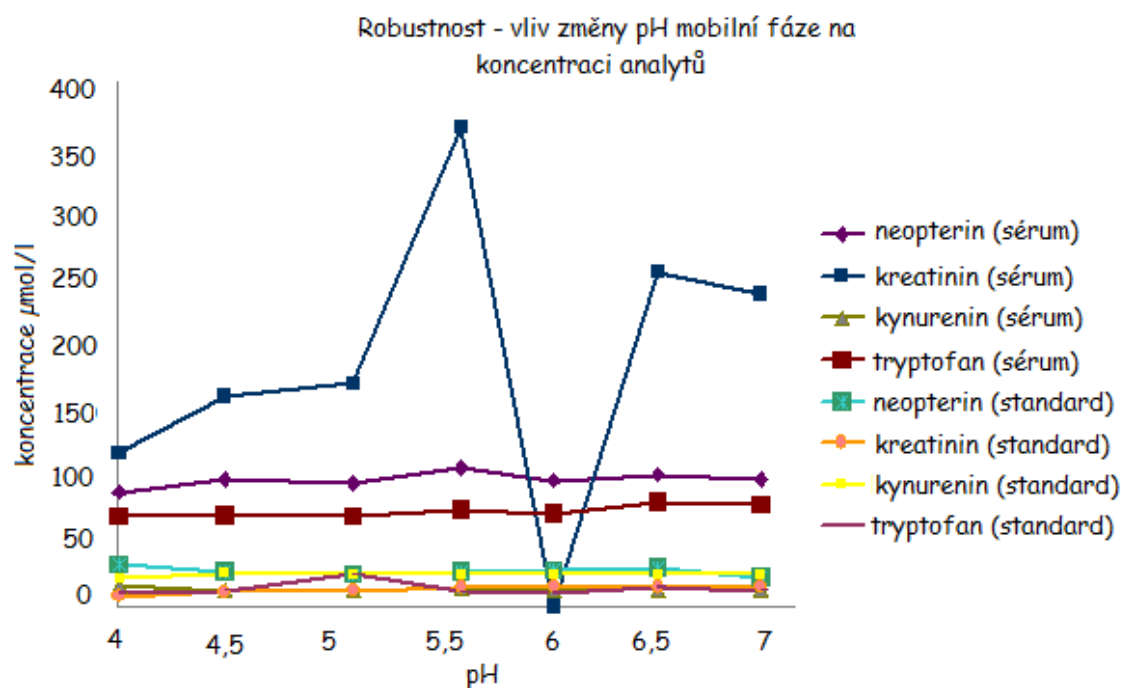
Výtěžnost extrakce

výťažnost extrakce	Level 1			Level 2			Level 3		
	C1	C2	R %	C1	C2	R %	C1	C2	R %
neopterin	57,17	57,86	101,24	77,17	77,63	100,61	107,17	104,28	97,31
kreatinin	61,60	60,02	97,44	115,99	113,50	97,86	240,99	239,66	99,45
kynurenin	2,48	2,52	101,72	5,64	5,83	103,53	9,94	10,19	102,52
tryptofan	44,61	42,79	95,92	51,39	47,81	93,03	97,15	88,62	91,26

C1-vypočítaná koncentrace, C2 - změřená koncentrace

Tab. 43 Výťažnost extrakce

Robustnost byla testována jako změna koncentrace mobilní fáze (5 - 25 mmol/l), pH mobilní fáze (7,1 - 4,1) a teploty (15 - 35°C) na standardních roztocích i vzorku séra. Metoda je robustní při uvedených změnách koncentrace mobilní fáze. Změny teploty ovlivňují retenční časy látek. Změna pH mobilní fáze významně ovlivňuje eluci nečistoty v blízkosti kreatininu, což má samozřejmě vliv na plochu píku (viz Obr. 92).



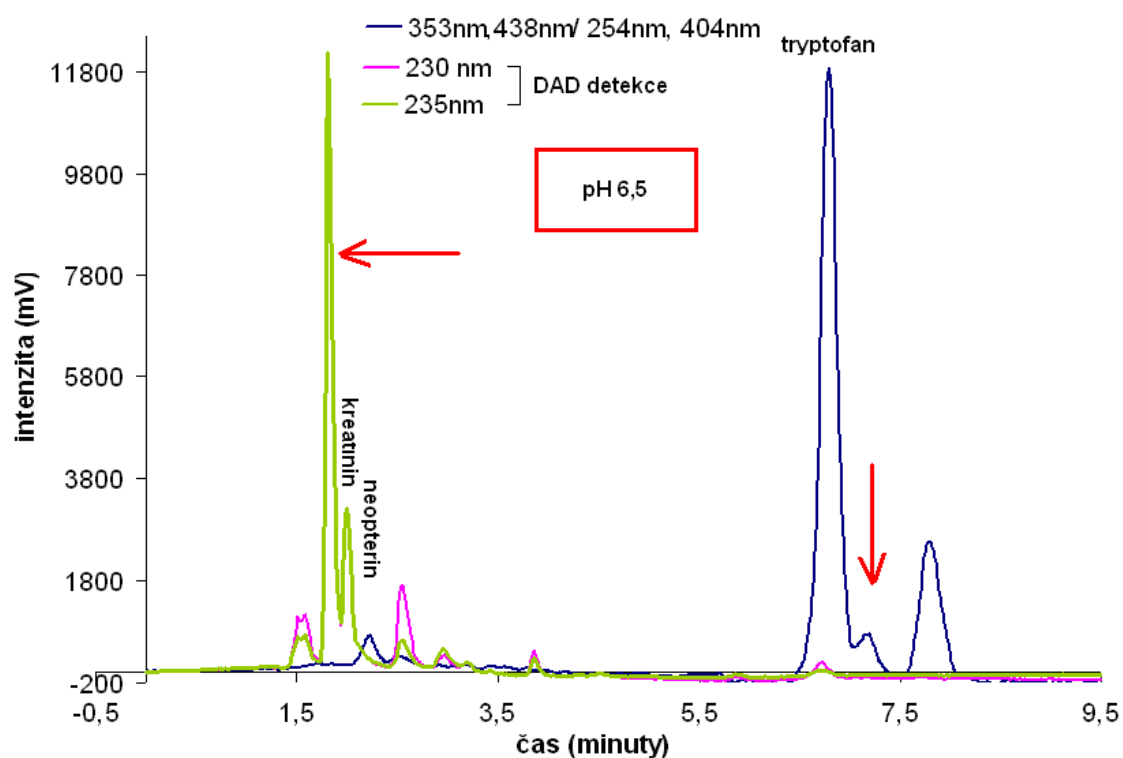
Obr. 92 Robustnost - vliv změny pH mobilní fáze na koncentraci analytů

Stabilita byla testována na pracovních roztocích standardních látek při teplotách 25°C, 4°C, - 28°C, - 86°C po dobu osmi dnů. Roztok neopterinu byl nejvíce stabilní při teplotě - 28°C a - 86°C, roztok kreatininu při teplotách 4°C, - 28°C, kynureninu při teplotě - 28°C a tryptofanu při teplotách 4°C a - 86°C.

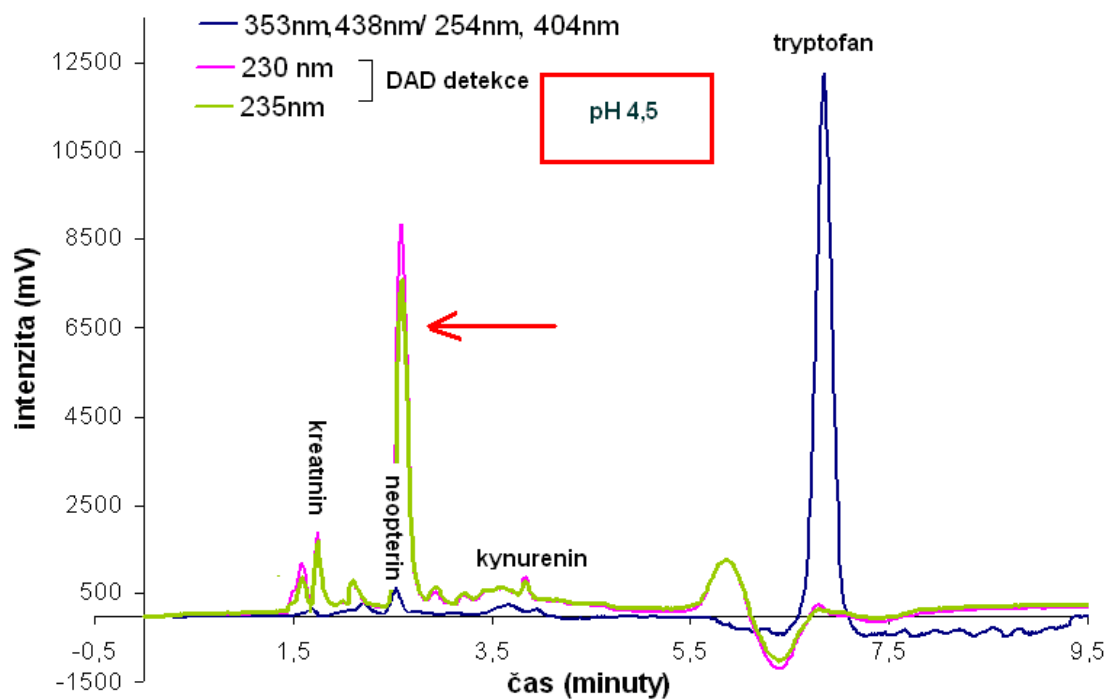
5.1.4.3.4 Další druhy biologického materiálu

Nově vyvinutou metodou byly změřeny také další vzorky biologického materiálu (výpotek a plodová voda). Metoda pro tento typ biologického materiálu zatím nebyla zcela validována, nicméně z prvních výsledků se ukazuje jako vhodná i pro tento materiál.

5.1.4.3.4.1 Výpotek

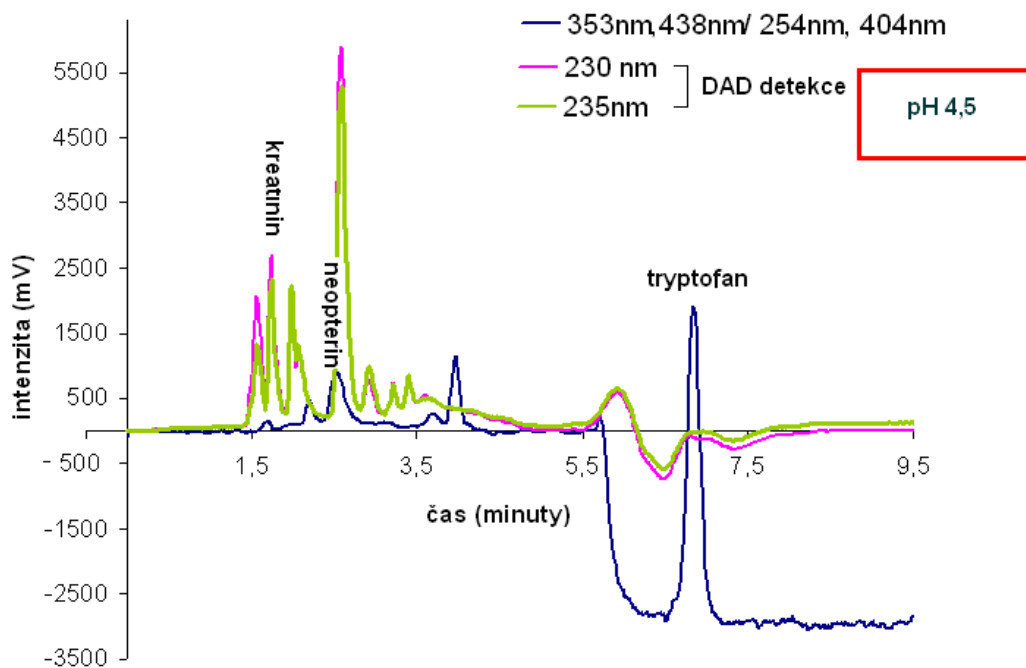


Obr. 93 Výpotek z pleurální dutiny (fluidothorax) pacienta při pH mobilní fáze 6,5 (šipky naznačují nečistoty)



Obr. 94 Výpotek z pleurální dutiny (fluidothorax) pacienta při pH mobilní fáze 4,5 (šipky naznačují nečistoty). Stejný vzorek séra jako na Obr. 93.

