

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD
V KLINICKÉM VÝZKUMU

Disertační práce

Školitel Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2013 Mgr. Markéta Drastíková

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

Mgr. Markéta Drastíková

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a Doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D., školiteli specialistovi, za odborné vedení, všechny cenné rady, připomínky a také za podporu a laskavý přístup.

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

Dále bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Milanovi Bláhovi CSc., Prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D. a Doc. PharmDr. Miloslavu Hronkovi, Ph.D. za to, že mi umožnili podílet se na jejich klinických výzkumech. Stejně tak děkuji všem z Katedry analytické chemie za rady a ochotu, se kterou vždy přijímali mé dotazy.

Na závěr bych chtěla vyjádřit velké díky rodičům a sestřám, kteří mě velmi povzbuzovali k dokončení postgraduálního studia. Za podporu děkuji také přátelům, speciálně těm, se kterými jsme se „našli“ během studia. Největší dík ale patří mému manželovi, bez jehož podpory bych nikdy nedospěla až k závěru.

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

„The eye sees only what the mind is prepared to comprehend“

Henri Bergson

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Markéta Drastíková (roz. Kašparová)

Školitel: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Název disertační práce: Využití separačních metod v klinickém výzkumu

Předkládaná práce se zabývá vývojem a validací chromatografického stanovení liposolubních vitamínů a optimalizací vhodných postupů přípravy biologického materiálu.

V první části je řešena problematika stanovení vitamínů D, A a E v séru. Pro separaci analytů byly vyvinuty postupně dvě metody. 1) Separace na monolitních kolonách – byly použity dvě sériově zapojené monolitní kolony Chromolith Performance RP-18e, 100×4,6 mm a SpeedRod RP-18e, 50×4,6 mm. Vitamíny 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃, retinol, tokol (vnitřní standard), cholekalciferol, ergokalciferol a α-tokoferol byly separovány během 6,5 minuty. Extrémně rychlá změna složení i průtoku mobilní fáze byla zajištěna skokovým gradientem. Takto byla maximálně využita velmi rychlá ekvilibrace monolitních kolon. 2) Separace na koloně s částicemi s pevným jádrem – kolona Ascentis Express RP-Amide 75×3,0 mm. Pro rychlou separaci byla použita gradientová eluce. Stanovení retinolu, 25(OH)D₂, 25(OH)D₃, tokolu (vnitřní standard) a α-tokoferolu po optimalizaci separace nečistot přítomných ve vzorku trvalo 8,5 minuty. Při výběru vhodné přípravy vzorku byly porovnávány postupy extrakce na pevnou fázi (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), které byly vyvinuty. Jako vhodnější byl zvolen LLE postup, který optimalizoval uvolnění analytů z proteinových nosičů. Přídavkem EDTA ke vzorku před deproteinací a okyselením extrakčního prostředí kyselinou trichloroctovou bylo dosaženo výtěžností stanovovaných vitamínů mezi 98–109 %. Celý postup přípravy vzorku trvá méně než 45 minut.

Druhá část práce je věnována vývoji postupu přípravy vzorku pro stanovení retinolu a α-tokoferolu v mateřském mléce. Také v tomto případě byla zvolena LLE. Postup zahrnující deproteinaci, saponifikaci a samotnou extrakci byl validován podle požadavků FDA. Výtěžnost retinolu se na třech koncentračních hladinách pohybovala mezi 82–90 %, α-tokoferolu 92–109 %. Metoda byla aplikována na vzorky mateřského mléka. Ze závěrů statistického hodnocení vyplývá, že koncentrace retinolu v průběhu laktace statisticky významně klesá na hladině významnosti 5%.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové Department of analytical chemistry

Candidate: Markéta Drastíková (maiden name Kašparová)

Supervisor: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Title of Doctoral Thesis: Using of separation methods for clinical research

This doctoral thesis deals with development and validation of a chromatographic determination of liposoluble vitamins and with optimization of biological materials preparation.

The first part of this work is focused on vitamins D, A and E assessment in serum. To separate studied analytes two different methods were developed successively. 1) Separation employing monolithic columns – two different monolithic columns Chromolith Performance RP-18e, 100×4.6 mm and SpeedRod RP-18e, 50×4.6 mm were connected in series. Vitamins 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃, retinol, tocol (internal standard), cholecalciferol, ergocalciferol and α-tocopherol were separated within 6.5 minutes using step gradient elution. 2) Separation exploiting a core-shell column – Ascentis Express RP-Amide 75×3.0 mm. To decrease the separation time a linear gradient was employed. The determination of 25(OH)D₂, 25(OH)D₃, tocol (internal standard) α-tocopherol took 8.5 minutes within separation of impurities. Developed solid phase (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE) procedures were compared to select optimal method of sample preparation. A liquid-liquid extraction (LLE) was used as a prepreparation step to release vitamins bound to carrier proteins. The addition of EDTA before deproteination and extraction agent acidification resulted in the optimized prepreparation procedure. The sample preparation took less than 45 minutes providing recovery 98–109 %.

In the second part of this work a development of a human breast milk sample preparation is described. In this case, retinol and α-tocopherol were the analytes. The LLE was the method of choice preceded by deproteination and saponification. The whole procedure was validated according to FDA demands. The recovery at three concentration levels was 82–90 % and 92–109 % for retinol and α-tocopherol, respectively. The optimized method was applied on real samples and evaluated. A statistically significant ($\alpha=0,05$) decrease in retinol concentration during lactation period was observed.

1 Obsah

1	Obsah.....	3
2	Úvod.....	6
3	Cíle práce	7
4	Teoretická východiska	9
4.1	Stanovované liposolubilní vitamíny.....	9
4.1.1	Fyzikální vlastnosti	9
4.1.2	Chemické vlastnosti	11
4.1.2.1	<i>Vitamín A</i>	<i>11</i>
4.1.2.2	<i>Vitamín E</i>	<i>12</i>
4.1.2.3	<i>Vitamín D.....</i>	<i>13</i>
4.2	Separační metody – využití v klinické praxi a výzkumu	15
4.2.1	Chromatografické metody.....	16
4.2.1.1	<i>Plynová chromatografie (GC).....</i>	<i>17</i>
4.2.1.2	<i>Kapalinová chromatografie (LC).....</i>	<i>18</i>
4.2.2	Elektroforetické metody	20
4.2.3	Další separační metody	21
4.2.3.1	<i>Precipitace</i>	<i>21</i>
4.2.3.2	<i>Filtrace.....</i>	<i>22</i>
4.2.3.3	<i>Centrifugace.....</i>	<i>22</i>
4.2.3.4	<i>Extrakce</i>	<i>23</i>
4.3	Stanovení vitamínu D a ostatních liposolubilních vitamínů v lidském séru	26
4.3.1	Klinické zdůvodnění	26
4.3.2	Složení matrice.....	29
4.3.2.1	<i>Nestánovované komponenty séra</i>	<i>29</i>
4.3.2.2	<i>Stanovované analyty – transport, koncentrace</i>	<i>30</i>
4.3.3	Možnosti stanovení	31
4.3.3.1	<i>Příprava vzorku.....</i>	<i>31</i>
4.3.3.2	<i>Separace vitamínů, detekce</i>	<i>32</i>
4.3.3.3	<i>Moderní přístupy – miniaturizace, automatizace.....</i>	<i>32</i>
4.3.3.4	<i>Metody používané v praxi pro stanovení vitamínu D.....</i>	<i>33</i>
4.3.3.5	<i>Doporučení pro diagnostiku deficitu vitamínu D.....</i>	<i>41</i>
4.4	Stanovení retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce	42
4.4.1	Klinické zdůvodnění	42
4.4.2	Složení matrice.....	43
4.4.2.1	<i>Nestánovované složky.....</i>	<i>43</i>
4.4.2.2	<i>Stanovované analyty – transport, koncentrace</i>	<i>44</i>

4.4.3	Možnosti stanovení	45
4.4.3.1	Příprava vzorku.....	45
4.4.3.2	Stanovení – separace vitamínů, detekce.....	47
4.4.3.3	Moderní přístupy, automatizace.....	47
5	Přístrojové vybavení	48
5.1	Chromatografické sestavy	48
5.2	Laboratorní vybavení pro přípravu vzorků	50
6	Experimentální část I - Stanovení vitamínů A, E a D v lidském séru	51
6.1	Chromatografická separace vitamínů.....	51
6.1.1	Separace na monolitních kolonách.....	51
6.1.1.1	Standardy, chemikálie, příprava roztoků	52
6.1.1.2	Vývoj metody.....	52
6.1.1.3	Výsledky	53
6.1.2	Separace na kolonách s pevným jádrem a porézním povrchem.....	58
6.1.2.1	Standardy, chemikálie, příprava roztoků	58
6.1.2.3	Vývoj metody.....	60
6.1.2.4	Výsledky	63
6.2	Příprava vzorku před chromatografickou separací.....	67
6.2.1	Extrakce na pevnou fázi (SPE).....	67
6.2.1.1	Standardy, chemikálie, příprava roztoků	67
6.2.1.2	Výsledky	68
6.2.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)	71
6.2.2.1	Standardy, chemikálie, příprava roztoků	72
6.2.2.2	Výsledky	73
6.3	Závěr.....	78
7	Experimentální část II – Stanovení retinolu a α-tokoferolu v mateřském mléce.....	81
7.1	Použité chemikálie a příprava roztoků	81
7.2	Chromatografická metoda	82
7.3	Vývoj postupu pro přípravu vzorku	83
7.3.1	Optimalizace deproteinace	83
7.3.1.1	Pracovní postup	83
7.3.1.2	Výsledky pokusu	84
7.3.2	Optimalizace saponifikačního procesu.....	84
7.3.2.1	Pracovní postup	85
7.3.2.2	Výsledky pokusu	85
7.3.3	Optimalizace LLE	86
7.3.3.1	Pracovní postup	86
7.3.3.2	Výsledky pokusu	87

7.4	Optimalizovaný postup přípravy vzorku:.....	87
7.4.1	Validace extrakčního postupu	87
7.4.1.1	<i>Pravdivost</i>	88
7.4.1.2	<i>Preciznost</i>	88
7.4.3	Aplikace metody	89
7.5	Závěr.....	93
8	Seznam použitých zkratk	94
10	Seznam literatury:	96
11	Přehled publikační činnosti	105
11.1	Publikace s podílem na analytické části	105
11.2	Ostatní publikace.....	107
11.3	Přehled odborných sdělení	108
12	Řešené granty	111
13	Přílohy – publikace s podílem na analytické části	112
13.1	Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk.....	112
13.2	Carotid Intima-media Thickness and Laboratory Parameters of Atherosclerosis Risk in Patients with Breast Cancer.....	119
13.3	Separation of Vitamins Retinol Acetate, Ergocalciferol, or Cholecalciferol and Tocopherol Acetate Using Sequential Injection Chromatography.....	124
13.4	Urinary Neopterin, Serum Retinol, alpha-tocopherol and Homocysteine in Breast Cancer Patients During Treatment with Bevacizumab and Chemotherapy	136
13.5	Intestinal permeability, vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib	143
13.6	Serum Homocysteine, Cholesterol, Retinol, alpha-Tocopherol, Glycosylated Hemoglobin and Inflammatory Response during Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, 5-Fluorouracil and Leucovorin.....	151
13.7	HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy	156
13.8	Serum Neopterin, Retinol and Alpha-tocopherol in Patients with the Carcinoma of the Esophagus.....	165
13.9	The importance of rheological parameters in the therapy of microcirculatory disorders	170

2 Úvod

Vzhledem k poznatkům posledních sta let, které objasňují nové souvislosti biochemických pochodů a sledovaných biologicky aktivních látek, množství biochemických vyšetření používaných v klinické praxi i výzkumu neustále roste. Tento stav vyžaduje nejen aktivní přístup při vyhledávání a testování bioaktivních molekul jako nových prediktivních markerů, ale také klade nemalé nároky na laboratorní metodologii a vybavení. Hlavní požadavky na laboratorní suplement vychází také z jasného trendu zpřístupnění nových klinicky významných stanovení pro lékaře mimo velké nemocnice. Rozšíření spektra markerů dostupných pro klinické zhodnocení pacienta umožní včasnou diagnostiku závažných civilizačních chorob. Celkový přístup k laboratorní metodologii samozřejmě ovlivňuje také velký tlak na ekologičnost všech postupů. Konkrétně se tento přístup projevuje v požadavcích na minimalizaci tvorby odpadu a omezování množství používaných nebezpečných látek a organických rozpouštědel.

Separční metody, které jsou tématem mé disertační práce, splňují většinu požadavků kladených na novodobý laboratorní komplement. Obzvláště v klinickém výzkumu umožňují na základě dobře prozkoumaných principů pomocí moderních přístupů značně rozšířit spektrum analytických stanovení. Například nové materiály stacionárních fází chromatografických kolon zvyšují specifitu a selektivitu základních separačních procesů. Novodobé UHPLC systémy jsou přizpůsobené vysokým zpětným tlakům, které vznikají při separaci na částicích menších než 2 μm . Další možností zlepšení separace a zrychlení analýzy jsou částice s pevným jádrem a porózním povrchem. Nenahraditelné místo mají separační metody při přípravě vzorků před samotným stanovením. Rozdělení biologického materiálu na základě fyzikálních principů (rozdělení pevné a kapalné složky materiálu, jednotlivých druhů buněk nebo dokonce organel), případně další oddělení skupiny analytů na základě fyzikálně-chemických vlastností molekul např. extrakce, umožňuje odstranění interferujících komponent.

Separční analytické metody umožňují stanovení více analytů z jednoho vzorku. Čas potřebný na jedno vyšetření je tak oproti jiným metodám kratší. Další výhodou je měření větších sérií vzorků.

3 Cíle práce

Cíle této disertační práce vycházely z konkrétních požadavků na Výzkumnou laboratoř III. Interní gerontometabolické kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kde jsem pracovala v průběhu celého svého doktorského studia. Laboratoř se zaměřuje na vývoj nových moderních chromatografických metod vhodných pro klinický výzkum. Jsou zde zpracovávány vzorky biologického materiálu získané během klinických studií nejenom ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Laboratoř spolupracuje také s klinickými pracovišti z jiných nemocnic v České republice a s odborníky a analytickými laboratořemi po celém světě.