5.1.4.3.4.2 Plodová voda

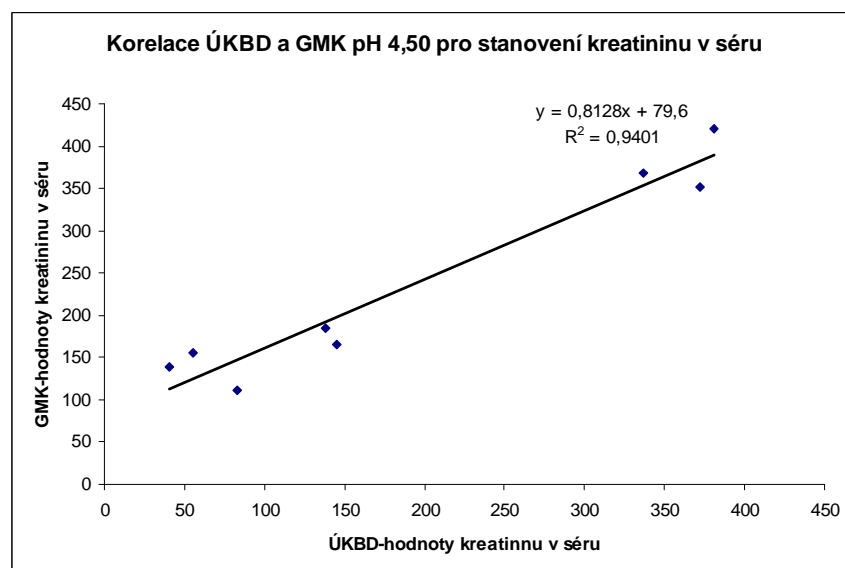


Obr. 95 Plodová voda při pH mobilní fáze 4,5.

5.1.4.4 Korelace s ÚKBD

Kreatinin je rutinně analyzovanou látkou v moči i v séru. Dvě hlavní metody stanovení jsou Enzymová reakce a Jaffého metoda. HPLC je zařazena mezi referenční metody.

Byly porovnány výsledky celkem 13 vzorků séra i standardů kreatininu, změřené nově vyvinutou HPLC metodou s výsledky naměřenými Jaffého metodou v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (ÚKBD). Přestože se obě metodiky velmi liší a nelze je přímo srovnávat, korelace obou metod byla dobrá ($r = 0,9401$).



Obr. 96 Korelace metod pro stanovení kreatininu v séru ($\mu\text{mol/l}$)

5.1.4.4.1 Výběr IS

Vyvinutá metoda byla validována s použitím externí kalibrace. Byl ovšem vybrán vhodný interní standard, který lze pro stanovení a revalidaci použít. V mnoha pracích byl jako vnitřní standard pro stanovení tryptofanu použit 5-methyl-DL-tryptofan [185, 187, 190].

Tato látka byla přidána do vzorku před zpracováním. V HPLC analýze se bohužel 5-methyl-DL-tryptofan eluoval až v desáté minutě, což zbytečně prodlužovalo analýzu. Dalším vhodným interním standardem byl thymin používaný pro stanovení kreatininu v séru [191].

Thymin se ukázal jako vhodný interní standard, který se eluoval v blízkosti kreatininu, takže zbytečně neprodužoval dobu analýzy, byl detekován při 280 nm.

5.1.4.5 Závěr

Nově vyvinutá metoda pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru byla plně validována. HPLC metoda i zvolený extrakční postup je rychlý a vhodný pro zpracování velkých sérií vzorků. Byl navrhnout vnitřní standard, který může být použit pro další validaci metody. Podle prvních testů je metoda vhodná i pro další druhy biologického materiálu - plodová voda, exsudát. Na toto téma byla vypracována rigorózní práce Mgr. Veroniky Prokopové a Erasmus Report portugalské studentky Filipy Bernardes z University of Porto v Portugalsku, která v laboratoři působila v rámci výměnného pobytu Erasmus Practical Placement [199].

5.1.5 Testování deep-UV-LED jako vhodného zdroje pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze

5.1.5.1 Úvod

Tato publikace [200] byla vypracována během zahraniční stáže Erasmus na School of Chemical Sciences, Dublin City University v Dublinu (Irsko). Práce se zabývá testováním nové LED (light emitting diode) svítící v oblasti UV 255 nm označené jako „hluboké“ ultrafialové záření (deep ultraviolet) jako možného světelného zdroje pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze. Pro separaci byla vybrána směs nukleotidů (AMP, ADP, GDP), které absorbují při 255 nm.

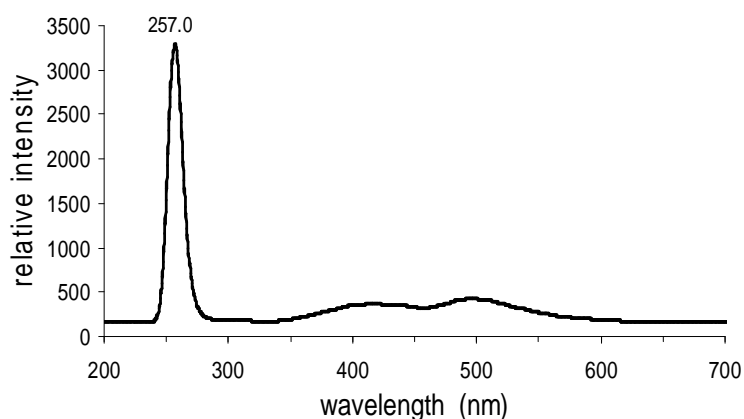
5.1.5.2 Cíl

Cílem bylo změřit základní parametry charakterizující deep-UV-LED (emisní spektrum, přeměnu energie atd.) a pokusit se využít tuto LED jako světelný zdroj pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze.

5.1.5.3 Výsledky a závěr

Důležitým parametrem při testování deep-UV-LED je konverze elektrické energie na optickou. Výrobci LED tento parametr ve specifikaci neuvádí. Bylo změřeno, že konverze energie u tohoto typu LED (255 nm) je pouze 5,3%, což je ve srovnání s LED svítícími ve viditelné oblasti velmi málo, zbytek energie je měněn na energii tepelnou. Navíc je nutno dodržet dobu 10 - 15 minut pro ustálení signálu ($\pm 1\%$). Ze zjištěných údajů vyplývá, že dochází ke značnému zahřívání během měření, což by mohlo být při detekci vyřešeno např. termostatem.

Změřené emisní spektrum ukázalo přítomnost parazitického záření v oblasti 400 - 500 nm (viz Obr. 97).



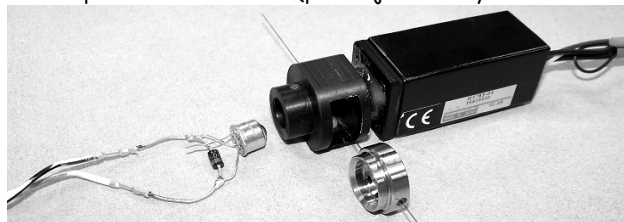
Obr. 97 Emisní spektrum 255 nm LED

Důvodem přítomnosti tohoto záření mohou být nežádoucí luminiscence některého z materiálů použitých při výrobě LED nebo nechtěné elektronové přechody. Toto záření může negativně ovlivnit linearitu detekce. Proto byla linearita zkoumána jako závislost absorbance na koncentraci a také jako citlivosti na absorbanci. Efektivní dráha světla byla vypočítána jako 59 μm , což je pro kapiláru o průměru 75 μm dostačující. Ovšem vypočítaná hodnota parazitického světla 30,5%, je velmi vysoká. Tento nedostatek může být odstraněn vhodným filtrem.

Separace nukleotidů byla provedena s použitím CE přístroje již dříve sestaveného v laboratoři DCU. Detekční systém byl sestaven nově.



Obr. 98 Kapilární elektroforéza (přístroj sestavený v laboratoři DCU)



Obr. 99 Detekční systém obsahující deep-UV-LED a fotonásobič

Směs nukleotidů byla separována za následujících podmínek

Elektrolyt: 25mM amonium acetátový pufr o pH 10

Kapilára: křemenná kapilára (fused silica, 75 μm i.d., celková délka/efektivní délka 39,0/31,0 cm)

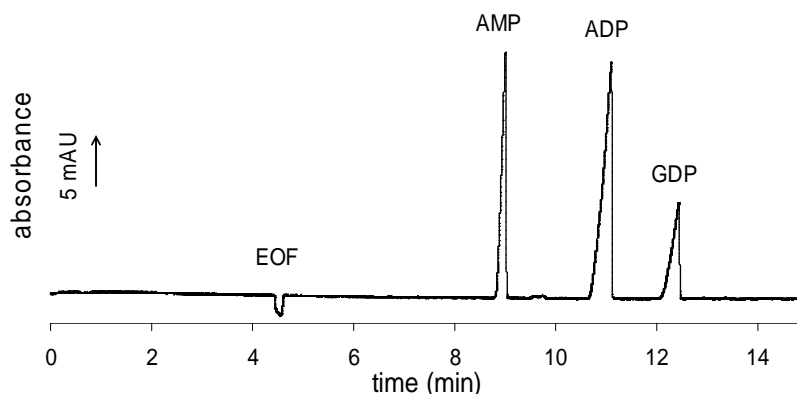
Teplota: $t = 20^{\circ}\text{C}$

Separáční podmínky: 4 kV (50 μA)

N stř ik: hydrostaticky (2 cm, 30 s)

Vzorek: směs AMP a ADP $2,10^{-3}$, GDP $1,10^{-3}$ mol/l

Detekce: 255 nm deep-UV-LED



Obr. 100 Separace nukleotidů metodou CE s fotometrickou deep-UV-LED detekcí

Práce jako prv n  využívat deep-UV-LED pro fotometrickou detekci na kapiláre a zkoumá parametry (emisní spektrum, přeměna energie atd.), jeţ mohou hrát při detekci d leţitou roli. Směs nukleotidů byla separována pomocí kapilární elektroforézy. Pro separaci byl pouţit přístroj sestaven  v laboratoři a nov  vytvořen  detekcn  systém s deep-UV-LED jako sv teln m zdrojem.

Práce byla publikována jako kr tk  sdělení (short communication) v časopise *The Analyst* s impakt faktorem 3,272.

5.2 Klinick  část

Výše zm n n  metody byly vyvinuty na podněty lékařů z různých oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové nebo ve snaze zlepšit metody j ţ vyvinut  a vyuţivan  pro různé klinick  studie. Důvodem novelizace je zvy šení počtu klinických studií a stejn  tak i souborů pacientů v nich zahrnutých. Hlavn  snahou bylo urychlit a zjednodušit přípravu vzorků i vlastní analýzu.

Tato kapitola je rozdělena dle analytů, které byly v jednotlivých klinických studiích hodnoceny na:

- monitorování s rov ch hladin antioxidačních vitaminů

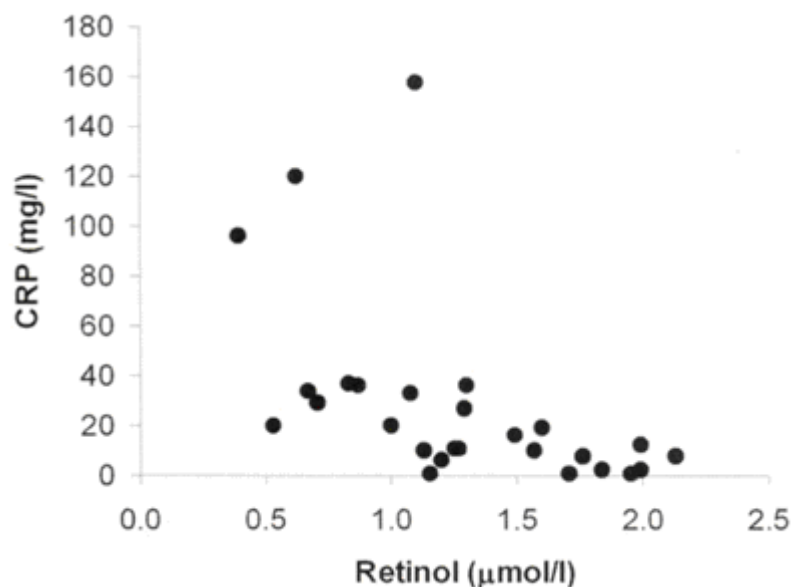
- sledování změn permeability střevní sliznice po chemoterapii pomocí retinol absorpčního testu
- stanovení neopterinu v moči u onkologických pacientů

V mnoha studiích ovšem byly měřeny tyto parametry současně.

5.2.1 Monitorování sérových hladin antioxidačních vitaminů u onkologických pacientů

V těchto klinických studiích [201, 202, 203, 204, 205] byly monitorovány hladiny antioxidačních vitaminů v séru u onkologických pacientů.

Cílem studie [205] bylo prozkoumat spektrum vedlejších účinků nové chemoterapeutické léčby zahrnující toxicitu, která negativně ovlivňuje riziko aterosklerózy. U 31 onkologických pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem léčených kombinací (bevacizumab, oxaplatina, 5-fluorouracil a leukovorin) byly monitorovány hladiny alfa-tokoferolu, retinolu, homocysteinu, cholesterolu, glykovaného hemoglobinu aj. v průběhu chemoterapeutické léčby. Během prvního měsíce léčby došlo ke statisticky významnému snížení celkového cholesterolu, LDL lipoproteinu a homocysteinu. Během druhého a třetího měsíce došlo ke statisticky významnému zvýšení sérového retinolu a glykovaného hemoglobinu. Dále byl také monitorován C-reaktivní protein (CRP) a karcinom embryonální antigen (CEA). Byla pozorována korelace mezi hladinami CRP, HDL lipoproteinu, retinolu, feritinu a CEA. Zvýšená hladina retinolu a alfa-tokoferolu byla pozorována také ve studii [201] potvrzující tím hypotézu, že k tomuto zvýšení dochází během potlačení systémové zánětlivé odpovědi chemoterapií.