Jedním z úkolů laboratoře byl vývoj chromatografické metody pro stanovení vitamínu D vzhledem ke klinickému významu pro mnoho civilizačních onemocnění a nárůstu požadavků na jeho vyšetření. V posledních pěti letech byla vyvinuta řada metod pro stanovení vitamínu D z biologického materiálu, problémem je ale jejich porovnatelnost a standardizace. Špatná návaznost různých metod stanovení na certifikované referenční materiály a dříve také jejich nedostupnost způsobila velké problémy s možností klinického hodnocení stavu pacientů. Chromatografické stanovení vitamínu D na rozdíl od imunochemických stanovení umožňuje rozlišit oba vitamery (cholekalCIFerol a ergokalCIFerol). Požadavek, který vznikl z této situace, byl **vývoj vhodné chromatografické metody pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů, ale také ostatních liposolubilních vitamínů v lidském séru** pro možné komplexní hodnocení stavu pacienta. Chromatografická metoda vyžaduje úpravu vzorku před samotným stanovením, vhodná extrakce analytů z biologického materiálu zvyšuje selektivitu i citlivost stanovení. Na vývoj extrakční metody byl kladen velký důraz, protože v době řešení úkolu v laboratoři byl dostupný pouze chromatograf s UV detekcí. Zvýšení citlivosti stanovení na základě čistoty připraveného vzorku a případného zakoncentrování analytů bylo zcela zásadní.

Dalším cílem této práce bylo **vyvinout, zvalidovat a zavést extrakční metodu pro stanovení liposolubilních vitamínů v mateřském mléce**. Důvodem byl požadavek na možnost hodnocení množství vitamínů v mateřském mléce, a zda je dodávání vitamínů dítěti při plném kojení dostatečné. Další požadavek na vhodnou metodu stanovení vitamínů v mateřském mléce vycházel z činnosti Mléčné banky, která je součástí FN Hradec Králové. Mateřské mléko od dárcyň je zde skladováno pro akutní případy, kdy matka není schopna dítě

kojit. Stanovení vitamínů ve vzorcích mléka z Mléčné banky je zásadní pro kontrolu stability v průběhu tepelné úpravy a skladování. Dále také jako nástroj hodnocení vhodnosti vzorku pro konkrétního novorozence. Požadavky dítěte a obzvláště nedonošených novorozenců na množství přijímaných vitamínů se mění v průběhu jejich vývoje.

Dalším, neméně důležitým úkolem, byla spolupráce na probíhajících výzkumných projektech Fakultní nemocnice Hradec Králové. Převážně se jednalo o zpracování vzorků, stanovení požadovaných analytů, statistické zhodnocení výsledků a ve spolupráci s kliniky publikační výstupy. Mezi stanovované parametry patřily retinol a α -tokoferol, vitamíny stanovované ve Výzkumné laboratoři III. Interní gerontometabolické kliniky. Velká část zpracovaných vzorků byla součástí spolupráce s klinikou Onkologie a radioterapie. V séru pacientů byly sledovány změny parametrů v průběhu léčby. Důležitým projektem bylo zpracovávání vzorků pacientů léčených LDL aferézou a rheoferézou. Cílem této studie bylo pokračovat v dlouhodobém sledování parametrů stanovovaných v séru pacientů před a po léčebné proceduře.

4 Teoretická východiska

4.1 Stanovované liposolubilní vitamíny

Základní rozdělení vitamínů na základě jejich rozpustnosti vychází v podstatě z historie prvních objevů vitamínů. V tučích rozpustný vitamín A objevený v tresčích játrech a ve vodě rozpustný vitamín B objevený v kvasinkách [1].

Do jednotlivých skupin vitamínů patří chemicky podobné substance (vitamery), které mají stejnou biologickou aktivitu. Tato biologická účinnost není ale pro všechny vitamery stejná ve smyslu kvantitativním [1]. Mezi liposolubilní, v tučích rozpustné, vitamíny patří skupina retinolů (vitamín A), tokoferolů (vitamín E), kalciferolů (vitamín D) a fyllochinonu (vitamín K). Tyto molekuly mají významné hydrofobní vlastnosti. Tabulka 1 shrnuje stanovované vitamery a aktivní metabolity jednotlivých vitamínů.

Vitamín	Vitamer	Aktivní metabolit
vitamín A	all- <i>trans</i> -retinol	
vitamín E	α -tokoferol	
vitamín D	cholecalciferol (D ₃)	25-hydroxycholecalciferol
		1,25-dihydroxycholecalciferol
	ergocalciferol (D ₂)	25-hydroxyergocalciferol
		1,25-dihydroxyergocalciferol

Tabulka 1: Stanovované vitamery a aktivní metabolity liposolubilních vitamínů (upraveno podle [1])

4.1.1 Fyzikální vlastnosti

V průběhu přípravy vzorku převážně při extrakci analytů z matrice vzorku a během separace jednotlivých vitamínů před samotnou detekcí hrají fyzikální vlastnosti stanovovaných molekul zásadní roli. Ovlivňují selektivitu a specifitu celého procesu. Pouze vhodně zvolené vlastnosti prostředí v průběhu přípravy vzorku i samotného stanovení umožní detekovat vybrané vitamíny bez získání falešně pozitivních nebo negativních výsledků. Hodnoty vybraných fyzikálních vlastností, které jsou důležité pro přípravu vzorku a detekci, jsou pro stanovované vitamery shrnuty v tabulce (Tabulka 2).

Vitamer	Sumární vzorec	MW ^a g/mol	log P ^b	polární plocha ^c Å ²	λ ^d nm	λ _{ex} ^e nm	λ _{em} ^f nm
All- <i>trans</i> -retinol	C ₂₀ H ₃₀ O	286,45	6,84	20,23	325	325	470
α-Tokoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430,71	10,96	29,46	292	295	320
Cholekalciferol	C ₂₇ H ₄₄ O	384,64	9,09	20,23	265		
Ergokalciferol	C ₂₈ H ₄₄ O	396,65	9,15	20,23	264		
25(OH)D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400,64	7,08	40,46	265		
25(OH)D ₂	C ₂₈ H ₄₄ O ₂	412,65	7,39	40,46			
1,25(OH) ₂ D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	416,64	5,63	60,69	264		
1,25(OH) ₂ D ₂	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428,64	5,94	60,69			

Tabulka 2: Fyzikální vlastnosti vybraných liposolubilních vitamínů

^a suma atomových hmotností všech atomů molekuly

^b rozdělovací koeficient – poměr koncentrace analytu mezi dvěma vodnými fázemi (predikce ACD/PhysChem Suite)

^c vypočítaný polární povrch molekuly (predikce ACD/PhysChem Suite)

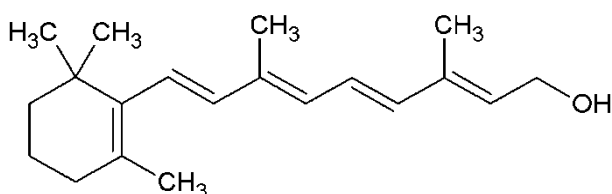
^{d, e, f} hodnoty absorpčního maxima, excitačních a emisních vlnových délek byly převzaty z literatury [1]

4.1.2 Chemické vlastnosti

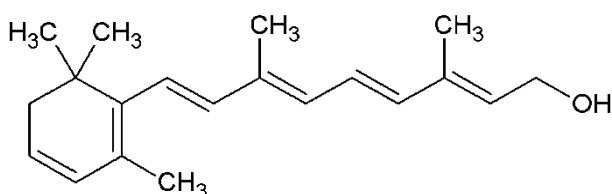
Pro skupinu liposolubilních vitamínů je typická přítomnost pěti-uhlíkaté isoprenové jednotky v molekule. Molekuly sice obsahují některé polární skupiny, ale základní strukturou je aromatický nebo alifatický řetězec.

4.1.2.1 Vitamín A

Vitamín A se vyskytuje ve dvou formách: **A1 (retinol)** – struktura viz Obrázek 1) a **A2 (3-dehydroretinol)** – struktura viz Obrázek 2). Mezi retinoly patří celkem 16 cis, trans izomerů, které vznikají na čtyřech dvojných vazbách postranního řetězce [2].



Obrázek 1: Strukturní vzorec retinolu



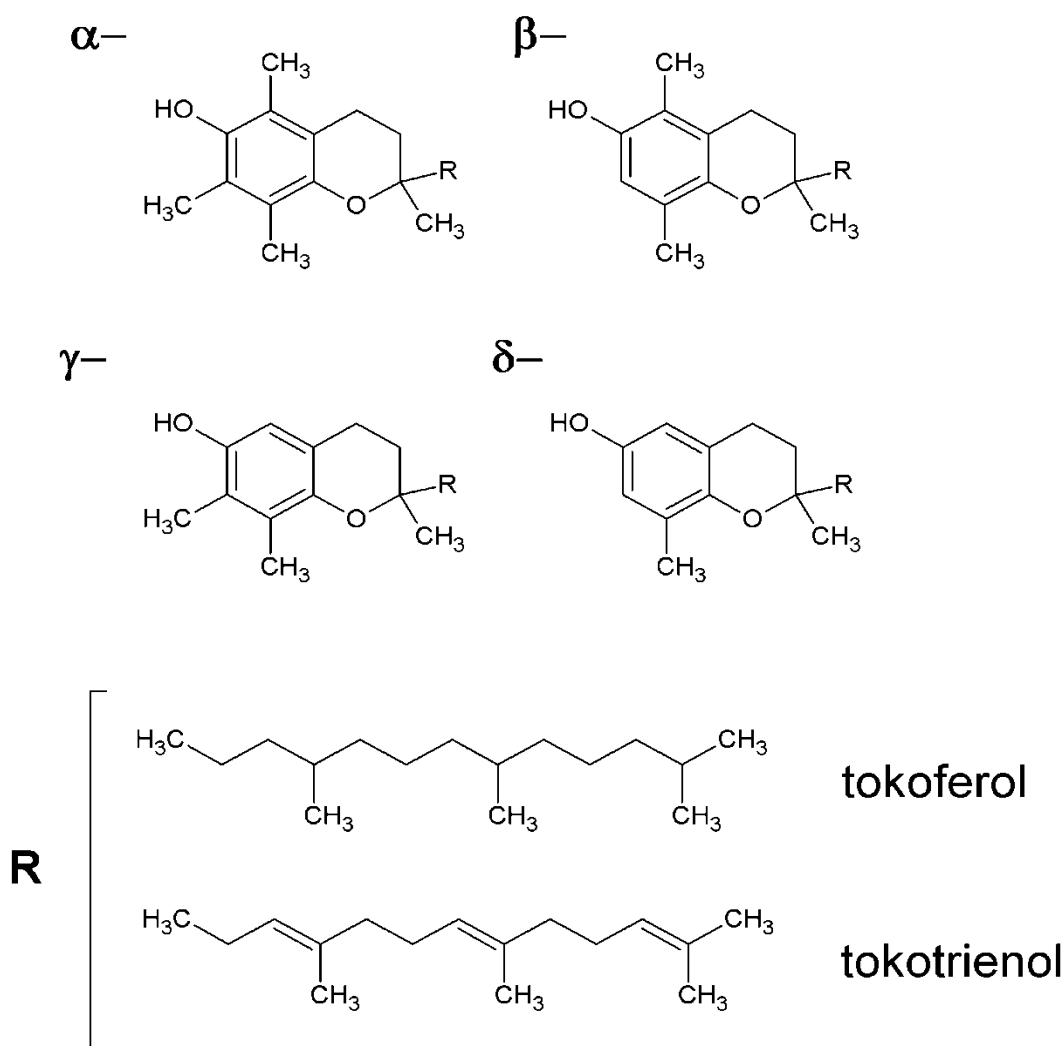
Obrázek 2: Strukturní vzorec 3-dehydroretinolu

Izomerace je jedním ze základních funkčních přeměn retinolů. Rychlá, světlem indukovaná, izomerace 11-*cis* retinalu na all-*trans* umožňuje změnu konfigurace molekuly na takové úrovni, že dochází k uvolnění Schiffovy baze mezi vitamínem a bílkovinou opsinem. Také jaderné receptory pro retinovou kyselinu (RA) mají různou afinitu k některým *cis*- izomerům. All-*trans* izomery retinové kyseliny mají vysokou afinitu pouze k RAR (retinoic acid receptor), zatímco 9-*cis* retinová kyselina má vysokou afinitu k receptorům RAR i RXR (retinoid „x“ receptor). 13-*cis* retinová kyselina hraje pravděpodobně zásadní roli v regulaci oxidace retinolu na aktivní metabolity, důvodem je ireverzibilita reakce druhé fáze oxidace na kyselinu retinovou [1].

Funkční metabolity vznikají v organismu oxidací základních molekul na C₁₅. Retinal je zcela zásadní pro proces vidění. Kyselina retinová odpovídá za funkce nesouvisející s viděním. Vazbou na specifický jaderný receptor ovlivňuje expresi genů a dále buněčnou diferenciaci, embryonální vývoj a imunitní reakci. Přítomnost neoxidované molekuly retinolu v organismu je nepostradatelná pro reprodukční funkci [1].

4.1.2.2 Vitamín E

Vitamery, které řadíme do funkční skupiny **vitamínu E**, vycházejí ze dvou základních skupin: **tokoferolů** a **tokotrienolů**. Podle počtu methylových skupin a jejich polohy na chromanovém jádře jsou jednotlivé analogy pojmenovány (α - trimethyl, β - a γ - dimethyl a δ - monomethyl derivát). Rozlišení jednotlivých skupin a struktura jejich analogů viz Obrázek 3.



Obrázek 3: Struktura methylovaných analogů skupiny tokoferolu a tokotrienolu

Na postranním řetězci molekul může docházet k izomeraci. Biologická aktivita molekuly souvisí s epimerní konfigurací v poloze 2, která je rozpoznávána specifickým receptorem ve tkáních. Jako mezinárodní standard aktivity vitamínu E je považován vitamer R,R,R- α -tokoferol. Oproti tomuto stereoizomeru mají β - a γ - vitamery zanedbatelnou biologickou účinnost [3].