Obr. 101 Korelace hladin CRP a retinolu [205]

Závěrem lze říci, že kombinace nových chemoterapeutik (bevacizumab, oxaliplatina, 5-fluorouracil a leukovorin) je efektivní terapií, během níž dochází ke snížení hladin CEA (sérový nádorový marker) a CRP (reaktant akutní fáze). Hladina CRP negativně koreluje s retinolem a HDL cholesterolem a pozitivně s CEA. Bylo tedy prokázáno, že kombinovaná chemoterapeutická léčba příznivě ovlivňuje některé laboratorní parametry (LDL cholesterol a homocystein), ovšem dochází zde ke zvýšení feritinu a glykovaného hemoglobinu, což může mít negativní vliv na vznik aterosklerózy.

V následujících pracích byly monitorovány hladiny retinolu a alfa-tokoferolu v séru, neopterinu v moči nebo v séru a některých dalších parametrů [201, 202, 203, 204].

V klinické studii [201] byly stanoveny hladiny alfa-tokoferolu a retinolu před a během chemoterapeutické léčby. Soubor pacientů tvořilo 28 žen (34 - 74 let, 56 ± 10) 9 s karcinomem ovarií, 19 s karcinomem prsu. U pacientů bez projevů závažné toxicity léčby (paclitaxel/carboplatina) byl pozorován statisticky významný vzestup retinolu a alfa-tokoferolu během chemoterapie vzhledem k počátečním hodnotám naměřeným před chemoterapií. Tyto hladiny negativně korelovaly s hladinou neopterinu v moči. Tento jev může být vysvětlen inhibicí systémové imunitní aktivity danou chemoterapií.

V publikaci [202] jsou hodnoceny parametry lipidového metabolismu, zánětlivé odpovědi a antioxidační rovnováhy. Cílem bylo prozkoumat, jak jsou tyto parametry ovlivňovány při léčbě karcinomu prsu inhibitory aromatázy. Cílovou skupinu tvořilo 186 post-menopauzálních žen s karcinomem prsu. Jednotlivé skupiny analytů byly monitorovány před a během druhého a čtvrtého

měsíce léčby inhibitory aromatázy. Skupině 73 pacientek byly inhibitory aromatázy podávány po předchozí hormonální terapii tamoxifenem.

Během léčby došlo v celé skupině k signifikantnímu zvýšení lipidového metabolismu (LDL, VLDL a lipoproteinů a), retinolu, CRP a fibrinogenu. Změny lipidového metabolismu byly pozorovány zejména u pacientek, kterým byl před léčbou podáván tamoxifen. U pacientek léčených inhibitory aromatázy jako léky první linie nebyly pozorovány žádné změny v lipidovém metabolismu. Hladiny neopterinu, CRP a fibrinogenu byly u pacientek léčených tamoxifenem nižší.

Vzestup alfa-tokoferolu byl pozorován u pacientek s karcinomem prsu léčených inhibitory aromatázy třetí generace ve vztahu k předchozí léčbě tamoxifenem. Vitamin E byl měřen v membránách erytrocytů a lipoproteinových frakcích před, po dvou a čtyřech měsících léčby letrozolem. Po přechodném počátečním poklesu vitamínu E došlo k návratu hladin jako před léčbou. Hladiny alfa-tokoferolu v lipoproteinových frakcích byly významně zvýšeny po čtyřech měsících léčby letrozolem hlavně u pacientů bez předchozí léčby tamoxifenem. Kromě těchto výsledků nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v koncentraci alfa-tokoferolu u sledované skupiny pacientů [206].

5.2.2 Sledování změn permeability střevní sliznice po chemoterapii pomocí retinol absorpčního testu

Jedním z nejběžnějších vedlejších efektů chemoterapeutické protinádorové léčby je gastrointestinální toxicita. Diagnóza a stanovení této toxicity stále závisí hlavně na informacích získaných anamnézou. Měření propustnosti střevní sliznice je jednou z potenciálních neinvazivních laboratorních metod stanovení toxicity léčby vzhledem ke gastrointestinálnímu traktu.

V laboratoři GMK ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení esteru retinolu po retinol absorpčním testu pro monitorování poškození střevní sliznice, která byla tématem mé diplomové práce a dále byla také publikována v časopise *Journal of Separation Science* [207].

Obě publikace [207, 209] hodnotí mimo jiné vliv chemoterapie a radioterapie na poškození střevní sliznice pomocí retinol absorpčního testu nebo testu laktulóza/xylulóza/manitol (viz kapitola 3.5.1.4.4.2), dále byl monitorován neopterin v moči. V publikaci [207] byly tyto testy provedeny u 11 pacientů trpících průjmy indukovanými chemoterapií, u 10 zdravých kontrol a u 24 dosud neléčených pacientů s nádorem v oblasti gastrointestinálního traktu.

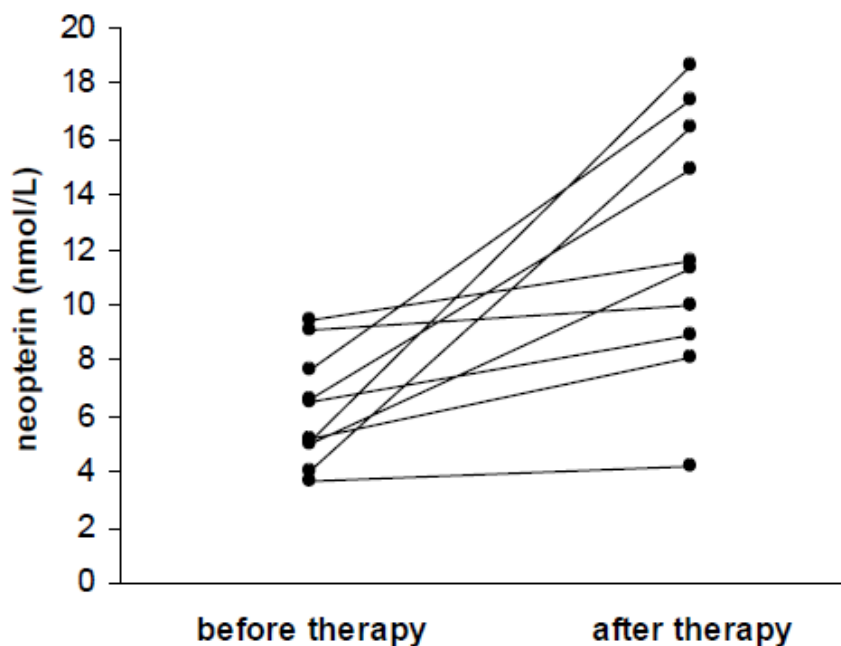
Poměr laktulóza/manitol byl zvýšen pátý a šestý týden od začátku léčby. Během léčby došlo ke snížení sérového tokoferolu, nebyly však sledovány signifikantní změny sérové koncentrace esterů retinolu po retinol absorpčním testu. Stejně tak nedošlo ke změnám močového neopterinu. Tyto hodnoty navzájem významně korelovaly. Měření propustnosti střevní sliznice a absorpce vitamínu A tedy mohou být použity jako důležitý nástroj pro hodnocení těchto změn u pacientů trpících průjmami po chemoterapii.

Tyto parametry byly také monitorovány v publikaci [210] u 17 pacientů s karcinomem rekta léčených chemoterapií. V průběhu léčby radiochemoterapií nedošlo ke statisticky významným změnám v parametrech retinol absorpčního testu a neopterinu v moči. Tyto parametry vzájemně korelovaly. Limitem studie je počet pacientů v této skupině, protože rozmezí hladin esterů retinolu po retinol absorpčním testu bylo široké.

Pro monitorování poškození střevní sliznice u pacientů s karcinomem rekta léčených radiochemoterapií může být použit laktulóza/xylóza/manitol test. U těchto pacientů dochází během léčby ke statisticky významnému zvýšení poměru laktulóza/manitol. Byl také pozorován pokles vitamínu E, což bývá často dáváno do souvislosti s výsledkem retinol absorpčním testem.

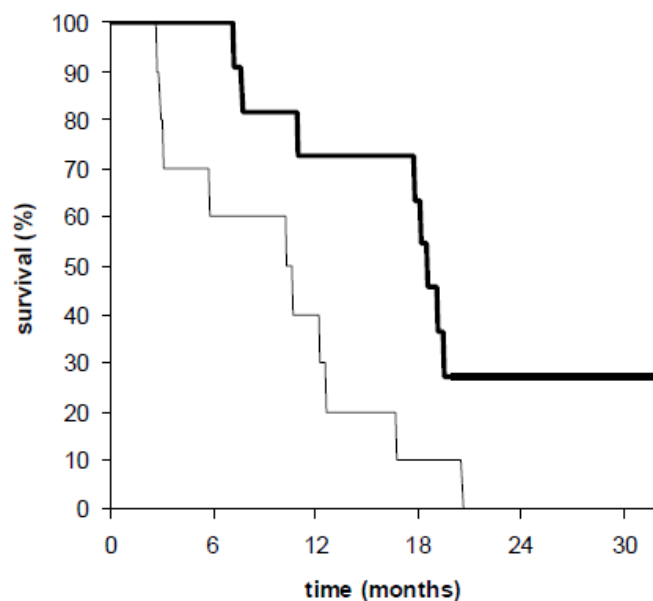
5.2.3 Stanovení neopterinu v moči u onkologických pacientů

Neopterin v séru, vitamin A a E a některé další parametry byly monitorovány v klinické studii [204] u 45 pacientů (10 žen a 35 mužů) s karcinomem jícnu. U tohoto typu nádorového onemocnění bylo prokázáno statisticky významné zvýšení sérového neopterinu doprovázené snížením retinolu a alfa-tokoferolu.



Obr. 102 Hladiny neopterinu v séru u pacientu s karcinomem jícnu před a po chemoradioterapii [204]

Změny střevní sliznice jako následek chemoterapie byly rovněž monitorovány ve studii [209] u 21 pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem léčených vybranými chemoterapeutiky (cetuximab, leucovorin, irinotecan, 5-fluorouracil). Byly stanoveny hodnoty močového neopterinu a absorpčního testu laktulóza/xylóza/manitol před začátkem a během léčby. Tyto dva parametry významně korelovaly, což znamená, že změny střevní sliznice u pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem jsou spojeny s aktivací imunitního systému a mohou být využity k hodnocení prognózy onemocnění. Přežití pacientů bylo nižší s hodnotami poměru laktulóza/manitol $\geq 0,04$, sacharóza/manitol $\geq 0,04$, sacharóza/xylósa $\geq 0,02$, sukralóza/manitol $\geq 0,17$ a hodnotami močového neopterinu $\geq 220 \mu\text{mol/mol}$ kreatininu. Hodnoty byly stanoveny vzhledem k výsledkům v této studii u pacientů přežívajících déle než 15 měsíců.

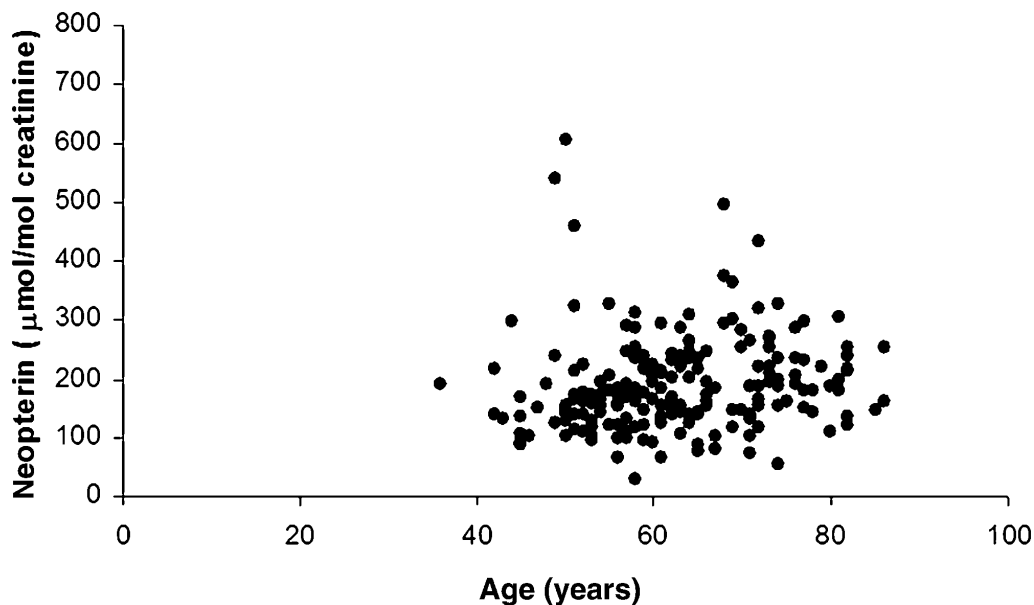


Obr. 103 Kaplan-Meierova křivka přežití u pacientů s hodnotou neopterinu pod 220 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu (černá linie) a nad touto hodnotou (šedá linie) [209]

Podobně jsou v publikaci [211] sledovány hladiny neopterinu v moči před a během léčby u polymorbidních pacientů. Do studie byla zařazena skupina 194 post-menopauzálních žen ve věku 62 ± 10 let s karcinomem prsu trpících dalšími onemocněními (diabetes mellitus, hypertenze, onemocnění štítné žlázy, hyperlipidemie, jiné akutní nebo srdeční onemocnění nebo jiné v minulosti diagnostikované maligní onemocnění atd.).