Základem antioxidační funkce α -tokoferolu je oxidace chromanolového kruhu. Nejprve vzniká tokoferoxylový radikál a další oxidací tokoferylchinon, který už nemá žádnou biologickou aktivitu vitamínu. Tato katabolická reakce pokračuje částečnou redukcí a konjugací s glukuronovou kyselinou. Předpokládá se, že tokoferoxylový radikál může být částečně redukován zpět na tokoferol tím, že hydroxylový elektron je předáván postupně mezi několika redukčními systémy buňky. Takto může pokračovat recyklace vitamínu, dokud není redukční systém vyčerpán [3].

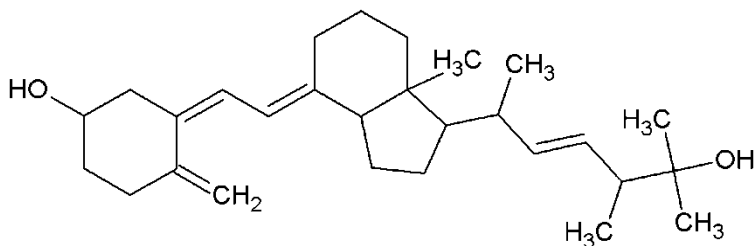
Katabolické reakce tokoferolu probíhají také na postranním fytylovém řetězci. Tuto reakci zprostředkuje cytochrom P450, nejprve probíhá β -hydroxylace a dehydrogenace na 13'-chromanol, dále je postranní řetězec zkrácen o dvou a tří uhlíkaté fragmenty. Vznikají Simonovy metabolity (tokoferonová kyselina tokoferonolakton), které jsou vylučovány močí jako konjugáty s kyselinou glukuronovou [1].

4.1.2.3 Vitamín D

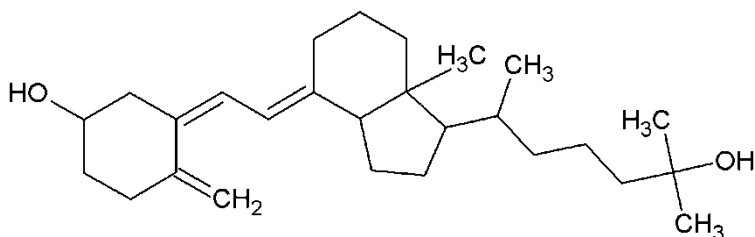
Vitamín D se vyskytuje ve dvou vitamerech **cholecalciferol (vitamín D₃)** a **ergocalciferol (vitamin D₂)**. Obě dvě formy vznikají z provitamínu (7-dehydrocholesterol a ergosterol) po absorpci UV záření (v rozsahu 295–300 nm) B kruhem sterolového jádra. Dochází k otevření a izomeraci kruhu. Člověk tímto způsobem přeměňuje pouze 5–15 % provitamínu přítomného v kůži. Účinnost konverze závisí na množství přítomného provitamínu, dostatečné přítomnosti UV záření a samozřejmě na prostupnosti vrchních vrstev kůže. Nedostatečná expozice slunečnímu svitu je důsledkem životního stylu člověka (oblečení chrání většinu povrchu těla, pobyt na přímém slunci se zkracuje, použití krémů s ochrannými faktory). Potřebný osvit kolísá také v závislosti na ročním období a vzdálenosti od rovníku [3]. Reakci zabraňuje také přítomnost kožního pigmentu – melaninu, který absorbuje záření v rozsahu mezi 290–700 nm [1].

Cholecalciferol ani ergocalciferol nejsou účinné formy. Aktivní metabolit vzniká postupnou hydroxylací, první probíhá v játrech. 25-Hydroxyláza je přítomna v endoplazmatickém retikulu (nízko afinitní, vysoce kapacitní enzym) a v mitochondriích (vysoce afinitní, nízkokapacitní enzym). Hydroxylací na 25. uhlíku postranního řetězce vzniká metabolit, který se v séru ve vazbě

na DBP (vitamín D vázající protein) vyskytuje v nejvyšších koncentracích oproti ostatním metabolitům (**kalcidiol** – struktura viz Obrázek 4 a Obrázek 5).

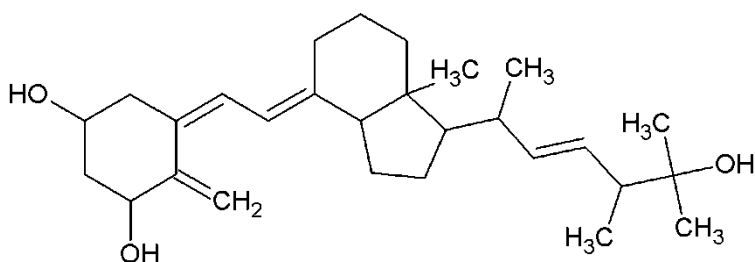


Obrázek 4: Kalcidiol – 25(OH)D₂

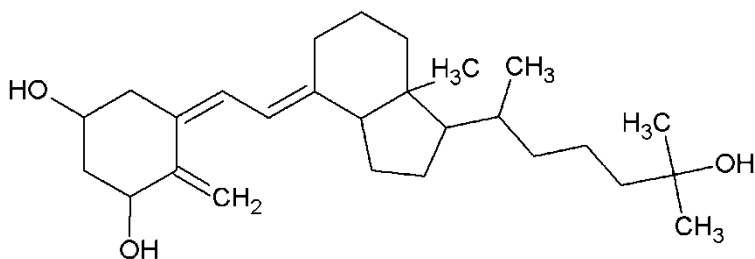


Obrázek 5: Kalcidiol – 25(OH)D₃

Další hydroxylace (C-1) na kruhu A probíhá primárně v mitochondriích ledvin. Vznik aktivního metabolitu (**kalcitriolu** – struktura viz Obrázek 6 a Obrázek 7) je přísně regulován, obrat aktivního metabolitu (hormonu) je velmi rychlý s poločasem 4-6 hodin. Koncentrace kalcitriolu v séru je 1000 krát menší než kalcidiolu. Protože se vyskytuje v koncentracích 10^{-12} mol/l a má velmi rychlý obrat v organismu, není proto vhodným biomarkerem ukazujícím na stav vitamínu D v organismu [3].



Obrázek 6: Kalcitriol – 1,25(OH)₂D₂



Obrázek 7: Kalcitriol – 1,25(OH)₂D₃

Vitamín D je katabolizován dalšími hydroxylacemi (C-24 nebo C-23), tvorbou laktonu případně glukuronidů nebo sulfátů. Jsou vylučovány společnou cestou se žlučovými kyselinami [1].

4.2 Separační metody – využití v klinické praxi a výzkumu

Klinické laboratoře jsou zaměřeny na stanovení, která jsou při péči o pacienta požadována běžně. Výsledky všech stanovení musí být přesné, správné a rychle dostupné. Dalším a někdy i velmi omezujícím požadavkem je celková cena stanovení, kterou ovlivňuje nejenom cena použitých chemikálií a spotřebního materiálu, ale také pořizovací náklady přístroje.

Požadavek na rychlost a dostupnost základních vyšetření je více méně vyřešen automatizací, která v laboratořích v současné době převládá. Plně automatizované systémy téměř eliminují manuální práci se vzorkem. To samozřejmě vede ke zrychlení celého procesu a minimalizaci rizika chyb vzniklých vlivem lidského faktoru.

Základními detekčními principy většiny biochemických stanovení jsou spektrofotometrie, turbidimetrie nebo nefelometrie. Tyto techniky povětšinou nemají specifické požadavky na operátora přístroje. Jednotlivé kity obsahují nejenom potřebné reagentie pro chemickou, enzymatickou nebo imunochemickou reakci, ale také přesný postup měření, které celé i s vyhodnocením provádí analyzátor. Použití enzymů a později i monoklonálních protilátek značně zlepšilo specifitu vyšetření a umožňuje stanovení konkrétního analytu přímo ze směsi.

Separační metody ve většině případů zatím neumožňují automatizovat celé stanovení. Častěji samotnému stanovení předchází příprava vzorku, která přestože zvyšuje specifitu, prodlužuje čas potřebný k získání požadovaného výsledku. Nevýhodou samozřejmě jsou i vyšší pořizovací náklady a požadavky na operátora obzvláště v rámci interpretace výsledků.

Přesto výhody separačních metod v klinické praxi i ve výzkumu jsou nesporné. Separační metody mohou být používány jako preparativní nebo analytické metody. Umožňují eliminovat interference tak, aby mohl být analyt kvantitativně stanoven v komplexní směsi, a oddělit a stanovit několik podobných látek v rámci jednoho měření [4]. Proto mohou poskytovat více informací najednou a v kratším čase tak může být stav pacienta zhodnocen komplexněji. Například aminokyseliny, bílkoviny a nukleotidy se v lidském těle vyskytují jako větší skupiny chemicky podobných látek, jejichž komplexní analýza může poskytnout mnoho informací při prvotním screeningu. Obrovské uplatnění mají separační metody při hledání nových markerů, v toxikologii a jako nástroj kontroly lékových hladin u léků, které mají velmi malé terapeutické rozmezí [5].

4.2.1 Chromatografické metody

Principem chromatografických metod je separace látek na základě kontinuálního ustanovování fázové rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Distribuce látek mezi tyto dvě fáze ovlivňuje pevnost mezimolekulárních vazeb vytvořených mezi analytem a fázemi a dostupnost stacionární fáze, která je z velké části determinována geometrií této fáze. Podle skupenství mobilní fáze rozdělujeme chromatografii na kapalinovou (LC), plynovou (GC) a superkritickou fluidní (SFC) [6].

Molekulární interakce, které vyjadřují relativní afinitu analytu ke stacionární nebo mobilní fázi, vznikají na základě disperzních, polárních a iontových sil.

Změny dipólových momentů jader a elektronů umožňují elektrické interakce s jinými molekulami zvané **disperzní síly**. Molární polarizovatelnost vyjadřuje vlastnost molekuly vytvářet tyto síly. Nejedná se o interakce mezi konkrétně lokalizovaným nábojem vzniklým na molekule, ale o interakce vzniklé na základě stále se měnících polarit blízkých molekul [7].

Polární interakce jsou elektrické síly mezi lokalizovanými náboji vzniklými na molekule na základě dipólu. Musí být doprovázeny disperzními případně iontovými silami. Jedná se o silné interakce, výsledkem mohou být slabé chemické vazby (např. vodíková vazba). Interakce je ovlivněna vzájemnou vzdáleností molekul. Dipólový moment může být v molekule kompenzován, proto polarizovatelnost molekuly nepopisuje přesně stav, kdy vznikne interakce. Interakce mohou vznikat mezi permanentními dipóly nebo mezi dipólem permanentním a indukovaným vzniklým například na aromatickém jádře sloučeniny [7].

Iontové interakce vznikají mezi molekulami, které mají náboj. Tyto interakce jsou doprovázeny také disperzními i polárními interakcemi, ale v iontové výměnné chromatografii jsou iontové interakce převládajícími silami pro retenci analytu na stacionární fázi [7].

Na základě interakcí, které molekula analytu umožňuje vytvářet, je zvolena stacionární fáze. V plynové chromatografii jsou interakce s mobilní fází velmi slabé, proto v podstatě neovlivňuje selektivitu zvoleného systému. Naopak mobilní fáze v kapalinové chromatografii umožňuje volit prostředí s různými vlastnostmi potlačujícími některé interakce a tím ovlivňovat selektivitu.

Změny geometrie stacionární fáze ovlivňují účinnost chromatografického systému, umožňují/znemožňují vznik molekulárních interakcí s analytem.

Základní vliv má **množství stacionární fáze**. Větší obsah stacionární fáze umožní více interakcí, ale mění retenci všech analytů proporcionálně. V plynové chromatografii jsou používány kolony náplňové o vnitřním průměru 2–4 mm a délce 2–3 metry nebo kolony kapilární ($100\text{--}500\mu\text{m} \times 10\text{--}100\text{ m}$), kde stacionární fáze je vrstva pokrývající vnitřní povrch kolony ($0,1\text{--}7\ \mu\text{m}$). U kolon pro kapalinovou chromatografii je množství stacionární fáze popisováno velikostí plochy povrchu [7]. Ta je ovlivněna primárně šířkou a délkou kolony a velikostí použitých částic (částicové kolony) nebo velikostí pórů (monolitní kolony).

Podle **struktury** stacionární fáze jsou uskutečňovány pouze interakce molekul, které odpovídají velikostně nebo tvarově. Retence analytu, ale nemusí být založena výhradně na velikosti molekuly, vazba může být uskutečněna v místě odpovídajícím chirálnímu místu molekuly analytu. Další možností je „vlození trojrozměrného obrazu molekuly analytu do stacionární fáze“ metodou molekulárního imprintingu, vazby pak mohou vznikat po celém povrchu molekuly ve specifické kavitě. Takto modifikovaná stacionární fáze extrémně zvyšuje selektivitu použitého systému [7].

4.2.1.1 Plynová chromatografie (GC)

Podle druhu stacionární fáze (pevná látka nebo kapalina) a s tím souvisejícího způsobu ustanovení rovnováhy látek je plynová chromatografie rozdělovací nebo adsorpční. Po nástřiku vzorku dochází okamžitě ke zplynění a nosný plyn transportuje vzorek přes kolonu, kde probíhá separace, k detektoru. Rychlost dělení analytů na koloně a selektivita procesu je ovlivňována teplotou, častěji je používán teplotní gradient oproti isothermální separaci.

Kolony používané pro separaci v plynové chromatografii jsou náplňové nebo kapilární (otevřené tubulární). Náplň může být přímo stacionární fáze nebo nosič pokrytý vrstvou kapalné stacionární fáze. Povrch stacionární fáze kapilární kolony WCOT (wall-coated open tubular column) odpovídá vnitřnímu povrchu kolony s minimální tloušťkou vrstvy – filmu. Pokud je stacionární fáze tvořena porézní vrstvou, pak je její povrch větší než vnitřní povrch samotné kolony. Stacionární fáze může být pevný absorbent (PLOT, porous-layer open tubular column) nebo kapalina vázaná na povrchu nosiče (SCOT, support coated open tubular column) [8].

Mobilní fází je inertní plyn, který nereaguje s analyty, ani nehraje žádnou roli při zadržování analytu na stacionární fázi (neovlivňuje sorpci a desorpci ani rozdělovací koeficient). Se zvyšováním teploty roste viskozita mobilní fáze. Pokles tlaku v koloně vyvolá expanzi plynu a lineární rychlost mobilní fáze (plynu) se od začátku ke konci kolony zvyšuje [4].

Nejčastěji používané jsou detektory plamenově ionizační (FID), elektronového záchyty (ECD) a tepelně vodivostní (TCD), ale na důležitosti stále více získává hmotnostní detektor (MS). Metody GC-MS slouží jako toxikologické referenční metody při stanovení léků [9, 10] a drog [11, 12] a při monitorování terapeutických hladin léčiv například antiepileptik a antihistaminik [13, 14].

4.2.1.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Zcela zásadní roli pro vývoj kapalinové chromatografie mělo zjištění, že zmenšení částic náplňové kolony vede ke zmenšení výšky teoretického patra (počet teoretických pater kolony je přímo úměrný poměru délky kolony a poloměru částic) a také ke zvýšení účinnosti kolon. Současně dochází i ke zkrácení retenčních časů [15]. V současné době běžně používané částice o velikosti méně než 2 μm vyžadují použití vysokého tlaku pro udržení dostatečného průtoku mobilní fáze. Z toho vyplývají požadavky na použité přístrojové vybavení. Pumpa musí generovat vysoký tlak a bezpulzní, reprodukovatelný průtok. Účinnost separace je ovlivňována kombinací použitých mobilních fází (tzv. gradientová eluce). Na základě změny vlastností mobilní fáze je umožněn vznik nových interakcí s molekulami analytu, v případě, že jsou nové interakce silnější než síly způsobující retenci molekul na stacionární fázi, dochází k vymytí.

Účinnost separace může být popsána výškovým ekvivalentem teoretického patra (HETP), které je významně sníženo při použití menších částic stacionární fáze. Van Deemterova rovnice popisuje vliv vířivé (turbulentní) a axiální difúze v mobilní fázi a odpor proti převodu hmoty v mobilní a ve stacionární fázi na výšku teoretického patra. V praxi se používá zkrácený zápis rovnice závislosti

HETP na lineární rychlosti mobilní fáze (viz Rovnice 1). Použití částic s menším poloměrem má za následek nejenom významné zvyšování účinnosti kolon, ale umožňuje pracovat s vyšším průtokem mobilní fáze bez snížení účinnosti, protože minimum křivky pro malé částice <2 μm je ploché a zasahuje i do oblasti s vyšší lineární rychlostí [16].

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Rovnice 1: Závislosti HETP na lineární rychlosti mobilní fáze

u lineární rychlost mobilní fáze

A, B, C konstanty charakterizující daný chromatografický systém

A odpovídá vlivu vířivé difuze a je přímo úměrná průměru částic

B odpovídá vlivu longitudinální difuze

C odpovídá odporu proti převodu hmoty v mobilní a ve stacionární fázi a je přímo úměrná druhé mocnině průměru částic

Mikročástice o poloměru 1,5–5 μm vytváří v koloně zpětný tlak a pro udržení průtoku musí dojít ke zvýšení tlaku pumpované mobilní fáze. Požadovaná změna tlaku je nepřímo úměrná druhé mocnině průměru částic (viz Rovnice 2).

$$\Delta P \approx \frac{\eta Lu}{d_p^2 d_c^2}$$

Rovnice 2: Zpětný tlak vzniklý v koloně v závislosti na poloměru částic.

η viskozita mobilní fáze

L délka kolony

u lineární rychlost mobilní fáze

d_p průměr částic

d_c průměr kolony

V průběhu vývoje kolon s menšími částicemi (3,0–5,0 μm) byly převážně používány krátké kolony z důvodu vzniku vysokého tlaku v systému, který byl na hranicích možností konvenčních systémů HPLC. Zkrácením kolon, ale často vedlo ke snížení účinnosti, která byla zlepšována gradientovou elucí [16]. Nově vyráběné přístroje (UPLC, UFLC) umožňují využít kolony s částicemi <2 μm za tlaků přesahujících 40 MPa (6 000 PSI) [17].

Kromě částic, které jsou celé tvořené stacionární (porézní vrstvou), byly vyvinuty také částice „povrchově porézní“ (např. technologie PoroShell a FusedCore). Jádrem částice je pevné, analyty vstupují pouze do porézní vrstvy na povrchu částice. S klesající tloušťkou porézní vrstvy se snižuje specifický povrch stacionární fáze, a klesá sorpční kapacita kolony. Poloměr difuze analytu ve

stacionární fáze je proto kratší, což umožňuje zkrácení času analýzy bez snížení účinnosti kolony [18]. V současné době se touto technologií zabývají: Advanced Materials Technology (USA, kolony Halo); Sigma-Aldrich (USA, kolony Ascentis Express) a Phenomenex (USA, kolony Kinetex).

Jiným směrem ve vývoji chromatografických kolon jsou takzvané monolity. Stacionární fáze je tvořena jedním kusem materiálu, který obsahuje mikro- a makro- póry. Jedná se o organické polymery (polymetakryláty, polyakrylamidy) nebo anorganické polymery na bázi silikagelu, uhlíku a zirkonu. Tyto stacionární fáze neobsahují mezičásticové prostory, průtok mobilní fáze je uskutečňován makro-póry [18]. Umožňují použití vysokých průtoků (3–10× vyšších oproti konvenčním částicovým kolonám) bez významného zvýšení zpětného tlaku [16].

Kapalinová chromatografie je v praxi široce používanou metodou. Nízkotlaké iontově výměnné systémy běžně stanovují hladinu glykovaného hemoglobinu, který je zcela zásadním stanovením při kontrole diabetiků, i v malých biochemických laboratořích. Vysokou účinná kapalinová chromatografie obecně vyžaduje snadnější přípravu vzorku oproti GC a je vhodnou metodou pro stanovení látek s větší molekulovou hmotností. Citlivé elektrochemické a fluorescenční detektory, ale v současné době převážně MS detektory umožňují stanovit nízké koncentrace léčiv a jejich metabolitů např. antibiotika [19-21], sedativa [22] steroidy [23-25] a důležité metabolity endogenních látek např. aminokyseliny, žlučové kyseliny a lipidy.

4.2.2 Elektroforetické metody

Elektroforetické metody separují látky na základě různé pohyblivosti nabitých molekul v elektrickém poli. Ve volném roztoku by účinnost separace byla velmi ovlivněna difúzí. Tradičně se využívá stabilizace prostředí pomocí gelů (polyakrylamidových nebo agarósových). Rychlost pohybu iontu závisí na jeho mobilitě, která je ovlivněna velikostí a nábojem molekuly, a na aplikovaném elektrickém poli, které je vyjádřeno jako napětí/cm.

Gelová elektroforéza byla první z používaných separačních technik v klinických laboratořích. Separovala proteiny při diagnostice proteinových malignit [26], nukleové kyseliny [27] nebo enzymy [28].

Přenesení elektroforézy na silikagelový nosič do kapiláry přineslo zlepšení účinnosti, zkrácení času potřebného k separaci, zmenšení objemu potřebného vzorku a hlavně velký potenciál k automatizaci. Elektroosmotický tok, který vzniká v kapiláře, unáší k detektoru také molekuly,

kteřé v elektroforetickém toku mají opačný směr. Velkou výhodou této metody je obrovská separační účinnost, rychlost a nízké provozní náklady. Hlavní využití našla při monitorování lékových hladin a sekvenování DNA. Separace probíhá v několika modech: jako isoelektrická fokusace, isotachoforéza nebo kapilární zónová elektroforéza [4].

4.2.3 Další separační metody

Mezi separační techniky patří metody běžně používané při přípravě vzorku. Oddělení specifické části vzorku na základě jeho fyzikálních nebo chemických vlastností plní funkci předseparace. Jasný trend v přípravě vzorku je automatizace a přímé propojení primární separace s analytickou separací.

4.2.3.1 Precipitace

Uskutečnitelnost separace látek na základě precipitace je založena na rozpustnosti precipitátu vzniklého po reakci precipitačního činidla a konkrétní molekuly nebo podobných látek. Interferující látky přítomné ve vzorku musí být v konkrétních podmínkách plně rozpustné a nevytvářet koprecipitáty.

Pro separaci anorganických látek jsou běžně používány precipitace závislé na pH prostředí, hydroxidy, oxidy a kyseliny některých prvků mají rozdílné rozpustnosti v přítomnosti koncentrované kyseliny dusičné, amonného pufru nebo hydroxidu sodného. Mezi další běžná precipitační činidla patří sulfidy chloridy nebo sulfáty. Další možností je elektrolytická precipitace, při které jsou nejnáze redukovatelné kovy izolovány ze směsi na elektrodě.

Rozpustnost proteinů v roztoku je závislá na pH prostředí, teplotě, přítomnosti solí a na konkrétní struktuře bílkovin. Debye-Hückelova teorie popisuje vliv iontové síly prostředí na rozpustnost proteinů. Molekuly soli obklopují proteiny a snižují elektrostatickou atraktivitu okolních molekul. (se zvyšující se koncentrací soli roste rozpustnost proteinů). Při vysokých koncentracích solí je repulzní efekt nábojů soli a elektrostatické síly molekul proteinů jsou sníženy, až na úroveň kdy nastává precipitace. Proteiny jsou méně rozpustné při pH, které odpovídá jejich isoelektrickému bodu. Místo solí mohou být použity také alkoholické roztoky, které snižují interakce mezi proteiny a rozpouštědlem snížením dielektrické konstanty [4]. Vzniklé precipitáty jsou od směsi odděleny centrifugací nebo filtrací.

4.2.3.2 Filtrace

Při filtraci dochází k separaci na základě velikosti molekul nebo precipitátů. Filtrace může být použita k přečištění roztoků (např. filtrace vzorku před analýzou, filtrace mobilních fází) nebo k oddělení precipitátu, který obsahuje požadovaný analyt.

4.2.3.3 Centrifugace

Principem centrifugace je sedimentace, která je urychlena působením centrifugační síly. Podle materiálu, který je centrifugován, se může jednat o separaci částic od roztoku na základě jejich sedimentačních vlastností. Další možností je oddělení dvou roztoků o různé hustotě. Centrifugace je ovlivňována velikostí, tvarem a hustotou částic, viskozitou média a velikostí centrifugační síly.

Podle způsobu provedení může být **centrifugace** rozdělena na **analytickou** a **preparativní**. Mezi klasické příklady použití preparativní centrifugace patří: odstranění buněčných elementů z plné krve za účelem získání séra nebo plazmy, koncentrace buněčných elementů nebo buněčných organel pro mikroskopické nebo chemické analýzy, odstranění proteinových precipitátů od tekutiny nebo separace ligandů ve vazbě na protein nebo protilátku při imunochemických analýzách. Příkladem může být také urychlení přestupu analytů mezi dvěma fázemi nebo rozdělení lipoproteinových částic podle jejich hustoty.

Diferenciální centrifugace rozdělí částice na základě jejich velikosti a hustoty. Vzorek je rozdělen do několika frakcí postupným zvyšováním relativní centrifugační síly (RCF). V každém centrifugačním kroku vzniká supernatant, který obsahuje nesedimentované části vzorku a peleta obsahující částice určité velikosti a hustoty. Po odebrání supernatantu, který je použit pro další centrifugační krok, je peleta několikrát resuspendována a promyta homogenizačním roztokem a centrifugována za stejných podmínek za jakých byla oddělena od směsi.

Centrifugace v hustotním gradientu může být podle provedení zonální nebo izopyknická. Sedimentace části závisí v tomto provedení nejenom na velikosti, hustotě a tvaru části, ale také na hustotě a viskozitě média. Pro tvorbu gradientu se používají neinteragující nízkomolekulární látky: polyhydrikové alkoholy (sacharóza, glycerol, sorbitol), polysacharidy (Ficol, dextransy), anorganické soli (CsCl, Cs₂SO₄, KBr) nebo jodovaná gradientová média. V případě **zonální gradientové centrifugace** je vzorek nanesen na povrch hustotního gradientu vytvořeného v centrifugační zkumavce. Působením RCF jsou molekuly rozděleny do zón na základě jejich velikosti a tvaru. Hustota všech částic v tomto provedení je mnohem větší než hustota média, a proto při krátké

centrifugami neovlivňuje rozdělení, v případě dostatečné doby působení RCF by došlo k tvorbě pelety na dně centrifugační zkumavky. Při **izopyknické gradientové centrifugaci** dochází k tvorbě gradientu až v průběhu centrifugace. Vzorek je homogenně smíchán s médiem o větší hustotě než jakákoliv částice přítomná ve vzorku. Rozdělení částic závisí pouze na hustotě, která odpovídá v daném místě zkumavky hustotě média. Velikost a tvar částic ovlivňují pouze rychlost dané sedimentace [29].

4.2.3.4 Extrakce

Základními požadavky na extrakční metody je: odstranění matrice vzorku, odstranění podobných molekul jako je stanovovaný analyt a zakoncentrování.

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

Proces extrakce z kapaliny do kapaliny je vyjádřen **distribuční konstantou** (Rovnice 3) daného analytu, která vyjadřuje poměr koncentrací ve dvou nemísitelných fázích (vodná a organická) v ustáleném stavu.

$$K = \frac{(a_A)_{org}}{(a_A)_{aq}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

Rovnice 3: Distribuční konstanta

(a_A) aktivita analytu v organické a vodné fázi

$[A]$ molární koncentrace analytu v organické a vodné fázi

Přechod analytu mezi fázemi závisí na čase a velikosti plochy kontaktu. Může být usnadněn snížením rozpustnosti vzorku v matrici (kapalina číslo 1) případně přidáním komplexotvorného činidla do extrakční kapaliny. Účinnost extrakce může být zvýšena opakovanou extrakcí, kdy dochází k opětovnému ustavení rovnováhy koncentrací. Koncentrace analytu, která stále zůstává i po provedení několika extrakcí ve vodné fázi (Rovnice 4) závisí na distribuční konstantě a na použitém objemu rozpouštědla. Použití více než 6 extrakcí menším objemem minimalizuje ztráty, které vyplývají z rezidua analytu ve vodné fázi [4].

$$[A]_i = \left(\frac{V_{aq}}{V_{org}K + V_{aq}} \right)^i [A]_0$$

Rovnice 4: Výpočet koncentrace analytu ve vodné fázi po i provedení opakované extrakce

$[A]_i$ koncentrace analytu ve vodné fázi po provedení opakované extrakce

V_{aq} , V_{org} objem vzorku (vodná fáze), objem jednotlivých porcí extrakčního rozpouštědla

K distribuční konstanta

$[A]_0$ počáteční koncentrace analytu ve vodné fázi

i počet provedených extrakcí

Velkou limitací LLE je podmínka použití extrakční kapaliny nemísitelné s matricí vzorku. Tím je omezen výběr extrakčních činidel. Zásadní vliv na účinnost extrakce má tvorba emulzí, které vznikají v případě alespoň slabé mísitelnosti kapalin [4].