Zvýšené hladiny neopterinu byly pozorovány u pacientek s vyšším počtem dalších onemocnění, ale statisticky významné změny byly nalezeny jen u pacientek ve věku ≥ 70 let a s vyšším počtem různých komorbidit (jiných než uvedených v předchozím odstavci).

Signifikantně zvýšené hladiny neopterinu byly stanoveny u pacientek s karcinomem prsu se dvěma a více onemocněními. Tento poznatek může být použit v interpretaci aktivace imunitního systému a systémové zánětlivé odpovědi u karcinomu prsu.

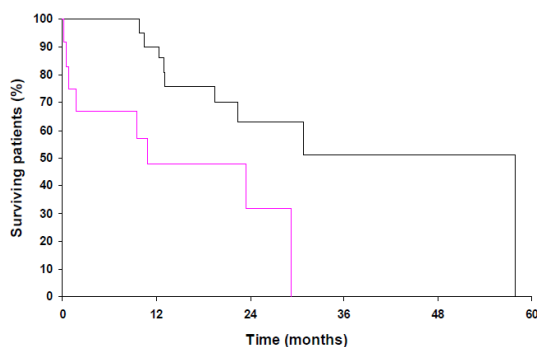


Obr. 104 Korelace mezi neopterinem a věkem u pacientek s karcinomem prsu [211]

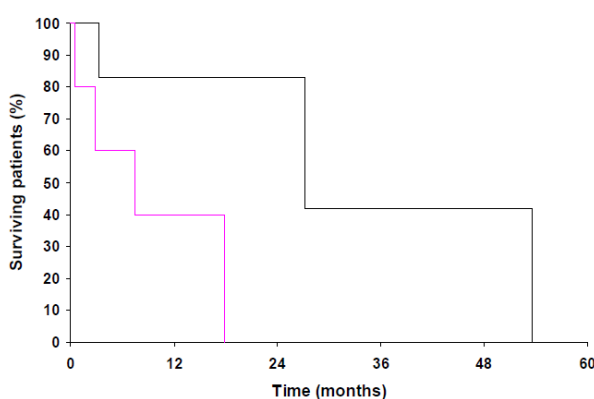
LAMA test a hladiny neopterinu byly monitorovány také ve skupině 16 pacientů s různými druhy nádorového onemocnění hlavy, krku a plic léčených gefitinibem [212]. Bylo zjištěno, že tento nízkomolekulární inhibitor receptoru pro epidermální růstový faktor nemá efekt na systémovou aktivaci imunitního systému (nejsou ovlivněny hladiny neopterinu v moči). Při monitorování poškození střevní sliznice pomocí LAMA testu došlo ke zvýšení xylózy, laktulózy a poměru laktulóza/manitol oproti kontrolní skupině. Neopterin koreloval s poměrem laktulóza/manitol, laktulóza/xylóza a s hladinou xylózy.

Hladiny neopterinu u pacientek s karcinomem ovarií v primárním stádiu nebo i karcinomem jiného původu metastazující do ovaria v letech 1990 - 2000 byly monitorovány u 49 pacientek léčených ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Soubor byl porovnán s 16 zdravými ženami [213]. Zvýšené hladiny neopterinu v moči byly pozorovány u primárního karcinomu ovarií i u jiných nádorů do ovarií metastazujících. Zvýšená hladina neopterinu je asociována s toxicitou léčby a špatnou prognózou. Při léčbě kombinací paclitaxel/platina nedošlo ke statisticky významnému zvýšení hladin neopterinu v moči. Jako v jiných studiích byla prokázána korelace neopterinu a propustnosti střevní sliznice.

Závěrem lze říci, že hladina neopterinu v moči je významným prognostickým markerem u pacientek s ovariálním karcinomem. Jako mezní hodnota byla v tomto případě stanovena koncentrace neopterinu 338 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu. Přežívání pacientů bylo významně vyšší, pokud se jejich koncentrace neopterinu pohybovala pod touto hodnotou.



Obr. 105 Přežívání pacientů s primárním karcinomem ovarií s hodnotou neopterinu v moči pod $338 \mu\text{mol/mol}$ kreatininu (černá linie) a s hodnotou neopterinu nad $338 \mu\text{mol/mol}$ kreatininu (růžová linie) [213]



Obr. 106 Přežívání pacientů se sekundárním karcinomem ovarií s hodnotou neopterinu v moči pod $338 \mu\text{mol/mol}$ kreatininu (černá linie) a s hodnotou neopterinu nad $338 \mu\text{mol/mol}$ kreatininu (růžová linie) [213]

Neopterin, CRP, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), hemoglobin a některé další parametry byly sledovány u pacientů s karcinomem prsu během chemoterapie s vyšší dávkovou intenzitou (dose-dense) [214, 215].

Studie [215] byla provedena na 194 pacientech s karcinomem prsu ve stadiu II - IV léčených neoadjuvantní (léčba prováděná před hlavní léčbou - př. snaha o redukci tumoru před jeho chirurgickým odstraněním) a adjuvantní (další léčba po př. chirurgickém odstranění nádoru, která by měla zmenšit potenciální riziko opětovného výskytu onemocnění) chemoterapií s vyšší dávkovou intenzitou (dose-dense). U těchto pacientů byl během neoadjuvantní léčby pozorován vzestup hladin neopterinu, který koreloval s poklesem hemoglobinu. Během dose-dense chemoterapie (neoadjuvantní) karcinomu prsu dochází k aktivaci imunitního systému a aktivaci zánětlivé odpovědi organismu. Vzestup hladiny neopterinu u karcinomu prsu je pouze u menšiny pacientů. Pozorování, že vzestup hladin u tohoto typu nádorového onemocnění je pouze po neoadjuvantní chemoterapii, potvrzuje ostatní klinické studie monitorující zvýšení pro-zánětlivých cytokinů po podání taxanů, jež jsou součástí této terapie [216, 217].

Angiogeneze hraje důležitou roli v progresi nádoru. V této studii byly monitorovány hladiny VEGF, C-reaktivního proteinu a neopterinu v moči [214]. Skupinu pacientek tvořilo 34 žen ve věku 47 ± 9 let se stejným typem onemocnění jako v předchozí studii. Během dose-dense chemoterapie došlo jen k malým změnám sérového VEGF a CRP. Hladiny neopterinu byly během chemoterapie statisticky významně zvýšeny. Jak již bylo řečeno v předchozí části, hladiny neopterinu jsou u karcinomu prsu zvýšeny jen v malém množství případů. Vzestup neopterinu byl publikován po podání taxanů a filgrastimu [216, 217]. Ve většině případů koreluje hladina neopterinu s koncentrací CRP. V této studii byla pozorována korelace CRP, VEGF a neopterinu jen v některých časových intervalech léčby.

6 PŘEHLED VŠECH PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

1. Melichar B., Plisek J., Hyspler R., Kalabova H., Kasparova M., Krcmova L., Studentova H., Solichova D.: Erythrocyte Alpha-Tocopherol in Breast Cancer Patients Treated with Letrozol, *JOURNAL OF NUTRITIONAL SCIENCE AND VITAMINOLOGY*, Volume: 56, Issue: 2, 98-103, APR 2010, počet citací bez autocitací: 0, IF = 0,929
2. Melichar B., Dvorak J., Kalabova H., Hyspler R., Krcmova L., Kasparova M., Urbanek L., Solichova D.: Intestinal permeability, vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib, *SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY INVESTIGATION*, Volume: 70, Issue: 3, 180-187, APR 2010, počet citací bez autocitací: 0, IF = 1,380
3. Melicharova K., Kalabova H., Krcmova L., Urbanek L., Solichova D., Melichar B.: Effect of comorbidity on urinary neopterin in patients with breast carcinoma, *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER CARE*, Volume: 19, Issue: 3, 340-345, MAY 2010, počet citací bez autocitací: 0, IF = 1,100
4. 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*, Volume: 90, Issue: 2, 106-114, 2010, počet citací bez autocitací: 0, IF = 1,703
5. Melichar B., Kalabova H., Krcmova L., Kasparova M., Malirova E., Melicharova K., Pecka M., Hyspler R., Solichova D.: Serum Homocysteine, Cholesterol, Retinol, alpha-Tocopherol, Glycosylated Hemoglobin and Inflammatory Response during Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, 5-Fluorouracil and Leucovorin, *ANTICANCER RESEARCH*, Volume: 29, Issue: 11, 4813-4820, NOV 2009 počet citací bez autocitací: 0, IF = 1,428
6. Krcmova L., Stjernlof A., Mehlen S., Hauser P. C., Abele S., Paull B., Macka M.: Deep-UV-LEDs in photometric detection: A 255 nm LED on-capillary detector in capillary electrophoresis,

ANALYST, Volume: 134, Issue: 12, 2394-2396, 2009, počet citací bez autocitací: 0, IF = 3,272

7. Dvořák J., Melichar B., Hyšpler R., Krčmová L., Urbánek L., Kalábová H., Kašparová M., Solichová D.: Intestinal permeability, vitamin A absorption, alpha-tocopherol, and neopterin in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation, *MEDICAL ONCOLOGY*, 2009, počet citací bez autocitací: 0, IF = 1,227 (v tisku)
8. Cincibuch J., Melichar B., Studentova H., Kapustova M., Malirova E., Solichova D., Krcmova L., Kasparova M., Schneiderka P., Juranova J., Sramek V., Cwiertka K.: Serum Neopterin, Retinol and Alpha-tocopherol in Patients with the Carcinoma of the Esophagus, *PTERIDINES*, Volume: 20, Issue: 2, 49-53, JUN 2009, počet citací bez autocitací: 0, IF = 0,379
9. 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*, Volume: 32, Issue: 15-16, Special Issue: Sp. Iss. SI, 2804-2811, AUG 2009, počet citací bez autocitací: 0, IF = 2,551
10. Melichar B., Kalabova H., Krcmova L., Urbanek L., Hyspler R., Solichova D., Melicharova K., Pecka M., Zadak Z.: Effect of Aromatase Inhibitors on Lipid Metabolism, Inflammatory Response and Antioxidant Balance in Patients with Breast Carcinoma, *ANTICANCER RESEARCH*, Volume: 29, Issue: 8, 3337-3346, AUG 2009, počet citací bez autocitací: 1, IF = 1,428
11. Melichar B., Balloková A., Malirova E., Urbanek L., Krcmova L., Hyspler R., Hornychova H., Ryska A., Solichova D.: Circulating Vascular Endothelial Growth Factor, C-reactive Protein and Urinary Neopterin Concentrations During dose-dense Chemotherapy, *PTERIDINES*, Volume: 19, Issue: 3, 65-71, SEP 2008, počet citací bez autocitací: 0, IF = 0,706
12. Melichar B., Dvorak J., Krcmova L., Hyspler R., Urbanek L., Solichova D.: Intestinal Permeability and Vitamin A Absorption in Patients With Chemotherapy-induced Diarrhea, *AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY-CANCER CLINICAL TRIALS*, Volume: 31, Issue: 6, 580-584, DEC 2008, počet citací bez autocitací: 1, IF = 1,792