Extrakce na pevnou fázi (SPE)

Principem této metody je **retence** látek s podobnými chemickými vlastnostmi na sorbentu. Podobné látky/konkrétní analyt jsou v ustáleném stavu distribuovány mezi matricí vzorku a povrch pevné fáze. Distribuční koeficient popisuje rozdělení koncentrací mezi sorbentem a vzorkem. Pokud je distribuční koeficient dostatečně velký (nastává pseudo-equilibrační stav), veškerý analyt je adsorbován na pevné fázi a dochází k retenci. Retenční princip může být použit dvěma způsoby, buď pro zachycení analytu, které je častější, nebo pro zachycení balastních látek obsažených ve vzorku.

V první fázi SPE musí dojít k aktivaci, kondicionaci a equilibraci sorbentu. Molekuly sorbentu jsou v ideálním případě obaleny rozpouštědlem, které umožní interakce s molekulami analytu. Také vlastnosti vzorku musí být před samotnou aplikací na sorbent optimalizovány, aby mohlo dojít ke vzniku vazeb mezi analytem a sorbentem. Nejčastěji se jedná o naředění vzorku, které sníží viskozitu, adjustaci pH pro změnu polaritu funkčních skupin molekul, která zvyšuje afinitu analytu k vazbě na sorbent, nebo přerušování vazeb analytu na proteiny ve vzorku.

Na sorbentu jsou většinou zadrženy kromě konkrétního analytu také látky chemicky velmi podobné. Pro zvýšení selektivity procesu a získání co možná nejčistšího vzorku jsou použity **promývací kroky**, při kterých jsou postupně na sorbent aplikována rozpouštědla se zvyšující se eluční silou. Promývací krok o konkrétní eluční síle, která odpovídá extrahovanému analytu, se nazývá **eluce**. Na rozdíl od LLE může být použito rozpouštědlo mísitelné se vzorkem [30].

Selektivita SPE závisí na použitém sorbentu. Stacionární fáze (sorbent) může být umístěn v kolonce nebo mikrotitračních destičkách. Další možností je použití extrakčních disků. Specifické funkční skupiny modifikovaných stacionárních fází zvyšují selektivitu pro konkrétní analyty. Pro **extrakci na normální fázi** je nejčastěji používán silikagel modifikovaný krátkými uhlovodíkovými řetězci s polárními funkčními skupinami (-OH, -NH₂, CN). Slabé polární vazby (vodíkové vazby, vazba dipól-dipól) vzniklé při retenci polárních analytů jsou rušeny silnějšími polárními rozpouštědly. Pokud je analyt ve vodné matrici může docházet ke slabé retenci na sorbentu, lepší retence se dosahuje při aplikaci analytu na sorbent v organickém rozpouštědle. Pro **extrakci na reverzní fázi** je používán jako sorbent silikagel modifikovaný různě dlouhými uhlovodíkovými řetězci (C₂-C₁₈), cyklohexylovými nebo fenylovými funkčními skupinami. Variantou jsou také styrendivinylné benzenové fáze. Analyt zadržován hydrofobními interakcemi (van der Waals), které ruší silnější nepolární rozpouštědlo. Speciální skupinou je **iontově výměnná extrakce**, kde je sorbent modifikovaný silnějšími polárními skupinami (kvarterní amoniové soli, karboxylové nebo propylsulfonové kyseliny). Retenční vazby jsou elektrostatické interakce [30].

MSPD (matrix-solid phase dispersion) je na rozdíl od klasické SPE metoda vhodná pro extrakci analytů z pevné nebo viskózní matrice. Materiál vzorku je přímo smíchán s částicemi sorbentu, odpadají tak ztráty, které mohou nastat přípravou vzorku před aplikací na sorbent.

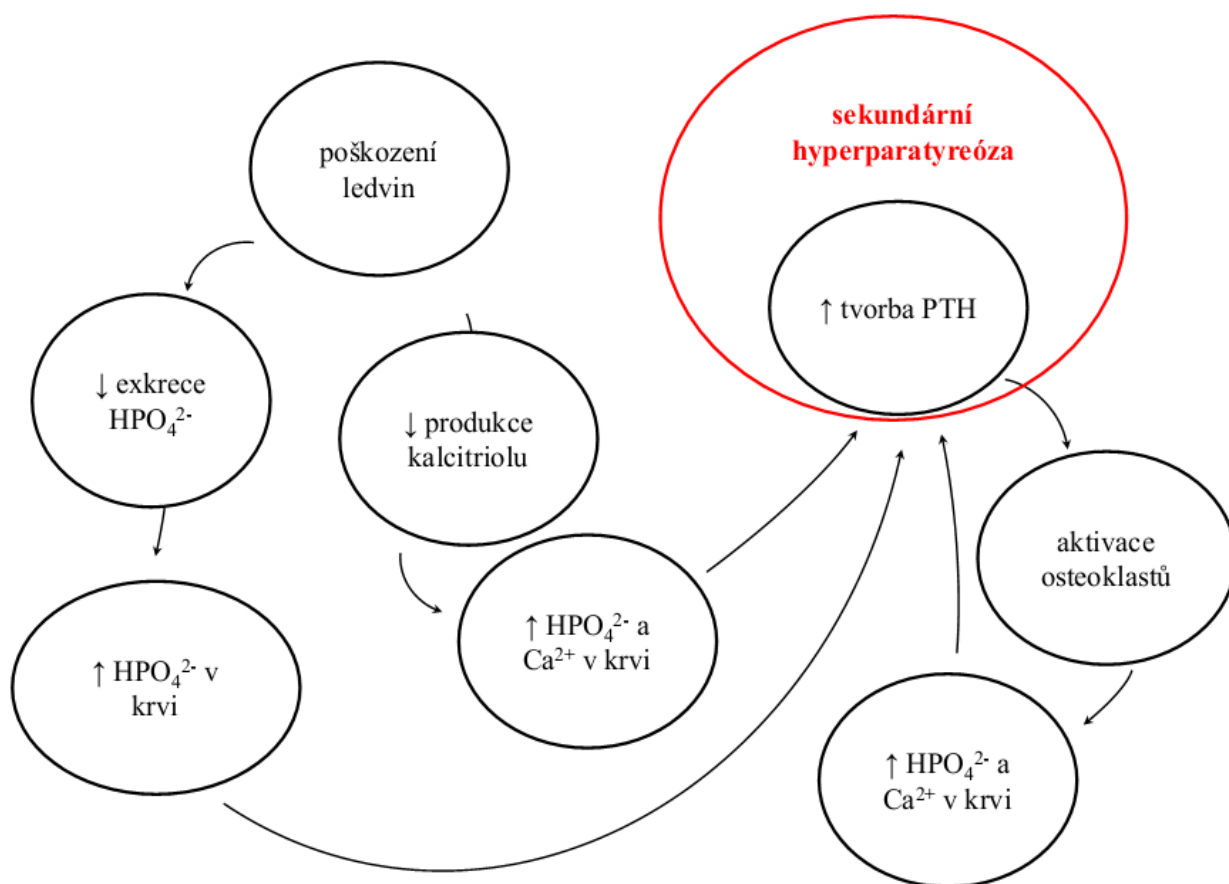
4.3 Stanovení vitamínu D a ostatních liposolubilních vitamínů v lidském séru

Důležitost zavedení metody pro stanovení liposolubilních vitamínů (konkrétně vitamínů D, A a E) vychází z požadavků lékařů různých skupin pacientů. Stanovení těchto vitamínů je důležité jak ve fázi včasné detekce vyvíjející se poruchy/onemocnění, tak při monitorování léčby nebo jako možnost kontroly stavu pacienta.

4.3.1 Klinické zdůvodnění

Pacienti dialyzačního střediska s těžkým poškozením ledvin jsou ohroženi sníženou hydroxylací kalcidiolů (25(OH)D) v poloze 1. Produkce kalcitriolu (1,25(OH)₂D), aktivního metabolitu vitamínu D, je v těchto případech nedostatečná a vede k dalším poruchám.

Kalcitriol spolu s parathormonem reguluje kalciofosfátový metabolismus. Vlivem nedostatku vitamínu D (kalcitriolu) dochází k nedostatečné exkreci Ca²⁺ a HPO₄²⁻ iontů v ledvinách a tím ke zvyšování kalcémie a fosfatémie (sérové koncentrace). Příštítná tělíska reagují na hyperkalcémii a hyperfosfatémii zvýšenou produkcí parathormonu (PTH), který aktivuje osteoklasty a dochází k dalšímu zvyšování hladin kalcia a fosfátů. Hladina parathormonu není deregulována přítomností kalcitriolu a ani antagonické funkce vitamínu D v ledvinách (exkrece Ca²⁺ a HPO₄²⁻ iontů) nejsou dostatečné. V takovémto stavu se rozvíjí vážná sekundární hyperparathyreóza [31] (Obrázek 8).



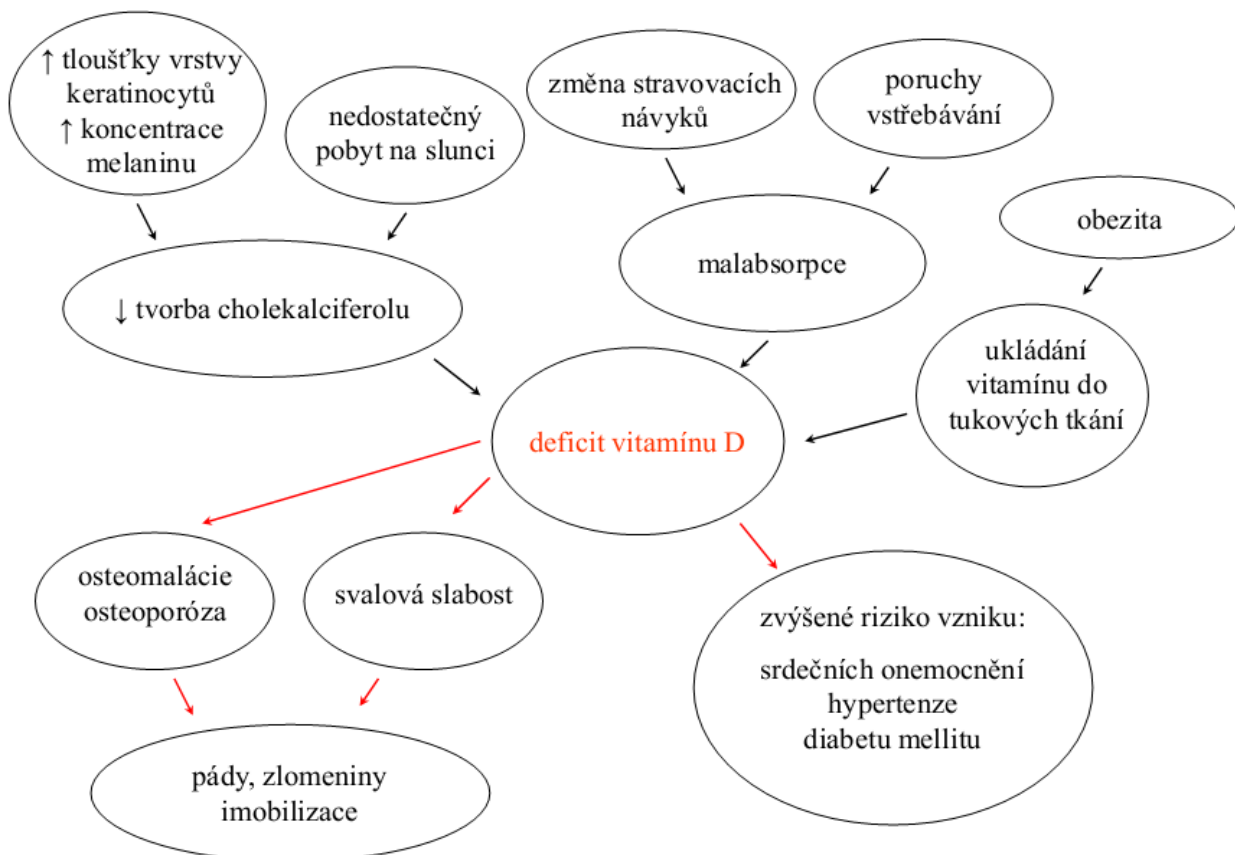
Obrázek 8: Vývoj sekundární hyperparathyreózy v důsledku poškození ledvin (zpracováno podle [31] [32])

Včasná detekce poklesu hladin kalcitriolu u pacientů s onemocněním ledvin (nefrologické ambulance, pacienti v dialyzačním programu) je zcela zásadní pro kontrolu poškození ledvinných funkcí a rozvoje sekundární hyperparathyreózy. V průběhu suplementace takovýchto pacientů je nutná kontrola hladin aktivního metabolitu v organismu, aby nedocházelo naopak k hypoparathyreóze [31].

Další významnou skupinou jsou **pacienti III. Interní gerontometabolické kliniky**. Jedná se převážně o pacienty s metabolickými a nutričními poruchami. Nutriční poruchy některých těchto pacientů jsou ovlivněny věkem pacientů. U dlouhověkých pacientů dochází k významnému snížení produkce vitamínu D z jeho prekurzoru (7-dehydrocholesterol). K reakci, při níž vzniká pre-vitamín D₃, dochází v zárodečné vrstvě epidermis (Malpighická vrstva). Je proto ovlivněna tloušťkou vrstvy odumřelých a zrohovatělých keratinocytů, která v průběhu stárnutí narůstá a stává se tak bariérou pro UV záření o vlnové délce 295 nm, které je pro průběh reakce nepostradatelné [33]. Malabsorpce a obezita jsou dalším významným důvodem pro sníženou biodostupnost vitamínu D [34].

Kalcitriol je jedním z hlavních regulačních hormonů kostního metabolismu, ovlivňuje mineralizaci kostí, svalovou aktivitu i nervové vedení vzruchu regulací hladin vápenatých iontů v séru. Dlouhodobá hypovitaminóza se projevuje osteomalácií až osteoporózou a svalovou slabostí. Následkem jsou časté pády a vážné zlomeniny, které dlouhodobě pacienty dlouhodobě, někdy i trvale imobilizují.

Jasná je vazba mezi hypovitaminózou a některými chronickými a civilizačními chorobami, jako je například chronické srdeční onemocnění [35-37], hypertenze [38, 39] a diabetes mellitus [40, 41]. Přehled vzniku a důsledků deficitu vitamínu D viz Obrázek 9.



Obrázek 9: Vznik a důsledky deficitu vitamínu D (upraveno podle [33-37])

Vitamín A hraje zásadní roli v regulaci diferenciaci epitelálních buněk. Karence tohoto vitamínu způsobená nejčastěji sníženým přísunem karotenoidů v potravě případně zhoršeným vstřebáváním u starších osob způsobuje změny na kůži, mukózních sliznicích, stěnách cév i v rohovce [42]. Snížená integrita a regenerace sliznice respiračního traktu napomáhá k opakovaným infekcím a postupnému vyčerpávání organismu [43, 44]. Vitamín A ovlivňuje také adaptivní imunitu a změny v subpopulacích T- a B-lymfocytů [45, 46].

Změny dietních zvyklostí ve stáří a zvýšená produkce volných radikálů často vedou k hypovitaminóze vitamínu E. Snížená ochrana biologických membrán před oxidačním stresem a následná lipidová peroxidace s řetězovou reakcí ve fázi propagace vedou k oxidativnímu poškození lipidových struktur. Pro starší pacienty je velkým rizikem poškození lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) a s tím spojené snižování stability aterosklerotických plátů ve velkých artériích [3].

Stanovení hladin vitamínu D u **pacientů Onkologické kliniky** je v současné době pouze ve fázi klinických pokusů. Některé studie potvrdily souvislost mezi nízkými hladinami kalcidiolu (25(OH)D) a vyšším rizikem vzniku rakoviny slinivky [47] případně vyšší mortalitou pacientů s rakovinou prsu, tlustého střeva, a plic [48]. Preventivní vliv suplementace ale zatím nebyl jednoznačně potvrzen. Sérová hladina kalcidiolu je považována za možný prediktivní marker vyššího rizika vzniku rakoviny.

4.3.2 Složení matrice

Sérum je matrice velmi komplexní. Jedná se o vodnou složku krve bez krevních elementů, fibrinogenu a srážecích proteinů. Vzniká po odstranění krevní sraženiny. Je z 92 % tvořeno vodou, další procentuelně nejvíce zastoupenou složkou jsou bílkoviny (6-8 %). Ostatní komponenty tvoří méně než jedno procento obsahu matrice – minerály a ionty 0,8 %, tuky 0,6 % a cukry (převážně glukóza) 0,1 % [49]. Stanovované analyty nejsou ve vodné fázi séra přítomny volně, ale jsou transportovány ve vazbě na bílkoviny, jejich koncentrace je oproti ostatním komponentám téměř zanedbatelná.

4.3.2.1 Nestanovované komponenty séra

Hlavní balastní složkou séra jsou plazmatické **proteiny**. Nejvíce zastoupený je albumin, který tvoří 53-66 % všech proteinů. Je to molekula oproti ostatním proteinům relativně malá, váže molekuly vody a udržuje onkotický tlak plazmy, dále slouží jako transportér některých hormonů a vitamínů. α_1 -globuliny (α_1 -fetoprotein, α_1 -antitrypsin) tvoří 3-6 %, α_2 -globuliny (α_2 -fetoprotein, haptoglobulin) 6-12 %, β -globuliny (transferin a ceruloplasmin) 8-17 % γ -globuliny (imunoglobuliny) a 12-20 % bílkovinné složky [49].

Lipidy jsou v séru/plazmě transportovány chylomikrony (transport ze střeva) a ve formě lipoproteinů, jejichž hlavními složkami jsou triacylglyceroly (45 % mastných kyselin), fosfolipidy (35 % MK), cholesterol a jeho estery a volné mastné kyseliny

4.3.2.2 Stanovované analyty – transport, koncentrace

Stanovované analyty se v séru vyskytují ve velmi rozdílných koncentracích. Vitamíny A (retinol) a E (α -tokoferol) lze v séru stanovit v koncentracích $\mu\text{mol/l}$. Problémem jsou ale metabolity vitamínu D, calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) se v krvi vyskytuje v hodnotách pmol/l a calcidiol ($25(\text{OH})\text{D}$) v nmol/l .

Vitamín E je z potravy absorbován v tenkém střevě pasivní difúzí závislou na micelární solubilizaci. Vstřebávání je proto ovlivněno přítomností lipidů, pankreatických esteráz a žlučových kyselin, které dohromady vytváří vstřebatelné micely. Micely jsou v enterocytech rozloženy a uvolněné triglyceridy, fosfolipidy a cholesterol formují chylomikra, ve kterých vstupují tokoferoly a tokotrienoly do lymfatické cirkulace. První hydrolýza lipoproteinovou lipázou přenáší část tokoferolů přímo do některých tkání (tuková tkáň, svaly a mozek), většina ale zůstává v chylomikronových remnantech a je dále transportována do jater, kde transportní protein pro α -tokoferol (α -TTP) umožní redistribuci vitamínu do nově formovaných lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Ostatní třídy lipoproteinů jsou postupně obohacovány nejenom v důsledku hydrolýzy částic, ale také aktivním transportem mezi jednotlivými třídami [50]. α -TTP je protein rozpoznávající molekulu RRR- α -stereoizomeru, je zodpovědný za biopotenci α -vitameru [1].

Vitamín A je v potravě přítomen ve formě esterů retinolu a karotenoidů (provitamín A), které jsou ve střevě solubilizovány do micel. Po hydrolýze volný retinol a β -karoten přechází do enterocytu difúzí pomocí specifického přenašeče. Cytosolové enzymy zajišťují biokonverzi β -karotenu na retinal [51] a jeho následnou redukci na retinol, který je dále rychle reesterifikován na palmitát nebo stearát. Estery retinolu jsou transportovány chylomikry a jejich remnanty do jater, kde jsou receptorem zprostředkovanou endocytózou přeneseny do parenchymatických buněk. Estery jsou zde hydrolyzovány a přeneseny do stelátových buněk, kde jsou opět reesterifikovány a skladovány (90 % zásob).

Transport vitamínu A je uskutečňován specifickými proteiny, které mají terciární strukturu lipokalinů. Retinol je po mobilizaci z jater transportován do periferních tkání ve vazbě na specifický plazmatický protein (RBP). Molekula retinolu je obklopena doménou proteinu tvořené strukturou β -skládaného listu a stabilizována vodíkovými můstky, tato struktura chrání molekulu vitamínu před oxidací. Retinol vstupuje do buněk po vazbě RBP na specifický receptor [1, 2].

Vitamín D se v potravě vyskytuje ve velmi malém množství. Ve formě ergocalciferolu (vitamín D_2) je přítomen v některých mikroorganismech, houbách a rostlinách. Naopak cholecalciferol (vitamín D_3) je produkt živočišný, nejčastěji je přijímán v potravě bohaté na mořské ryby a

v mléčných výrobcích. Některé potraviny jsou tímto vitamínem obohacovány. Z potravy je absorbován v tenkém a tlustém střevě pasivní difúzí závislou na micelární solubilizaci v chylomikrech. Vitamín se vyskytuje na povrchu lipoproteinové částice a tím je umožněna vazba na vitamín D-vázající protein (DBP) přímo v průběhu degradace chylomiker v plazmě [2].

Ve vazbě na DBP vstupuje do cirkulace (je mobilizován) také cholekalciferol tvořený v kůži. Jako jediný liposolubilní vitamín není skladován v játrech. Pravděpodobně malá část je skladována v hydrofobních kompartmentech různých tkání (tuková tkáň). Přibližně 85% kalcidiolu je vázáno na DBP a 15% na albumin [52]. Koncentrace DBP v plazmě je mnohonásobně větší než koncentrace cholekalciferolu, ergokalciferolu, kalcidiolů a kalcitriolů, vazba je uskutečňována přes *cis*-trienovou strukturu. Váže kalcidiol s desetinásobně vyšší afinitou než kalcitriol [1]. Mechanismus a regulace mobilizace vitamínu z tukových zásob a jeho vstup zpět do cirkulace není dosud dostatečně objasněna [53].

4.3.3 Možnosti stanovení

4.3.3.1 Příprava vzorku

Před samotnou extrakcí musí být stanovované vitamíny uvolněny z proteinových nosičů (α -TTP, RBP a DBP), které umožňují transport lipofilních látek ve vodném prostředí. Tyto proteiny bývají často asociovány v lipoproteidech (vitamín D a E) případně v micelách (vitamín A).

Po deproteinaci séra mohou být uvolněné analyty přímo analyzovány, pokud to metoda stanovení umožňuje. Častěji ale před samotné stanovení musí být zařazeno přečištění vzorku od interferujících složek, nejčastěji je využívána extrakce nebo centrifugace. Dalším krokem bývá často zakoncentrování stanovovaných složek.

Deproteinace vzorku může být provedena fyzikálními (teplota) nebo chemickými (organická rozpouštědla, kyseliny, anorganické soli) vlivy. Použití zvýšené teploty je omezeno skutečností, že může dojít k degradaci stanovovaných vitamínů. Další možností je enzymatická degradace proteinů, která je velmi jemnou technikou. Nevýhodou je složitější příprava reakční směsi a samozřejmě vyšší cena. Precipitací sérových proteinů dochází ke změně konformace a uvolnění vazeb. Nejčastěji používaný je ethanol [54-58] nebo acetonitril [59].

Dalším krokem přípravy vzorku po deproteinaci je uvolnění analytů z vazeb proteinů a odstranění interferujících složek matrice, nejčastěji se jedná o extrakci. Nejčastěji je používána **extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)**. Vitamín A je z deproteinovaného séra extrahován nejčastěji hexanem [58, 59] stejně jako vitamín E [55]. Oba dva tyto vitamíny bývají často stanovovány společně s karotenoidy, v tomto případě bývají postupy přípravy vzorku složitější. Jako extrakční činidlo bývá opět používán hexan [60], častěji petroleum ether [56, 61] nebo směsi rozpouštědel například butanol-ethyl acetát [57]. Pro extrakci vitamínu D bývá používán acetonitril [62] nebo diethylether [54]. **Extrakce na pevnou fázi (SPE)** je také možná a umožňuje zvolit lépe selektivitu pro konkrétní analyty. Příkladem může být extrakce 8 liposolubilních vitamínů ze séra s výtěžností 95-97 % [63].

4.3.3.2 Separace vitamínů, detekce

Liposolubilní vitamíny jsou nejčastěji separovány chromatograficky na reverzní fázi. Nejčastější detekce retinolu a α -tokoferolu bývá spektrofotometrická [58, 60, 61], α -tokoferol v případě, že je potřeba vyšší citlivost může být stanoven fluorimetricky [64]. Tokoferoly mohou být detekovány také elektrochemicky po předchozí chromatografické separaci [65]. Vitamín D je nejčastěji stanovován jako suma hydroxy metabolitů vitamínu D₂ a D₃. Důvodem je antigenní nespecifita používaných protilátek. Chromatografická separace umožňuje spektrofotometrickou detekci hydroxy-vitamerů [66-68]. Vzhledem k velmi nízkým koncentracím stanovovaného metabolitu v séru je vhodná hmotnostní detekce [69-74].

4.3.3.3 Moderní přístupy – miniaturizace, automatizace

Mata-Granados publikoval metodu automatického systému extrakce na pevnou fázi uzpůsobeného k přečištění a zkoncentrování vzorku s on-line propojením na HPLC systémem [75]. Tato 20 minutová metoda umožňuje extrémně rychlý průchod vzorku laboratoří zároveň s výbornou opakovatelností a reprodukovatelností celého procesu.

V roce 2010 byla publikována práce, ve které byla použita on-line SPE-LC-MS/MS metoda pro detekci hladin vitamínu D (konkrétně se jednalo o oba metabolity – 25(OH)D i 1,25(OH)₂D) u kriticky nemocných pacientů na jednotce intenzivní péče v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dárců [76].

4.3.3.4 Metody používané v praxi pro stanovení vitamínu D

První používanou metodou pro stanovení vitamínu D byla kompetitivní vazba na protein CPBA (competitive protein binding assay). Tato metoda byla publikována v roce 1971. Využívala vazbu analytu na DBP a kompetici o vazebné místo s ^3H -25-(OH) D_3 značeným vitamínem [77]. Stanovení vyžadovalo extrakci organickým rozpouštědlem, odpaření extraktu a přečištění vzorku kolonovou chromatografií. Snahy o zjednodušení přípravy vzorku, konkrétně se jednalo o překonání nutného přečištění vzorku, nebyly úspěšné. Navrhovaná radioimunoanalýza (RIA) se značenými protilátkami proti vitamínu D sice vykazovala nižší falešnou pozitivitu způsobenou nespecifickou reakcí lipidů matrice a DBP, ale přesto neřešila problém zkřížené reaktivity s ostatními metabolity vitamínu D [78]. Podobných výsledků dosáhla metoda enzymatická (EIA) pro 25-hydroxyvitamín D_3 , samotnému stanovení opět předcházela extrakce acetonitrilem [79]. V roce 1997 byla publikována metoda, která kombinuje výhody imunoextrakce na pevné fázi a následné stanovení RIA metodou pro 1,25-hydroxyvitamín D_3 [80]. Přestože metoda zahrnuje specifickou extrakci metabolitu z matrice (plazma) a zkřížená reaktivita ostatních metabolitů je menší než 1 %, pro 1,25-hydroxyvitamín D_2 je 79 %. Přesto jsou principy těchto metod základem pro první komerčně vyráběné sety s certifikátem FDA pro klinické testování (Nichols Advantage - CPBA a DiaSorin corporation – RIA) [81].