13. Melichar B., Hyspler R., Kalabova H., Urbanek L., Krcmova L., Solichova D.: *Gastrointestinal permeability - a parameter of possible prognostic importance in metastatic colorectal carcinoma*, PTERIDINES, Volume: 19, Issue: 1, 19-22, MAR 2008, počet citací bez autocitací: 0, IF = 0,706
14. Melichar B., Urbanek L., Krcmova L., Kalabova H., Melicharova K., Malirova E., Hornychova H., Ryska A., Hyspler R., Solichova D.: *Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy*, ANTICANCER RESEARCH, Volume: 28, Issue: 4C, 2389-2396, JUL-AUG 2008, počet citací bez autocitací: 1, IF = 1,390
15. Kalabova H., Dvorak J., Hyspler R., Ticha A., Krcmova L., Urbanek L., Solichova D., Melichar B.: *Urinary neopterin in patients treated with gefitinib*, PTERIDINES, Volume: 18, Issue: 3, 95-100, SEP 2007, počet citací bez autocitací: 0, IF = 0,471
16. Melichar B., Kalabova H., Krcmova L., Urbanek L., Hyspler R., Malirova E., Solichova D.: *Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/carboplatin chemotherapy*, ANTICANCER RESEARCH, Volume: 27, Issue: 6C, 4397-4401, NOV-DEC 2007, počet citací bez autocitací: 0, IF = 1,414
17. Melichar B., Urbanek L., Krcmova L., Kalabova H., Svobodova I., Dragounova E., Vesely P., Hyspler R., Solichova D.: *Urinary neopterin in patients with ovarian cancer*, PTERIDINES, Volume: 17, Issue: 4, 145-153, DEC 2006, počet citací bez autocitací: 6, IF = 0,545
18. Urbanek L., Krcmova L., Solichova D., Melichar B., Opletalova V., Solich P.: *Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects*, JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, Volume: 29, Issue: 16, 2485-2493, NOV 2006, počet citací bez autocitací: 4, IF = 2,535

7 PŘEHLED PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ, PŘEDNÁŠEK A GRANTŮ

7.1 Postery

10th International Nutrition and Diagnostic Conference - INDC 2010, Praha, Česká republika (4.9. - 7.9.2010)

1. **Determination of retinol and α -tocopherol in breast milk by HPLC - comparison of monolithic and core-shell technology (přijato)**

Lenka Krčmová, Jiří Plíšek, Markéta Kašparová, Dagmar Solichová, Petr Solich

28th International Symposium on Chromatography - ISC 2010, Valencie, Španělsko (12.9. - 16.9.2010)

2. **Combination of monoliths and modern technologies for fast HPLC analysis in clinical research**

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

3. **Troubleshooting of simultaneous determination of neopterin, creatinine, kynurenine and tryptophan in various human biological fluids**

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

XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry - ISLS 2010, Praha, Česká republika (13.7 - 16.7.2010)

4. **Determination of neopterin and creatinine in oncologic patients by HPLC using modern technologies**

Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Markéta Kašparová, Jiří Plíšek, Bohuslav Melichar,
Petr Solich

Microscales bioseparation 2010, Praha, Česká republika (21.3 - 25.3.2010)

5. New sample preparation technique for HPLC analysis of alpha-tocopherol in erythrocyte membrane

Jiří Plíšek, Hana Vlčková, Lenka Krčmová, Markéta Kašparová, Dagmar Solichová, Petr Solich, Luboš Sobotka

34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2009, Drážďany, Německo (28.6. - 2.7.2009)

6. HPLC method for determination of neopterin, creatinine, uric acid and kynurenine for monitoring of cancer patients

Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Kašparová M., Melichar B., Solich P.

FLOW ANALYSIS XI. Pollensa. Mallorca, Španělsko (14.9. - 18.9.2009)

7. Sequential Injection Chromatography (SIC) for Determination of Fat-soluble Vitamins in Human blood serum

P. Chocholouš, H. Sklenářová, P. Žáková, D. Šatínský, L. Krčmová, M. Kašparová, D. Solichová, P. Solich

Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, Česká republika (14. - 16.9.2009)

8. Porovnání technik liquid-liquid a solid phase extrakce pro stanovení alfa-tokoferolu v erytrocytární membráně

Jiří Plíšek, Hana Vlčková, Lenka Krčmová, Markéta Kašparová, Dagmar Solichová, Petr Solich, Luboš Sobotka

VITAMINS 2009, Brno, Česká republika (31.8 - 2.9.2009)

9. Application of modern stationary phases in determination of neopterin and creatinine in human urine

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

An International Separation Science Society - IICS 2009, Dublin, Irsko (21.9. - 24.9.2009)

10. **Advantages of monolithic columns in HPLC determination of liposoluble vitamins in clinical research**

Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Markéta Kasparová, Jiri Plisek, Petr Solich

11. **Gold nano-particle modified monolithic silica columns: preparation and characterisation**

Ugis Danilevics, Silviya Abele, Zarah Walsh, Lenka Krčmová, Brett Paull, Mirek Macka

The 6th International Conference "Instrumental Methods of Analysis - IMA", Atény, Řecko (4. - 8.10.2009)

12. **A new HPLC method for fast determination of serum vitamin D₂, D₃, 25(OH)D₃, retinol and alpha-tocopherol using modern technologies**

Markéta Kašparová, Lenka Krčmová, Jiří Plíšek, Dagmar Solichová, Alena Vlčková, Petr Žďánský, Petr Solich, Luboš Sobotka

13. **Comparison of extraction techniques in sample preparation for vitamin A and E analysis - Advantages and disadvantages**

Lenka Krčmová, Jiří Plíšek, Dagmar Solichová, Markéta Kašparová, Luboš Sobotka Petr Solich

14. **Combination of ultracentrifugation and SPE for alpha-tocopherol extraction from human erythrocyte membranes with quantification by HPLC**

Jiří Plíšek, Hana Vlčková, Lenka Krčmová, Markéta Kašparová, Dagmar Solichová, Petr Solich, Luboš Sobotka

24. kongres SKVIMP (Společnost klinické výživy a intenzivní metabolické péče), Hradec Králové, Česká republika (28.2. - 1.3.2008)

15. **Změny produktů lipoperoxidace u familiární hypercholesterolemie při léčbě extrakorporální eliminací**

Solichová D., Bláha M., Blažek M., Krčmová L., Svobodová I., Bláha V., Urbánek L., Kašparová M., Slanařová M., Žďánský P., Malý J.

Oxidative Stress in Diseases, Bratislava - Rača, Slovensko (23.4. - 25.4.2008)

16. **New HPLC method for the simultaneous determination of 13-cis and all-trans retinoic acid, retinol, alpha- and gamma-tocopherol in human serum in monitoring of anticancer therapy using a monolithic technology**

Krčmová L., Kašparová M., Solichová D., Urbánek L., Vlčková H., Melichar B., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.

17. **Monitoring of lipoperoxidation in patients with familiar hypercholesterolemia treated by extracorporeal elimination**

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Bláha M., Bláha V., Blažek M., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.

32nd International symposium on capillary chromatography, Riva del Garda, Itálie (27.5. - 30.5.2008)

18. **A simple MECK method for the rapid determination of neopterin and creatinine in urine for clinical monitoring in anticancer therapy using UV-LED-photometric and fluorimetric detection**

Lenka Krčmová, Hana Kalábová, Marketa Ryvolová, Tomasz Piasecki, Silviya Abele, Jan Preisler, Brett Paull, Peter Hauser, Petr Solich, Mirek Macka

VITAMINS 2008, Zlín, Česká republika (9.9. - 11.9.2008)

19. **Rapid HPLC method for the determination of vitamin A and E in human serum using new technologies**

Krčmová L., Plíšek J., Kašparová M., Ascensao C., Urbánek L., Solich P., Solichová D.

20. **The new HPLC method using monolithic technology for simultaneous determination of vitamin D2, D3, 25(OH)D3, retinol and α -tokoferol in human serum**

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Žd'ánský P., Sobotka L., Solich P.

Nutrition Renaissance from care to cure, The european society for clinical nutrition and metabolism ESPEN, Florencie, Itálie (13.9. - 16.9.2008)

21. Intestinal permeability during gefitinib treatment

D.Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, H. Kalábová, L. Krčmová, A. Tichá, R. Hyšpler, L. Sobotka

UNICA Student Conference, University of Warsaw, téma: New times, new lifestyles, new health issues, Varšava, Polsko (24.9. - 27.9.2008)

22. The Youth in Modern Society: Move the Wall

Lenka Krčmová (FaF), Barbora Latečková (FSV), Roman Matoušek (PřF), Marek Radecki (MFF), Lukáš Střítecký (FSV), Jana Šmídová (FTVS), Dagmar Zadražilová (FSV)

Poster oceněn druhým místem

32th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2007, Ghent, Belgie (17.6 - 21.6.2007)

23. Development of a new HPLC method using a monolithic technology for the simultaneous determination of retinoic acid, retinol, alpha- and gama-tocopherol in human serum in monitoring of anticancer therapy

D. Solichová, L. Krčmová, L. Urbánek, H. Kalábová, H. Vlčková, B. Melichar, Z. Zadák, P. Solich

21. biochemický sjezd, České Budějovice, Česká republika (14.9. - 17.9.2008)

24. Liquid chromatography and capillary electrophoresis for the monitoring of neopterin in cancer patients

Krčmová L., Kalábová H., Kašparová M., Melichar B., Solichová D., Solich P., Macka M

25. **The new HPLC method using monolithic technology for simultaneous determination of vitamin D2, D3 and 25(OH)D3 in human serum**

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.

6th Aegean Analytical Chemistry Days, Denizli, Turecko (9.10. - 12.10.2008)

26. **Miniaturization of Solid phase extraction method for determination of liposoluble vitamins in human serum using new technologies**

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

27. **Development of new HPLC method for determination of vitamin D for clinical research**

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Vlčková A., Urbánek L., Žďánský P., Solich P.

12th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis - RDPA 2007, Elba, Itálie (23.9. - 26.9.2007)

28. **Troubleshooting of simultaneous determination of neopterin and creatinine in biological samples**

L. Urbánek, L. Krčmová, D. Solichová, L. Nováková, B. Melichar, P. Solich

22. kongres SKVIMP (Společnosti klinické výživy a intenzivní metabolické péče), Hradec Králové, Česká republika (2.3. - 4.3.2006)

29. **Intestinal Mucosal Damage Monitoring in Cancer Patients Treated with Cytotoxic Drugs**

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

12. Celostátní gerontologický sjezd, Hradec Králové, Česká republika (15.11. - 17.11.2006)

30. Využití chromatografie pro stanovení liposolubilních vitaminů a cholesterolu u gerontologických pacientů s poruchami kognice

Solichová D., Hyšpler R., Tichá A., Svobodová I., Urbánek L., Krčmová L., Žďánský P., Jurašková B., Sobotka L.

7.2 Přednášky

10th International Nutrition and Diagnostic Conference - INDC 2010, Praha, Česká republika (4.9. - 7.9.2010)

1. **Modern technologies for determination of neopterin in various biological fluids in clinical research** (přijato)

Krčmová L., Solichová D., Kašparová M., Plíšek J., Prokopová V., Bernardes F., Melichar B., Solich P.

34nd International symposium on capillary chromatography, Riva del Garda, Itálie (30.5. - 4.6.2010)

2. **LEDs as ideal light sources for capillary-based analytical instrumentation?**

Ryvolová M., Krčmová L., Piasecki T., Akhter M., Preisler J., Foret F., Hauser P. C., Maaskant P., Macka M.

62. Sjezd asociací českých a slovenských chemických společností, Pardubice, Česká republika (28.6. - 30.6.2010)

3. **Modern HPLC technologies for Biomedical Analysis**

Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Lubor Urbánek, Markéta Kašparová, Luboš Sobotka, Petr Solich

The 6th International Conference "Instrumental Methods of Analysis - IMA", Atény, Řecko (4.10. - 8.10.2009)

4. Application of modern technologies for determination of neopterin and creatinine in cancer patients

Lenka Krčmová, Dagmar Solichová, Markéta Kašparová, Jiří Plíšek, Iveta Svobodová,
Bohuslav Melichar, Petr Solich

Vitamins 2009, Brno, Česká republika (31.8 - 2.9.2009)

5. Application of modern technologies for determination of retinoids and tocopherols in biological fluids

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

XXIV. KONGRES SKVIMP (Společnosti klinické výživy a intenzivní metabolické péče), Hradec Králové, Česká republika (19.2. - 21.2.2009)

6. Význam sledování lipoperoxidace u familiární hypercholesterolemie při léčbě extrakorporální eliminací

Solichová D., Bláha M., Blažek M., Kašparová M., Slanařová M., Svobodová I., Krčmová L.,
Plíšek J., Žďárský P., Bláha V., Sobotka L., Malý J.

6th Aegean Analytical Chemistry Days, Denizli, Turecko (9.10. - 12.10.2008)

7. Application of modern technologies in biomedical analyses

Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Kašparová K.,
Žďárský P., Sobotka L., Solich P.

Přednáška oceněna prvním místem v kategorii do 35 let

Clinical, Chemical & Biochemical Aspects of Pteridines St.Christoph, Arlberg, Rakousko (4.3 - 11.3.2007)

8. Utilization of liquid chromatography for the monitoring of cancer patients

Urbánek L., Solichová D., Melichar B., Krčmová L., Solich P.