Dalším krokem ve vývoji vhodné metody stanovení vitamínu D bylo využití HPLC s UV detekcí [66-68]. Vzorky pro chromatografické metody jsou převážně připravovány extrakcí na pevnou fázi [82]. Postupně byly metody přípravy vzorku zlepšovány [83] až k výsledné plně automatické metodě [75]. Chromatografie jako separační metoda umožňuje stanovení obou základních metabolitů (25-hydroxy D_2 i D_3) během jednoho měření. Od roku 1991 bylo publikováno mnoho metod spojujících výhody kapalinové chromatografie jako separační metody s citlivostí a specifitou MS detekce [70-74, 82, 84]. LC-MS/MS stanovení je považováno za standard, ke kterému jsou výsledky ostatních dostupných metod vztahovány.

Situace v ČR - dostupnost vyšetření

V České republice jsou pro rutinní stanovení dostupné metody pěti firem (DiaSorin, Abbot Diagnostics, Roche, Siemens a Immunodiagnosics). Všechny firmy nabízí metody imunochemie nebo imuno elektro-luminiscenční v provedení na automatických analyzátoch. DiaSorin a Immunodiagnosics nabízí také starší manuální radioizotopové metody. Kromě těchto imunologických metod jsou dostupné chromatografické kity od různých firem.

Perkin Elmer nabízí **MSMS vitamin D kit**, který stanovuje 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃ metabolity a vyhodnocuje také jejich sumu. Kit obsahuje vnitřní standard, kontroly a kalibrátory v sérové matrici [85].

Firma **Recipe** nabízí **HPLC Complete Kit** a **ClinRep® UPLC® Complete Kit**. Stanovení metabolitů 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃ probíhá za izokratického režimu s UV detekcí při 264 nm. Stanovení zahrnuje krátkou přípravu vzorku (deproteinaci) a chromatografickou separaci (HPLC – 10 minut, UPLC-2 minuty). Tato firma také nabízí **ClinMass® Complete Kit**. Po deproteinaci vzorku probíhá on-line SPE přímo v chromatografickém systému. Separace trvá 3 minuty a MS detekcí je kromě obou 25(OH)D vitamérů stanovován také epimer 3-epi-25(OH)D₃. Všechny dodávané kalibrátory mají návaznost na certifikovaný referenční materiál SRM 972 [86].

Kity pro HPLC separaci na normální i reverzní stacionární fázi, s UV i MS detekcí nabízí firma **Immundiagnostik**. Separace na normální fázi (**25-OH Vitamin D₃ HPLC Kit** a **25-OH Vitamin D₃/D₂ HPLC Kit**) trvá 20 minut, na reverzní stacionární fázi (**25-OH Vitamin D₃/D₂ RP-HPLC Kit**) 12 minut. Vzorky jsou před separací deproteinovány a extrahovány LLE. Analyty jsou detekovány při 264 nm. Dále je dostupný kit **25-OH Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS**. V tomto případě jsou možné 3 postupy přípravy vzorku, deproteinace s LLE, extrakce na Oasis HLB kolonkách případně na Oasis HLB 96-well-μElution-plate. Gradientová eluce trvá 3,5 minuty a analyty jsou detekovány MS/MS MRM přechody, metoda obsahuje deuteriovaný interní standard. Všechny dříve zmiňované sady obsahují pouze jedno hladinový kalibrátor, který nemá návaznost na NIST standard. Tato firma poskytuje také **1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmunoTube® LC-MS/MS Kit**. Kalibrátor tohoto kitu je dvoubodový. Toto stanovení vyžaduje použití speciálního extrakčního kitu, separace probíhá opět jako gradientová eluce během 3,5 minut, detekce je MS/MS [87].

Komerční sady firmy **Chromsystems** nabízí stanovení vitamérů 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃ s UV detekcí v provedení s SPE úpravou vzorku. Separace trvá v isokratickém režimu 12 minut (**25-OH-Vitamin D₃/D₂ in serum/plasma – HPLC**). Další možností je kit s on-line úpravou vzorku (**25-OH-Vitamin D₃/D₂ in serum/plasma (online method) – HPLC**). Separace trvá 10 minut a analyty jsou stanoveny UV detektorem. Nejnovějším kitem je **MassChrom® 25-OH-Vitamin D₃/D₂ in serum/plasma - LC-MS/MS**. Analýza trvá 5 minut, v případě stanovení také 3-epi-25(OH)D₂ i 3-epi-25(OH)D₂ 8,5 až 10 minut [88].

DiaSorin nabízí metodu (**25-hydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA Kit**) pro ruční zpracování vzorku. Po extrakci acetonitrem je vzorek inkubován 90 minut s jódem značeným 25-hydroxyvitamínem D a

specifickou protilátkou. Během další inkubace (20 minut) dochází ke kompetici vzniklých imunokomplexů o vazbu na druhou protilátku. Reakční směs je centrifugována pro odstranění nespecifických vazeb přerušených přidaným pufrem. Signál vyhodnocen gama čítačem. Zkřížená reaktivita 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃ je 100 %, pro 1,25(OH)₂D₂ a 1,25(OH)₂D₃ 11 % [89].

Tato firma nabízí také plně automatickou metodou pro použití na imunoanalytickém analyzátoru Liaison (**25(OH)D TOTAL CLIA Assay**). Jedná se o **kompetitivní chemiluminiscenční imunometodu**. Vitamín D je disociován z DBP během inkubace (10 minut) s pufrem obsahujícím 10 % ethanol. Uvolněný analyt je navázán na protilátky přítomné na magnetických částicích. V průběhu druhé inkubace (10 minut) dochází k navázání 25(OH)D konjugovaným s derivátem isoluminolu na volná vazebná místa magnetických částic. Nenavázané antigeny jsou ze směsi odstaněny a startovací reagentie generuje chemiluminiscenční signál. Zkřížená reaktivita 25(OH)D₂ je 104 %, 25(OH)D₃ 100 %, pro 1,25(OH)₂D₂ 40 % a 1,25(OH)₂D₃ 17 %. U obou metod je stanovována suma obou hydroxy vitamerů. [89].

Abbot Diagnostics má patentovanou **chemiluminiscenční imunometodu na mikročásticích (CMIA)** pro imunochemický analyzátor Architect. Je stanovována suma vitamínů 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃. K naředěnému séru se přidají paramagnetické mikročástice potažené protilátkami proti 25(OH)D. Vitamery přítomné ve vzorku se naváží na mikročástice. Po reakci je do směsi přidán biotinylovaný 25(OH)D a protilátka proti biotinu značená akridinem. Komplex biotinylovaného vitamínu s protilátkou značenou akridinem se naváže na neobsazená vazebná místa na mikročásticích. Po promytí přístroj zaznamená relativní světelné jednotky (RLU) chemiluminiscenční reakce, signál je nepřímo úměrný množství vitamínu ve vzorku. Zkřížená reaktivita 25(OH)D₂ je 82 % pro 25(OH)D₃ 105%, pro 24,25-(OH)₂D₃ je 112 % a pro C3-epimer 25-(OH)D₃ 2,7 %. Kalcitriol (1,25-(OH)₂D₃) vykazuje zkříženou reaktivitu 12,6 %.

Firma **Roche** (analyzátor Cobas, Modular) používá ke stanovení vitamínu D **kompetitivní elektrochemiluminiscenční imunostanovení (ECLIA)**. Při první inkubaci je vitamín uvolněn z proteinového nosiče, aby mohl být navázán na protein značený rutheniem. V dalším kroku jsou přidány mikročástice pokryté streptavidinem a vitamín D značený biotinem. Dojde k obsazení volných rutheniem značených vitamín D vázicích proteinů interakcí biotinu a streptavidinu. Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročástice zachyceny na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny a přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Metoda je standardizována na LC-MS/MS metodu

navázanou na NIST standard [70]. Zkřížená reaktivita pro 24,25-dihydroxyvitamin D₃ je 149 % a pro C3-epimer 25-hydroxyvitamínu D₃ 91 % [90].

Firma **Siemens** (analyzátoři Advia) používá ke stanovení 25(OH)D **kompetitivní chemiluminiscenční imunostanovení (CLIA) na paramagnetických částicích**. Vzorek je 4,5 minuty inkubován s reagecií, která uvolní vitamín D z vazeb na bílkoviny. Další inkubace (5,5 minuty) vzorku je s myší monoklonální protilátkou značenou akridinium esterem. Tato protilátka je specifická pro oba vitamery (25(OH)D₂ i 25(OH)D₃), zkřížená reaktivita je 106 % a 97 %, pro 1,25(OH)₂D₂ 4%, pro 1,25(OH)₂D₃ 1%. C3-epimer 25(OH)D₃ má zkříženou reaktivitu 1 %. Paramagnetické částice mají na povrchu kovalentně vázanou myší monoklonální protilátku proti fluoresceinu. Kyselé a zásadité reagenty přidané do směsi zahájí chemiluminiscenční reakce. V dalším kroku je do reakční směsi přidána pevná fáze (paramagnetické částice potažené monoklonální myší protilátkou proti fluoresceinu) a analog vitamínu D konjugovaný s fluoresceinem. Po další inkubaci jsou paramagnetické částice odděleny od nenavázané reagenty promývacím roztokem a přidané kyselé a zásadité reagenty zahájí chemiluminiscenční reakci [91].

Immunodiagnosics (analyzátor IDS-iSYS) nabízí metodu **chemiluminiscenčního imunostanovení (CLIA)**, se specifitou k oběma 25(OH)D vitamérům. Standardizace této metody byla ověřena korelací s LC-MS/MS metodou [92]. Tato firma nabízí také na stejném analyzátoru stanovení 1,25(OH)₂D, pro úpravou vzorku jsou používána „imunokapsulace“ [93].

Tabulka 3 shrnuje dostupnost stanovení vitamínu D a používané metody ve fakultních nemocnicích. Z jedenácti fakultních nemocnic je vyšetření dostupné v osmi, ale pouze ve dvou jsou výsledky vydávány denně.

Fakultní nemocnice	vyšetření	odezva	metoda	firma
Brno	D total	2x týdně	ECLIA	Roche
Hradec Králové	25-OH D	4 týdny		
Královské Vinohrady	?	?	?	?
Na Bulovce	-	-	-	-
Olomouc	25-OH D	2 týdny		
Ostrava	25-OH D	do týdne	imunoanalytická metoda	
Plzeň	-	-	-	-
U sv. Anny v Brně	25-OH D ₂ a D ₃	1 týden		
Motol	25-OH D	denně		
Thomayerova nemocnice	25-OH D ₃	do týdne	LIA	
VFN v Praze	25-OH D	denně	ECLIA	Roche

Tabulka 3: Dostupnost vyšetření koncentrace vitamínu D v séru ve fakultních nemocnicích (informace byly získány z laboratorních příruček dostupných na internetových stránkách jednotlivých fakultních nemocnic v lednu 2013)

Problémy používaných stanovení

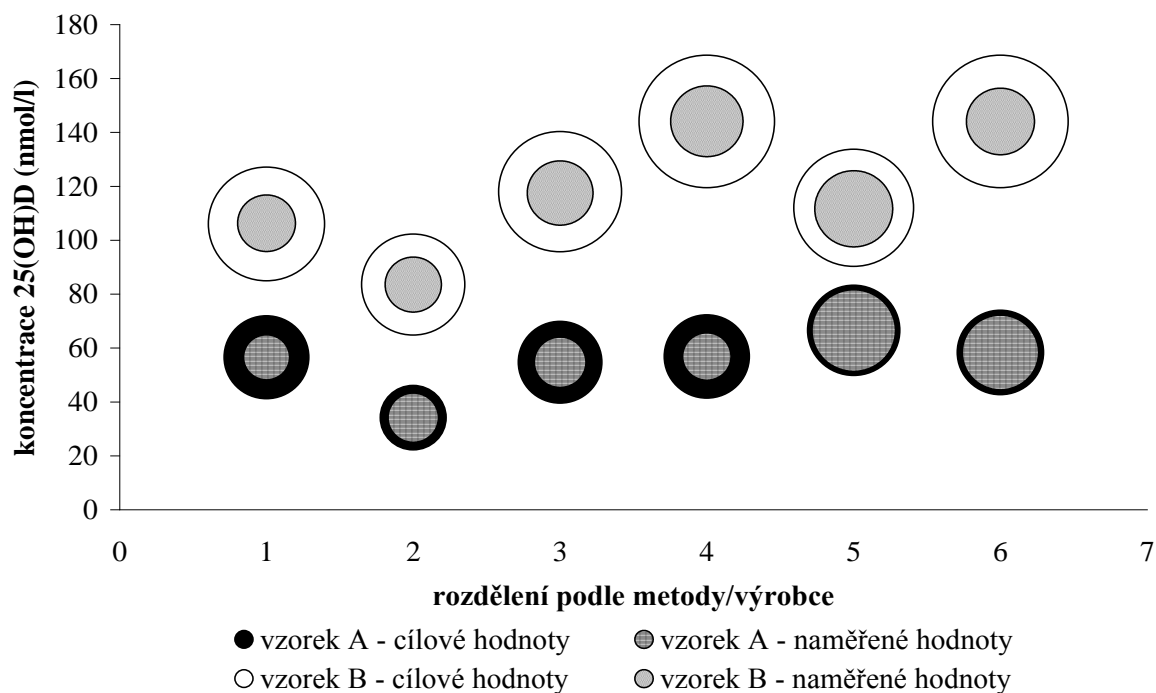
Obecným problémem stanovení vitamínu D nejsou pouze nedostatky jednotlivých metod týkající se přípravy vzorku, ale i otázka kalibračních a referenčních materiálů. V červenci 2009 byl uveden na trh certifikovaný referenční materiál (SRM 972), který je produkován National Institute of Standards and Technology (NIST) v USA. NIST poskytuje také kalibrátory (SRM 2972), které by měli zlepšit návaznost používaných metod. Jedná se o ethanolické roztoky 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂ na dvou koncentračních hladinách. Návaznost imunochemických metod, přesto není dostatečná. Komutabilita všech 4 hladin SRM 972 nebyla splněna [94]. Pro některá imunostanovení byla část kalibrátorů vyráběna například fortifikací koňského séra standardy. Také nedostatečné uvolnění analytu z DBP, zkřížená reaktivita metabolitů a matricové efekty mají za následek významný bias jednotlivých metod. Klinicky proto nelze hodnotit výsledky pacientů bez znalosti metody stanovení [95, 96]. V roce 2013 NIST uvedl nový certifikovaný referenční materiál (SRM 972a) plně komutabilní na všech 4 hladinách (fortifikována je pouze čtvrtá hladina epimerem 3-epi-25(OH)D₃). Koncentrace 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂ byly stanoveny na základě výsledků izotopové diluční metody LCMS/MS [97], která je referenční metodou pro stanovení vitamínu D.