7.3 Granty

1. 2007 - Spoluřešitel, 2008 - hlavní řešitel grantu GAUK 88407/2007 Aplikace nových technologií v kapalinové chromatografii (HPLC) pro využití v klinické praxi a výzkumu (2007-2009)
2. 2008- Řešitel grantu FRVŠ 374/2008 Příprava vzorků biologického materiálu pro HPLC analýzu s využitím extrakce na pevné fázi (SPE) a extrakce do kapaliny (LLE) - jako úloha do praktického cvičení
3. Odborný spolupracovník grantu IGA MZ ČR NR/9096-4 Rizikové faktory aterosklerózy u nemocných s nádorovým onemocněním (2005-2009)
4. Spolupráce na řešení grantu IGA MZ ČR NR/9259-3 Mechanismy aterogeneze při náhradě renálních funkcí (2007-2009)
5. Spolupráce na řešení výzkumného záměru Fakultní nemocnice Hradec Králové MZO 00179906 Nové diagnostické indikátory a léčebné postupy v závislosti na různých obdobích života s důrazem na stáří (2005-2011)
6. 2009 - Řešitel grantu FRVŠ 973/2009 Ultracentrifugace - metoda úpravy biologického materiálu pro stanovení vitaminů a cholesterolu v lipoproteinech - jako úloha do praktického cvičení

7.4 Stáže

2007 - Zahraniční stáž na School of Chemical Sciences, Dublin City University, Dublin, Irsko (3 měsíce - program Erasmus)

2009 - Zahraniční stáž na School of Chemical Sciences, Dublin City University, Dublin, Irsko (4 měsíce - program Erasmus Practical Placement)

8 ZÁVĚR

Nové trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii v kombinaci s moderním zpracováním biologického materiálu nabízí možnost významně zefektivnit práci ve výzkumných i rutinních laboratořích a tím značně redukovat čas potřebný na přípravu, zpracování a analýzu velkého množství vzorků, jimiž jsou laboratoře v současné době zahlcovány.

Nové HPLC systémy pracující při vysokých tlacích (UPLC, UFLC) jsou jedním z hlavních směrů vývoje moderní kapalinové chromatografie. Tyto systémy v kombinaci s MS detekcí představují velký potenciál v moderní analytické chemii. Neméně významnou oblastí je vývoj nových stacionárních fází s vysokou separační účinností, možností pracovat v širokém rozsahu pH a v neposlední řadě významně snížit čas analýzy. Hlavní výhodou těchto stacionárních fází je jejich univerzálnost, kompatibilita s konvenčními HPLC přístroji, robustnost a také cena.

V analýze biologického materiálu hraje klíčovou roli preanalytická fáze. Pakliže je význam této fáze podceněn, ani nejmodernější analytická metoda nemůže být schopna cílové analyty identifikovat a kvantifikovat. V současné době je kladen na tuto fázi analytického procesu stále větší význam. Způsoby odběru, transportu a skladování hrají stále důležitější roli, dochází k modernizaci extrakčních postupů.

Hlavní snahou při inovaci zpracování biologického materiálu je minimalizovat délku zpracování, počet jednotlivých kroků, manuální náročnost, ale i zvýšit specifitu a výtěžnost pro cílový analyt. V současné době je nejnovějším trendem miniaturizace celého procesu, což přináší velký benefit ve vztahu k životnímu prostředí.

Předkládaná disertační práce prezentuje některé nově vyvinuté i starší modernizované metody, při kterých bylo hlavní snahou tyto technologie využít a kombinovat tak, aby došlo k jejich maximální efektivnosti. Při vývoji byly využity monolitické stacionární fáze nabízející významnou časovou úsporu při HPLC analýze, tyto stacionární fáze se také osvědčily při analýze biologického materiálu (sérum) jako stabilní, robustní s vysokou separační účinností. Podobné vlastnosti byly prokázány také u hybridní stacionární fáze Gemini-Twin při přímém nástřiku biologického materiálu (moč). Při vývoji nových a modernizaci již zavedených extrakčních postupů bylo využito předností extrakce na pevnou fázi a vnitřní standardizace, jež umožňuje eliminovat chyby již od počátku zpracování biologického materiálu. Vývoj extrakčních postupů v duchu miniaturizace umožnil speciální HPLC autosampler pro mikrotitrační destičky Rack Changer. Miniaturizace extrakce na pevnou fázi nebo jen pouhá filtrace pomocí těchto mikrotitračních destiček

představuje velkou úsporu času, rozpouštědel i biologického materiálu. Krátá doba potřebná ke zpracování biologického materiálu se stává velmi efektivní zejména ve spojení s rychlou analýzou využívající monolitické stacionární fáze a s HPLC instrumentací (Rack Changer), jež poskytuje velkou kapacitou pro rozsáhlé série vzorků.

Vzhledem ke zpracování velkých sekvencí biologického materiálu je třeba brát v úvahu i některé vlivy preanalytické fáze, které mohou nastat při prodlení mezi zpracováním jednotlivých vzorků. Proto byly provedeny stabilitní studie jednotlivých analytů při čtyřech různých teplotách, byla brána zřetel na působení světla, podmínky skladování před, během a po analýze atd. Všechny metody byly validovány dle platných norem.

Klinický význam a využití jednotlivých metod lze rozdělit dle analytů, jimiž se disertační práce zabývá na liposolubilní vitaminy a jejich deriváty (retinoidy a tokoferoly) a na neopterin a látky s podobným významem (kynurenin, tryptofan).

V posledních letech je světová pozornost věnována zkoumání vlivu volných kyslíkových radikálů na patogenezi mnoha závažných onemocnění. Volné radikály ovlivňují stárnutí, poškozují tkáně, hrají důležitou roli při vzniku kancerogeneze. Vitaminy A a E jsou schopny tyto volné radikály inaktivovat a tím chránit organismus před oxidačním stresem. Monitorování hladin těchto vitaminů tedy poskytuje bližší znalost o působení různých protinádorových chemoterapeutik a zkoumá možnost využití těchto léčiv v prevenci a léčbě nádorových onemocnění. Antioxidační kapacitu a nutriční stav lze monitorovat i u řady dalších onemocnění, jako jsou diabetes mellitus, familiární hypercholesterolemie léčená extrakorporální eliminací, akutní stav po infarktu myokardu, akutní pankreatitida, ateroskleróza atd. V neposlední řadě hraje sledování hladin těchto vitaminů důležitou roli při hodnocení nutričního stavu u gerontologických pacientů.

Kyselina retinová je jedním z derivátů vitamínu A, ovlivňuje reprodukci, embryogenezi, diferenciaci buněk, funkci zraku a imunitní odpovědi. ATRA (all-trans retinová kyselina) je využívána pro terapii akutní promyeloidní leukémie, kde mohou její vysoké dávky způsobit tzv. retinoidní syndrom. Bylo také prokázáno, že kyselina retinová hraje důležitou roli i u jiných nádorových onemocnění. Kyselina 13-cis retinová je také využívána samostatně nebo v kombinaci s jinými protinádorovými chemoterapeutiky při léčbě zhoubných nádorů hlavy a krku. Přes tato fakta není kyselina retinová u těchto pacientů rutinně monitorována. V předkládané disertační práci je prezentována metoda pro stanovení kyseliny all-trans a 13-cis retinové, retinolu, alfa- a gama-tokoferolu v lidském séru vhodná pro monitoring pacientů s akutní promyeloidní leukémií léčených kyselinou retinovou.

Další skupinu analytů tvoří látky vhodné pro sledování aktivace imunitního systému. Hlavním zástupcem je neopterin, který představuje užitečný a důležitý parametr monitorování aktivace imunitního systému, která doprovází řadu onemocnění. Zvýšené hladiny neopterinu v séru i moči byly prokázány v různých patologických situacích: u nefrotického syndromu, autoimunitních onemocnění, inzulínové rezistence, rakoviny pankreatu, kolorektálního karcinomu, akutního infarktu myokardu a celé řady dalších onemocnění. V poslední době se objevila řada prací spojujících neopterin s intracelulárním oxidativním stresem a je popisována i možná asociace s apoptózou vyvolanou tímto oxidativním stresem.

Významnými látkami pro monitorování aktivace imunitního systému jsou kynurenin a tryptofan. Kynurenin je jedním z hlavních metabolitů tryptofanu, jeho hladina v séru se významně zvyšuje u pacientů léčených hemodialýzou. Zvýšený katabolismus tryptofanu byl pozorován u onemocnění spojených s aktivací imunitního systému: u infekcí, autoimunitních a maligních onemocnění. Studie potvrzují, že zvýšený katabolismus tryptofanu přispívá k modulaci oxidačního stresu ve tkáních a ke změnám stimulace glutamátových receptorů. Tento jev se vyskytuje zejména u neurodegenerativních onemocnění jako jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba, během záchvatů epilepsie a při sclerosis multiplex.

Při stavech trvalé aktivace imunitního systému se snižuje dostupnost volného tryptofanu jako následek snížené produkce serotoninu, což může ovlivnit hlavní serotoninové funkce a vést k mentálním poruchám stejně jako k depresím.

Při onemocnění ledvin se zvyšuje katabolismus tryptofanu a tím i hladina kynureninu, která koreluje s rozvojem onemocnění.

Ve výzkumné laboratoři GMK byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení neopterinu a kreatininu (hodnoty kreatininu odráží glomerulární filtraci) v moči. Tato metoda je využívána pro monitorování hladin neopterinu u mnoha pacientů z různých oddělení FN v Hradci Králové a Onkologické kliniky FN v Olomouci. Tato metoda byla rozšířena o další analyty (kynurenin a kyselinu močovou), současně byla vyvinuta nová metoda pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v séru u pacientů s onemocněním ledvin, u kterých nelze tyto látky monitorovat v moči. Tato metoda se prokázala být vhodná i pro některé další druhy biologického materiálu jako jsou plodová voda a exsudát. Byla provedena stabilitní studie těchto látek v biologickém materiálu (sérum) a kompletní validace.

Všechny vyvinuté metody přispěly k rozšíření metodik ve Výzkumné laboratoři GMK a měly by pomoci při řešení cílů jednotlivých klinických studií a zároveň přispět k objasnění některých aspektů chemoterapeutické léčby mnoha závažných onemocnění.

9 LITERATURA

1. Štulík K., Chem. Listy, 103, 2009, 11-14
2. <http://www.lfhk.cuni.cz/chemie/dokumenty/Seminare/semin%C3%A1%C5%99%20Chromatografick%C3%A9%20metody.doc> (1.6.2010)
3. Švec F., Chem. Listy, 103, 2009, 266-270
4. http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc (1.6.2010)
5. Cvět M .S., Ber. Dtsch. Botan. Ges., 24, 1906, 316-323
6. Šaršúnová M., Hanč O.: Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve farmácii a biochemii, Osveta, Martin, 1985
7. http://apps.isiknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=S1mg2DCPEnPdMOM@Fjd&preferencesSaved=&highlighted_tab=WOS (20.7.2010)
8. <http://chemie.jiriurban.cz/22-konvencni-stacionarni-faze> (12.6.2010)
9. Sýkora D., Chem. Listy, 101, 2007, 190-199
10. http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/chxx_2_cl3.pdf (12.6.2010)
11. http://www.mz-at.de/pdf/halo_hilic_etc.pdf (12.6.2010)
12. <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/columns/lcandlcm/zorbaxporoshell300sb/pages/default.aspx> (12.6.2010)
13. Jandera P.: Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC - současný stav a perspektivy (Workshop - konference www.vitamins.cz 2003), Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice
14. Neue U. D., Walter T. H., Alden B. A., Jiang Z. P., Fisk R. P., Cook J. T., Glose K. H., Carmody J. L., Grassi J. M., Cheng Y. F., Lu Z. L., Crowley R., J. Am. Lab., 31, 1999, 36-39
15. http://www.phenomenex.com/cms400min/litlib/gemini/gemini_brochure_4997_i.pdf (10.8.2010)
16. Švec F., Chem. Listy, 98, 2004, 232-238
17. http://www.hplc.cz/Faq/monolithic_columns.htm (18.6.2010)
18. <http://www.merck-chemicals.com> (10.8.2010)
19. <http://www.chromatographer.com/wp-content/uploads/2009/10/packmono.jpg> (10.8.2010)
20. Xie S., Allington R. W., Svec F., Fréchet J. M. J., J.Chromatogr. A, 865, 1999, 169-174

21. Rohr T., Hilder E. F., Donovan J. J., Švec F., Fréchet J. M. J., *Macromolecules*, 36, 2003, 1677-1684
22. Abele S., Fu-Qiang N., Foret F., Brett P., Macka M.: Supplementary Material (ESI) for The Analyst, The Royal Society of Chemistry 2008 (<http://www.rsc.org/suppdata/AN/b8/b802693a/b802693a.pdf>) (18.6.2010)
23. Tennikova T. B., Belenkii B. G., Švec F., *J. Liq. Chromatogr.*, 13, 1990, 63-70
24. Belenkii B. G., Podkladenko A. M., Kurenbin O. I., Mal'tsev V. G., Nasledov D. G., Trushin S. A., *J. Chromatogr.*, 645, 1993, 1-15
25. Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T., *Anal. Chem.*, 72, 2000, 5693-5699
26. Motokawa M., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Jinnai H., Hosoya K., Ikegami T., Tanaka N., *J. Chromatogr. A*, 961, 2002, 53-63
27. Tanaka H., Kamada M., Nyudo M., Ohira M., *J. Chromatogr. A*, 762, 1997, 89-96
28. Nakanishi K., Soga N., *Am. Ceram. Soc.*, 74, 1991, 2518-2530
29. Tanaka N., Ishizuka N., Hosoya K., Kimata K., Minakuchi H., Nakanashi K., Soga N., *Kuromatogurafi*, 14, 1993, 50-51
30. Minakuchi M., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N., *Anal. Chem.*, 68, 1996, 3498-3501
31. Al Bokari M., Cherrak D., Guiochon G., *J. Chromatogr. A*, 975, 2002, 275-284
32. Solichová D., Habilitační práce: Možnosti využití HPLC a ultracentrifugace v klinickém výzkumu, 2010, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
33. <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/consumables/columns/lcandlcm/biomonolithhplc/Pages/default.aspx.72> (22.3.2010)
34. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/85522-DS-IonSwift-MAX100-24Mar2010-LPN2456-01.pdf> 24. (18.6.2010)
35. Macka M.: Exotické monolity pro použití v separacích i mimo ně (seminář), School of Chemical Sciences and National Centre for Sensor Research, Dublin City University, (<http://ustavchemie.sci.muni.cz/ustav/seminare/080424.pdf>)
36. Yue G., Luo Q., Zhang J., Wu S. L., Karger B. L., *Anal. Chem.*, 79, 2007, 938-946
37. Švec F., Krenkova J., *LCGC-LC Column Technology Supplement*, 2008, 2-7 (http://foundry.lbl.gov/assets/docs/pubs/MFOR_0804_FSRigid.pdf) (19.7.2010)
38. Eeltink S., Švec F., Fréchet J. M. J., *Electrophoresis*, 27, 2006, 4249-56
39. Abele S., Smejkal P., Yavorska O., Foret F., Macka M., *Analyst*, 135, 2010, 477-81

40. Svec F., Tennikova B., Deyl Z.: *Monolithic materials preparation, properties and application*, Elsevier, Amsterdam, 2003
41. Foret F.: *Mikrofluidika a hmotnostní spektrometrie - nové směry, microfluidics and mass spectrometry - new trends*, Klinická biochemie a metabolismus, Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, Praha 2007
42. Nguyen D. T. T., *J. Sep. Sci.*, 29, 2006, 1836-1848
43. Yan B., Zhao J., Brown J. S., Blackwell J., Carr P. W., *Anal. Chem.*, 72, 2000, 1253-1262
44. Clark J., *Pharm. Technol. Europe*, 16, 2004, 41-42
45. Yang X., Ma L., Carr P. W., *J. Chromatogr. A*, 1079, 2005, 213-220
46. Guillarme D., Ruta J., Rudaz S., Veuthey J. L., *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 2010, 1069-1082
47. http://www.hplc.cz/Tip/2D_HPLC.htm (18.7.2010)
48. http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedicka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Havlicek_Vladimir/op.p osudek3-VHavlicek.pdf (18.7.2010)
49. Malý J., *Opory pro kombinované studium jednooborové biologie: Bioanalytické metody*, 2009, Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně
50. <http://holcapek.upce.cz/> (18.7.2010)
51. <http://holcapek.upce.cz/teaching.htm> (18.7.2010)
52. http://www.hplc.cz/Faq/corona_CAD.html (18.7.2010)
53. Bosakova Z., *Materiály k přednáškám: Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii*, 2008/2009, Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova v Praze
54. <http://www.hplc.cz/Faq/ELSD.htm> (18.7.2010)
55. Grym J., Foret F., *Chem. Listy*, 99, 2005, 915-921
56. Bhushan B.: *Springer Handbook of Nanotechnology*, 2nd edition, Springer Science, New York, 2007
57. Kim D. S., Lee S. H., Ahn C. H., Lee J. Y., Kwon T. H., *Lab. Chip*, 6, 2006, 794-802
58. Agilent 1200 Series HPLC-Chip/MS System 2010 (www.agilent.com) (21.7.2010)
59. Věstník SÚKL 1/1994 (novelizace nebyla provedena, v novějších dokumentech je uvedena norma ICH)
60. *Český lékopis 2009*, Ministerstvo zdravotnictví ČR, GRADA, Praha, 2009
61. *European Pharmacopoeia 6th edition (PhEur. 6)*, Council of Europe, Strasbourg, 2008
62. *United States Pharmacopoeia 32*, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2010

63. Guidance for industry, Bioanalytical method validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research, Center of veterinary Medicine, 2001 (www.fda.gov)
64. Friedecký B., Šprongl L.: Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, doporučení výboru České společnosti klinické biochemie 2007 (<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporučení--validace-a-verifikace-metod>) (6.8.2010)
65. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Harmonised Tripartite guideline, Text on validation of analytical procedures Q2A
66. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Harmonised Tripartite guideline Validation and analytical procedures: methodology Q2B
67. Green J. M., *Anal. Chem.*, 68, 1996, 305-309
68. Shabir G. A., *J. Chromatogr. A*, 987, 2003, 57-66
69. Holík M.: Příručka validace analytických metod, 2007 Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
70. Analytical Detection Limits Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. Wisconsin Department of Natural Resources, Laboratory Certification Program, 1996, PUBL-TS-056-96
71. http://www.hplc.cz/Validace/index.htm#_1_Druhy_validací (25.7.2010)
72. Dolan J. W., *LCGC Europe*, 22, 2009, 132-134
73. http://www.hplc.cz/Validace/index.htm#_3.3.1_Linearita (25.7.2010)
74. Boqué R., Heyden Y. V., *LCGC Europe*, 22, 2009, 82-5
75. Racek J.: Klinická biochemie, druhé přepracované vydání, Galén, Praha, 2006
76. Zima T.: Laboratorní diagnostika, druhé přepracované vydání, Galén, Praha, 2006
77. Homolka J., Kulenda Z., Bielik E.: Klinická biochemie 1, Avicenum, Praha, 1984
78. <http://www.imumed.cz/OKBHLP-G015.html> (2.7.2010)
79. Varga F., Kováč. G., Brozmanová E.: Klinická biochemie - cvičení 2, Avicenum, Praha, 1991
80. http://www.cslr.cz/download/exudat_brozura.pdfputovky (2.7.2010)
81. <http://www.pathology.cz/dokumenty/lpc.pdf> (2.7.2010)
82. Jenness R., *Semin. Perinatol.*, 3, 1979, 225-39
83. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/da/Human_Breastmilk_-_Foremilk_and_Hindmilk.png (2.7.2010)

84. Obecné zásady bezpečnosti práce s biologickým materiálem (<http://www.kntb.cz>) (2.7.2010)
85. <http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf> (2.7.2010)
86. <http://hplc1.sweb.cz/Vet/home.htm> (2.7.2010)
87. <http://www.pragolab.cz/kategorie/59/lyofilizace-a-zakoncentrovani-vzorku> (2.7.2010)
88. Wells D. A.: High Throuput Bioanalytical Sample Preparation Methods And Automation Strategies, Elsevier, Amsterdam, 2003
89. <http://www.syrris.com/images/sce/FLLEX2.jpg> (10.8.2010)
90. Coufal P., Studijní materiály: Extrakce, 2010, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
91. <http://www.ghorganics.com/DiatomaceousEarth.html> (8.7.2010)
92. http://www.hydrobiologie.upol.cz/files/06_metody_stanoveni_pau_sfegcms.pdf (8.7.2010)
93. Bielská L., Diplomová práce: Využití metody superkritické fluidní extrakce k extrakci organických polutantů, 2008, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
94. http://www.pharmaceutical-int.com/upload/image_files/articles/images/companies/1587/gilson25.jpg (10.8.2010)
95. Poustka J., Studijní materiály: Izolační a separační metody, 2010, Ústav analýzy a chemie potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha
96. Lišková M., Diplomová práce: Syntézy za neklasických podmínek-E-Learningový kurs, 2008, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
97. www.waters.com (19.7.2010)
98. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/sigmaaldrich/migrationresource4/G003942.Par.0001.Image.453.gif> (10.8.2010)
99. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/SigmaAldrich/General_Information/11.Par.0001.File.tmp/11.pdfMeps (19.7.2010)
100. http://www.labhut.com/products/autosamplers/autosampler_ht280t.php (10.8.2010)
101. <http://medicina.ronnie.cz/c-713-vitaminy-%E2%80%93-uvod.html> (19.7.2010)
102. <http://micro.magnet.fsu.edu/vitamins/images/retinol1.jpg> (19.7.2010)
103. <http://www.SÚKL.cz/download/spc/SPC109661.doc> (19.7.2010)
104. Budavari S.: The Merck index, An Encyclopedia of Chemicals and Biologicals, 12th edition, Merck+CO. INC, New York, 1996
105. Murray K. R., Harperova Biochemie, H+H, Praha, 1998
106. Song W. O., Beecher G. R., Eitenmiller R. R., Modern Analytical Methodologies in Fat - and water - Soluble Vitamins, Wiley, New York, 1999

107. Kim C. H., *Clin. Develop. Immun.*, 2008, in press
108. Russell R. M., *Amer. J. Clin. Nutr.*, 71, 2001, 878-884
109. Kohlmeier L., Kark J. D., Gomez-Garcia E., Martin B. C., Steck S. E., Alwine F. M., Kardinaal A. F. M., Thamm J. R. M., MasaeV., Riemersma R., Martin-Moreno J. M., Huttunen J. K., Kok F. J., *Amer. J. Epidemiol.*, 146, 1997, 618-626
110. Schemann J., Malvy D., *Lancet*, 26, 2001, 1676
111. Hlúbik P., Opltová L.: *Vitaminy*, Grada, Praha, 2004
112. Vávrová J.: *Vitaminy a stopové prvky 2007*, Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi, SEKK, Pardubice, 2007
113. Szotkowski T., Faber E., Starý J., Hubáček J., Szotkowská R., Holzerová M., Jarošová M., Indrák K., *Onkologie*, 2, 2008, 145-149
114. Zelent A., *Nature Medicine*, 7, 2001, 662-664
115. Dastyh M., Hyšpler R., Dastyh M., Novotná H., Číhalová J., *Klin. Biochem. Metab.*, 15, 2007, 35-38
116. Melichar B., Dvořák J., Krčmová L., Hyšpler R., Urbánek L., Solichová D., *Am. J. Clin. Oncol.*, 31, 2008, 580-4
117. Guo X., Nanus D. M., Ruiz A., Rando R. R., Bok D., Gudas L., *J. Cancer Res.*, 61, 2001, 2774-2781
118. Croquet V., Pilette C., Lespine A., Vuillemin E., Rousselet M. C., Oberti F., Saint A. J. P., Periquet B., François S., Ifrah N., Calès P., *Eur.J. Gastroenterol. & Hepatol.*, 12, 2000, 369-369
119. Krčmová L., Diplomová práce: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení esterů retinolu v lidském séru s využitím monolitické kolony, 2006, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
120. Reinersdorff D., Bush E., Liberatot D. J., *Journal of Lipid Research*, 37, 1996, 1875-1885
121. Příbramská V., Disertační práce: Probiotika a střevní bakteriální translokace při jaterní cirhóze, 2007, Interní hepatogastroenterologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity Brno
122. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab/fig71.jpg> (5.8.2010)
123. Mandžuková J.: *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek*, JB Start, Praha, 2005
124. Brázdová Z., Pomocný učební text pro posluchače pedagogické fakulty: *Výživa*, 2009, Ústav preventivního lékařství, Lékařské fakulty, Masarykovy univerzity
125. <http://micro.magnet.fsu.edu/vitamins/images/vitamine1.jpg> (5.8.2010)

126. http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/Chrom/form_vitE.gif (5.8.2010)
127. Andreas P.: Vitamin E-zázračný antioxidant při prevenci a léčbě srdečních chorob, rakoviny a stárnutí, Pragma, 2001
128. <http://healthywealth.files.wordpress.com/2007/07/cellularprotection.jpg> (10.8.2010)
129. Ursellová A.: Vitaminy a minerály, Noxi DK, Bratislava, 2004
130. http://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/64_1957.html (5.8.2010)
131. Gundersen Th. E., Lundanes E., Blomhoff R., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 691, 1997, 4-58
132. Ruhl R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2006, 2497-2509
133. van Breemen R. B., Huang, C.-R., *FASEB. J.*, 10, 1996, 1098-1101
134. Horst R. L., Reinhardt T. A., Goff J. P., Nonnecke B. J., Gambhir V. K., Fiorella P. D., Napoli J. L., *Biochemistry*, 34, 1995, 1203-1209
135. Citová I., Havlikova L., Urbanek L., Solichova D., Novakova L., Solich P., *Anal. Bioanal. Chem.*, 388, 2009, 675-681
136. Bryana P. D.; Honigberga I. L., Meltzer N. M., *J. Liq. Chromatogr.*, 14, 1991, 2287-2295
137. Kane M. A., Chen N., Sparks S., Napoli J. L., *Biochem. J.*, 388, 2005, 363-369
138. M. E. Murphy , Kehrer J. P., *J. Chromatogr B*, 421, 1987, 71-82
139. Luscombe D. L., Bond A. M., *Talanta*, 38, 1991, 65-72
140. Granado-Lorencio F., Herrero-Barbudo C., Blanco-Navarro I., Pérez-Sacristán B., *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 2010, 1389-1393
141. Chauveau-Duriot B., Doreau M., Nozière P., Graulet B., *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 2010, 777-790
142. Delgado-Zamarreñoa M. M., Bustamante-Rangela M., Sánchez-Pérez A., Carabias-Martínez A., *J. Chromatogr. A*, 1056, 2004, 249-52
143. Heudi O., Trisconi M. J., Blake V. J., *J. Chromatogr. A*, 1022, 2004, 115-123
144. Andreoli R., Manini P., Poli D., Bergamaschi E., Mutti A., Niessen W. M. A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 2004, 987-94
145. Wachter H., Fuchs D., Hausen A., Riebnegger G., Weiss G., Werner E. R., Werner-Felmayer G.: Neopterin, *Biochemistry, Methods, Clinical Applications*, Walter de Guiter, Berlin 1992
146. Solichová D., Melichar B., Klejna M., Jurašková B., Bláha V., Žďánský P., Zadák Z., *Česká geriatrická revue*, 3, 2003, 32-33
147. http://www.neopterin.net/neopterin_e.pdf (29.7.2010)
148. <http://www.schircks.com/tablets/pack/spcbh41.gif> (10.8.2010)

149. Katoh S., Sueoka T., Matsuura S., Sugimoto T., *Life. Sci.*, 45, 1989, 2561-2568
150. Reibnegger G., Fuchs D., Zangerle R., Wachter H., *Clin. Chem.*, 36, 1990, 1379-1380
151. Yambe H., Kitamura S., Kamio M., Yamada M., Matsunaga S., Fusetani N., Yamazaki F., *PNAS*, 103, 2006, 15370-15374
152. Widner B., Werner E. R., Schennach H., Wachter H., Fuchs D., *Clin. Chem.*, 43, 1997, 2424-2426
153. Hankes L. V. , Leklem J. E., Brown R. R., Mekel M., *Am. J. Clin. Nutr.*, 24, 1971, 730-739
154. Vignau J., Jacquemont M. C., Lefort A., Imbenotte M., Lhermitte M., *Biomed. Chromatogr.*, 18, 2004, 872-874
155. Zhang X. Q., He Y., Ding M., *J. Chromatogr. B*, 877, 2009, 1678-1682
156. Mitsuhashi S., Fukushima T., Tomiya M., Santa T., Imai K., Toyo'oka T., *Anal. Chim. Acta*, 584, 2007, 315-321
157. Xiao L. D., Luo X. B., Pi L. G., Tang A. G., *Anal. Chim. Acta*, 395, 2008, 178-180
158. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00684> (5.7.2010)
159. <http://www.britannica.com/nobelprize/article-9041024> (5.7.2010)
160. Chernecky C. C., Berger B. J.: *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*, Saunders Company, USA, 1997
161. Pawlak D., Tankiewicz A., Matys T., Buczko W., *J. Physiol. Pharmacol.*, 54, 2003, 175-189
162. Wirleitner B., Neurauter G., Schrocksnadel K., Frick B., Fuchs D., *Curr. Med. Chem.*, 10, 2003, 1581-1591
163. Luo X., Tang A., Pi L., Xiao L., Ao X., Pu Y., Wang R., *Anal. Chim. Acta*, 389, 2008, 186-188
164. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00684> (12.6.2010)
165. McNally L., Bhagwagar Z., Hannestad J., *CNS Spectr.*, 13, 2008, 501-510
166. Sala A., Campagnoli M., Perani E., Romano A., Labo S., Monzani E., Minchiotti L., Galliano M., *Biol. Chem.*, 279, 2004, 51033-51041
167. Chen Y., Guillemin G. J., *Int. J. Trypt. Res.*, 2, 2009, 1-19
168. Kaper T., Looger L. L., Takanaga H., Platten M., Steinman L., Frommer W. B., *PLoS Biol.*, 5, 2007, 2201-2210
169. Kaper T., Lager I., Looger L. L., Chermak D., Frommer W. B., *Biotechnol. Biofuels*, 1, 2008, 1-10
170. <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html> (5.7.2010)
171. Ochoa S., Valdecasas J. G., *J. Biol. Chem.*, 81, 1929, 351 -357

172. Umimoto K., Tatsumi Y., Kanaya H., Jokei K., *IFMBE Proceedings*, 5, 2004, 3205-3207
173. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/KVAES.htm (5.7.2010)
174. [http://www.beckmancoulter.com/customersupport/IFU/cis/BLOSR6x204/01/CS_CREATI NINE%20\(ENZYMATIC\).pdf](http://www.beckmancoulter.com/customersupport/IFU/cis/BLOSR6x204/01/CS_CREATI NINE%20(ENZYMATIC).pdf) (5.7.2010)
175. Carru C., Zinellu A., Sotgia S., Serra R., Usai M. F., Pintus G. F., Pes G. M., Deiana L., *Biomed. Chromatogr.*, 18, 2004, 360-366
176. Novakova L., Kafmanova I., Jánská R., *J. Sep. Sci.*, 33, 2010, 765-772
177. Schroecksnadel K., Winkler C., Fuchs D., *J. of Biochem. Biophys. Methods*, 66, 2006, 99-100
178. Ribeiro de Castro M., Di Marco G. S., Arita D. Y., Teixeira L. C., Pereira A. B., Casarini D. E., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 59, 2004, 275-83
179. Immanuel C., Victor L., Chelvi K. S., Padmapriyadarsini C., Rehman F., Iliayas S. Swaminathan S., *Indian J. Med. Res.*, 121, 2005, 220-225
180. Immanuel C., Rajeswari R., Rahman F., Kumaran P., Chandrasekaran V., Swamy R., *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 5, 2001, 185-190
181. Pawlak D., Brzóska M., Zwierz K., Stypułkowska A., Moniuszko-Jakoniuk J., *Pol. J.f Environ. Stud.*, 14, 2005, 209-215
182. Laich A., Neurauter G., Widner B., Fuchs D., *Clinical Chemistry*, 48, 2002, 579-581
183. Maneglier B., Rogez-Kreuz C., Cordonnier P., Therond P., Advenier C., Dormont D., Clayette P., Spreux O., *Clin. Chem.*, 50, 2004, 2166-2168
184. Herve C., Beyne E., Jamault H., Delacoux E., *J. Chromatogr. B*, 675, 1996, 157-161
185. Mackay G. M., Forrest C. M., Stoy N., Christofidec J., Egerton M., Stone T. W., Darlington L. G., *Eur. J. Neurol.*, 13, 2006, 30-42
186. Xiang Z. Y., Tang A. G., Ren Y. P., Zhou Q. X., Luo X. B., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 48, 2010, 513-7
187. Widner B., Werner R. E., Schennach H., Wachter W., Fuchs D., *Clin. Chem.*, 43, 1997, 2424-2426
188. Snytnikova A. O., Kopylova L. V., Chernyak E. I., Morozov S. V., Kolosova N. G., Tsentalovich Y. P., *Mol. Vis.*, 15, 2009, 2780-2788
189. Boni R. L., Simpson J. T., Naritsin D. B., Saito K., Markey S. P., *Biol. Mass Spectrom.*, 23, 1994, 27-32
190. Bech-Andersen S., *Acta Agr. Scand.*, 41, 1991, 305-309
191. Thienpont L., Van Landuyt M. K. G., Stockl D., Saeyens W., Keukeleire D., Leenheer A. P., *J. Chromatogr. B*, 665, 1995, 63-69

192. Urbánek L., Solichová D., Melichar B., Dvořák J., Svobodová I., Solich P., *Anal. Chim. Acta*, 573-574, 2006, 267-272
193. Plíšek J., Diplomová práce: Aplikace technologie nových stacionárních fází v HPLC analýze biologicky aktivních látek - stanovení vitamínu E, 2009, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
194. Dědečková K., Diplomová práce: Využití moderních technologií pro úpravu biologického vzorku v HPLC analýze, 2008, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
195. Ascensao C., Erasmus Investigation Project: Development of a reversed phase procedure for selective and sensitive determination vitamin A and E in blood serum, using monolithic column and diode array detection, using Tocol as internal standard, 2008, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, Charles University Prague, Czech Republic
196. Vlčková H., Diplomová práce: Aplikace technologie nových stacionárních fází v HPLC analýze biologicky aktivních látek pro klinické využití - stanovení kyseliny retinové, 2008, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
197. Prokopová V., Diplomová práce: Využití nových typů stacionárních fází pro HPLC stanovení neopterinu a dalších metabolitů v moči, 2008, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
198. Martins M., Erasmus Investigation Project: Development of a new HPLC Method for simultaneous determination of pteridines (neopterin, biopterin, dihydroneopterin and dihydrobiopterin), Kynurenine, Uric Acid and Creatinine in human urine, 2008-2009, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Charles University Prague, Czech Republic
199. Bernardes F., Erasmus Investigation Project: Development of a reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of Neopterin, Kynurenine, Creatinine and Tryptophan, 2010, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Charles University Prague, Czech Republic
200. Krcmova L., Stjernlof A., Mehlen S., Hauser P. C., Abele S., Paull B., Macka M., *Analyst*, 134, 2009, 2394-2396
201. Melichar B., Kalabova H., Krcmova L., Urbanek L., Hyspler R., Malirova E., Solichova D., *Anticancer Res.*, 27, 2007, 4397-4401

202. Melichar B., Kalabova H., Krcmova L., Urbanek L., Hyspler R., Solichova D., Melicharova K., Pecka M., Zadak Z., *Anticancer Res.*, 29, 2009, 3337-3346
203. Melichar B., Dvorak J., Kalabova H., Hyspler R., Krcmova L., Kasparova M., Urbanek L., Solichova D., *Scan. J. Clin. Lab. Inv.*, 70, 2010, 180-187
204. Cincibuch J., Melichar B., Studentova H., Kapustova M., Malirova E., Solichova D., Krcmova L., Kasparova M., Schneiderka P., Juranova J., Sramek V., Cwiertka K., *Pteridines*, 20, 2009, 49-53
205. Melichar B., Kalabova H., Krcmova L., Kasparova M., Malirova E., Melicharova K., Pecka M., Hyspler R., Solichova D., *Anticancer Res.*, 29, 2009, 4813-4820
206. Melichar B., Plisek J., Hyspler R., Kalabova H., Kasparova M., Krcmova L., Studentova H., Solichova D., *J. Nutr.Sci. Vitaminol.*, 56, 2010, 98-103
207. Urbanek L., Krcmova L., Solichova D., Melichar B., Opletalova V., Solich P., *J. Sep. Sci.*, 29, 2006, 2485-93
208. Melichar B., Dvorak J., Krcmova L., Hyspler R., Urbanek L., Solichova D., *Am. J. Clin. Onc.-Canc.*, 31, 2008, 580-584
209. Melichar B., Hyspler R., Kalabova H., Urbanek L., Krcmova L., Solichova D., *Pteridines*, 19, 2008, 19-22
210. Dvořák J., Melichar B., Hyšpler R., Krčmová L., Urbánek L., Kalábová H., Kašparová M., Solichová D., *Med Oncol.*, 2009, v tisku
211. Melicharova K., Kalabova H., Krcmova L., Urbanek L., Solichova D., Melichar B., *Eur. J. Canc. Care*, 19, 2010, 340-345
212. Kalabova H., Dvorak J., Hyspler R., Ticha A., Krcmova L., Urbanek L., Solichova D., Melichar B., *Pteridines*, 18, 2007, 95-100
213. Melichar B., Urbanek L., Krcmova L., Kalabova H., Svobodova I., Dragounova E., Vesely P., Hyspler R., Solichova D., *Pteridines*, 17, 2006, 145-153
214. Melichar B., Balloková A., Malirova E., Urbanek L., Krcmova L., Hyspler R., Hornychova H., Ryska A., Solichova D., *Pteridines*, 19, 2008, 65-71
215. Melichar B., Urbanek L., Krcmova L., Kalabova H., Melicharova K., Malirova E., Hornychova H., Ryska A., Hyspler R., Solichova D., *Anticancer Res.*, 28, 2008, 2389-2396
216. Puzstai L., Mendoza T. R., Reuben J. M., Martinez M. M., Willey J. S., Lara J., Syed A., Fritsche H. A., Bruera E., Booser D., Valero V., Arun B., Ibrahim N., Rivera E., Royce M., Cleeland C. S., Hortobagyi G. N., *Cytokine*, 25, 2004, 94-102

217. Tsavaris N., Kosmas C., Vadiaka M., Kanelopoulos P., Boulamatsis D., *Br. J. Cancer*, 87, 2002,
21-27