Návaznost metod na certifikovaný referenční materiál (CRM) a jejich porovnatelnost umožňující klinické hodnocení stavu pacienta je v laboratořích ověřována postupy externího hodnocení kvality (EHK). Zdravotnická laboratoř, která je akreditovaná podle mezinárodně platné normy ČSN^oEN ISO15189 ("Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost"), musí být zapojeno do systému EHK. V Evropské unii je akreditace zdravotnických laboratoří upravena Nařízením č. 765/2008 na základě prohlášení IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). Akreditaci laboratořím udělují akreditační orgány EA (European Cooperation for Accreditation) nebo ILAC (International Laboratory Accreditation Co-operation). V České republice tuto funkci zastává Český institut pro akreditaci (ČIA).

V České republice poskytuje vzorky pro EHK společnost SEKK. Nezávislými evropskými poskytovateli External Quality Assessment (EQA) jsou např. Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.v. (Německo), Labquality Oy (Fínko) nebo United Kingdom National External Quality Assessment Service (Velká Británie).

Mezi největší mezinárodní poskytovatele vzorků EHK pro vitamín D patří Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS), který v roce 2013 zahrnuje 1200 účastníků z 54 zemí. V České republice je dostupný materiál společnosti SEKK – cyklus „Kostní markery“.

V roce 2012 se systému externí kontroly kvality (SEKK) prvního cyklu kostní markery (analyt 25(OH)D) v České a Slovenské republice zúčastnilo 71 laboratoří s relativní úspěšností 85%, kdy přijatelný rozdíl v % od vztažné hodnoty je 33%. Jednotliví účastníci jsou pro hodnocení rozděleni do 6 skupin podle použité metody a výrobce (viz Obrázek 10).



Obrázek 10: SEKK 1/12 – kostní markery: porovnání cílových hodnot s maximální přípustnou odchylkou 33% a naměřených hodnot (robustní průměr, směrodatná odchylka) v jednotlivých skupinách. Upraveno podle www.sekk.cz.

- 1) Imunochemická metoda (Abbot) – 13 účastníků
- 2) Imunochemická metoda (Roche) – 36 účastníků
- 3) Imunochemická metoda (DiaSorin) – 6 účastníků
- 4) Imunochemická metoda (Siemens) – 6 účastníků

- 5) Imunochemická metoda (Immunodiagnostic systém) – 4 účastníci
- 6) skupina ostatní – 6 účastníků

Cílové hodnoty pro imunochemickou metodu firmy Roche jsou významně nižší oproti ostatním očekávaným hodnotám a to v obou vzorcích. Oproti průměrné cílové hodnotě všech skupin je o 37 % a 29 % nižší. Naopak cílové hodnoty vzorku B pro skupinu firmy Siemens jsou o 22 % vyšší, stejně tak pro vzorek B skupiny ostatní a vzorek A skupiny Immunodiagnostic. Vývoj variačních koeficientů a počet účastníků jednotlivých skupin v průběhu let 2011 a 2012 (celkem 4 cykly) viz Tabulka 4. Metody firmy Abbot a DiaSorin vykazují nejnižší variační koeficient výsledků mezi účastníky. Metoda firmy Siemens zaznamenala v posledních třech cyklech významné zlepšení variačního koeficientu mezi účastníky.

výrobce metody	vzorek	cyklus 1/11		cyklus 2/11		cyklus 1/12		cyklus 2/12	
		N	CV	N	CV	N	CV	N	CV
Abbot	A		3,16		13,0		9,71		4,21
	B	5	10,9	9	11,2	13	8,11	15	9,18
Roche	A		30,0		17,9		19,3		6,01
	B	33	20,9	32	15,0	36	9,76	38	16,5
DiaSorin	A		17,6		14,7		12,6		9,69
	B	4	11,6	6	8,70	6	9,46	6	11,5
Siemens	A		35,0		6,54		10,6		15,5
	B	3	37,3	6	8,34	4	9,36	8	12,3
Immunodiagnostic system	A		20,6		44,2		26,9		10,4
	B	6	15,6	4	17,5	4	14,1	3	22,9
ostatní	A		41,7		34,5		25,9		39,8
	B	5	21,6	4	29,0	6	8,24	5	34,9

Tabulka 4: Porovnání počtu účastníků a variačních koeficientů jednotlivých skupin v rámci SEKK cyklus kostní markery v průběhu let 2011 a 2012. Upraveno podle www.sekk.cz.

N - počet účastníků

CV – variační koeficient naměřených hodnot vzorku (%)

4.3.3.5 Doporučení pro diagnostiku deficitu vitamínu D

Endokrinologická společnost (The Endocrine Society) – největší světová endokrinologická společnost – vydala roku 2011 doporučení týkající se léčby a prevence deficitu vitamínu D [98]:

Diagnostika je doporučena pouze u osob, které mají zvýšené riziko vzniku deficitu vitamínu D:

- pacienti s osteoporózou, osteomalácií nebo křivicí
- pacienti s chronickým onemocněním ledvin
- pacienti při jaterním selhání
- pacienti s malabsorpčními syndromy (např. Cystická fibróza, Crohnova choroba)
- pacienti s hyperparathyreózou
- pacienti s granulomatózními chorobami (např. Sarkoidóza, TBC, Histoplazmóza)
- při dlouhodobě užívaných lécích (antikonvulziva, glukokortikoidy, léčba AIDS)
- afroameričané a hispánci
- těhotné a kojící ženy
- senioři s anamnézou opakovaných pádů a netraumatických zlomenin
- obézní děti a dospělí (BMI nad 30 kg/m²)

V současné době nejsou dostatečné klinické důkazy, které by zdůvodňovaly vyšetřování stavu vitamínu D u populace, která nemá zvýšené riziko vzniku deficitu. Stejně tak přínos preventivního podávání vitamínu D při kardiovaskulárním onemocnění doposud nebyl prokázán [98].

Pro diagnostiku je doporučeno vyšetření hladin cirkulujícího 25-hydroxyvitamínu D. Stanovení 1,25-dihydroxyvitamínu D není pro diagnostiku deficitu doporučováno. Toto stanovení je doporučeno pouze pro kontrolu stavu vitamín D-fosfátového metabolismu. IOM (Institute of Medicine) rozděluje deficitní stavy na základě koncentrace 25(OH)D na deficit (<50 nmol/l) a nedostatek (52,5-72,5 nmol/l).

4.4 Stanovení retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce

4.4.1 Klinické zdůvodnění

Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje plné kojení prvních šest měsíců života dítěte. Mateřské mléko je tomto období jediným zdrojem tekutin, výživy, minerálů a vitamínů. Koncentrace složek je ovlivněna zdravotním stavem matky, ale hlavně potřebami dítěte. Zvláště u předčasně narozených dětí je zcela zásadní dostatečný přísun některých liposolubních vitamínů, které ovlivňují růst a vývoj [99].

Oxidativní stres je u předčasně narozených dětí velkým ohrožením [100, 101] a mateřské mléko poskytuje nezanedbatelnou ochranu tkání [102]. Produkce volných radikálů v prvních fázích lidského života velmi často vede ke vzniku propagační fáze oxidačního stresu [103]. Pre-eklampsie, nízká porodní váha nebo asfyxie mají za následek nižší aktivitu antioxidačních obranných mechanismů. Proto je zvýšená produkce volných radikálů a následný rozvoj oxidačního stresu velkým problémem [43]. Významně bývají poškozeny plicní alveoly a rozvíjí se chronická plicní choroba [104]. Lipoperoxidace poškozuje membrány buněk a často dochází k buněčné smrti. Souvislost mezi deficiencí α -tokoferolu a zvýšeným rizikem následků oxidačního stresu je dobře zdokumentována [105, 106]. Úkolem moderní neonatologie je podpořit vývoj antioxidačního systému na základě optimální nutriční strategie, dostatečný přísun α -tokoferolu v mateřském mléce je významným obranným mechanismem pro vznik dalších volných radikálů.

Přítomnost retinolu je zcela zásadní pro růst a diferenciaci buněk mnoha tkání (mukózní membrány, pokožky, stěny cév a oční rohovky). Potřeba tohoto vitamínu je proto zcela zásadní v období rychlého růstu a diferenciaci tkání [42]. Integrita epitelálních buněk dýchacího traktu [43, 44], funkce adaptivní imunity a negativní změny v regeneraci epitelii sliznice jsou také velmi ovlivněny dostatečnou koncentrací retinolu. Sérové koncentrace pod 0,70 $\mu\text{mol/l}$ jsou považovány za deficienci a hodnoty pod 0,35 $\mu\text{mol/l}$ za vážnou deficienci u předčasně narozených dětí [45].

V případech, kdy může být nedonošené dítě krmeno mateřským mlékem z mléčné banky, je významné znát koncentraci retinolu a α -tokoferolu, aby mohlo být dosaženo optimální výživy novorozence pro správný růst, vývoj a dostatečnou obranyschopnost.

Mateřské mléko je do mléčné banky dodáváno od dárkyň zamražené. Vzorčky mléka jsou smíchány a pasterizovány za kontrolovaných podmínek. Před uskladněním jsou jednotlivé vytvořené dávky mléka rychle zchlazeny a zamraženy. Koncentrace vitamínů mohou být vlivem pasterizace, skladování a dvakrát proběhnutému procesu zamražení a rozmražení změněny. Také proto je vhodná kontrola složení mateřského mléka, které nemá na rozdíl od komerčních výživ přesně certifikované složení.

4.4.2 Složení matrice

Velmi proměnlivé složení mateřského mléka v průběhu laktace i jednotlivých porcí kojení ovlivňuje přístup v průběhu extrakce i samotného stanovení. Výrazně se mění nejenom koncentrace samotných stanovovaných analytů, ale především obsah hlavních složek mléka (tuky, bílkoviny a cukry), které interferují, případně znemožňují stanovení [107].

4.4.2.1 Nestanovované složky

Mateřské mléko je matrice velmi komplexní. V prvních měsících života novorozence zajišťuje veškeré nutriční potřeby, zároveň i dostatečný přísun tekutin a podporu ne plně funkčního hormonálního a imunitního systému. Rozlišujeme 3 druhy mateřského mléka: kolostrum (mlezivo), přechodné a zralé mateřské mléko. Složení mateřského mléka vykazuje také významné změny v průběhu jednoho kojení. Takzvané „přední mléko“ přijímané na začátku sání obsahuje více vodné a sacharidové složky, zatímco „zadní mléko“ je bohaté na nenasycené mastné kyseliny a cholesterol [99].

Obsah lipidů v mléce v průběhu laktace významně roste [108-110]. Celkové množství triacylglycerolů se postupně zvyšuje, což vede ke zvětšování tukových globulí přítomných v mléce. Oproti tomu biosyntéza fosfolipidů se snižuje [111]. Množství tuku vykazuje circadiální rytmus a významně se mění v průběhu jednoho kojení. „Zadní“ mléko obsahuje až 4–5× více tuku (4–6 %) než mléko přední (1,5–2,0 %), produkované na začátku pití zralého mléka.

Naopak složka proteinová [112, 113] je ve zralém mléce zastoupena méně oproti kolostru. Hlavními proteiny zastoupenými v mléce jsou kasein, albumin, imunoglobulin IgA a lysozym [114]. Proteiny zajišťují vyvážený zdroj aminokyselin a některých enzymů potřebných pro trávení přijímaného mléka (lipázy, amylázy, ...). Proteinová složka mléka zajišťuje také široké spektrum biologických aktivit. Antimikrobiálních funkce imunoglobulinů IgA, kaseinu, laktoferinu, haptokorinu, α -laktalbuminu a laktoperoxidázy jsou umožněny jejich relativní resistencí vůči proteázám v horní části trávicího traktu dítěte. Imunomodulačně působí především cytokiny a laktoferin. V průběhu snižování celkového obsahu proteinů v objemu mléka, roste podíl kaseinu [112].

Také sacharidová složka je v průběhu laktace v poměru k celkovému objemu mléka snižována [115], převážnou část tvoří oligosacharidy. Přestože celkové množství sacharidů v mléce klesá, množství laktózy roste [116, 117]. Stoupá ze 4 % přítomných v kolostru na 7 % ve zralém mléce.

Změny v koncentracích hlavních složek mateřského mléka v průběhu laktace (v závislosti na době, která uběhla od porodu) viz Tabulka 5.

	Kolostrum	Přechodné mléko	Zralé mléko
Laktace (dny)	1–4	5–14	> 14
Tuky (g/dl),	1,99±0,25		3,89±0,28
Proteiny (g/dl)	1,88±0,4		1,35±0,3
Oligosacharidy (g/l)	20,9±4,81		12,9±3,30
Retinol (μ mol/l)	5–7	3–5	1,4–2,6
α -Tokoferol (μ mol/l)	2,3–44,2	10,4–16,3	7,2–10,9

Tabulka 5: Změny koncentrace složek mateřského mléka v průběhu laktace upraveno podle ([1, 115-117])

4.4.2.2 Stanovované analyty – transport, koncentrace

Jednotlivé složky mateřského mléka přechází z plazmy do prostoru mléčné žlázy přes membránu epitelálních sekrečních buněk. Existuje pět různých transportních cest (čtyři transcelulární a jedna paracelulární). Některé látky přímo přestupují pomocí transportních proteinů přes bazolaterální a následně přes apikální membránu (např. monovalentní ionty, voda, glukóza a urea). Další možností je transport látek do Golgiho aparátu odkud jsou

odděleny jako vezikuly a do lumen mléčné žlázy jsou transportovány exocytózou (např. kasein, proteiny, laktóza, kalcium). Transcytóza, takzvaný vesikulární transport je využíván během tvorby kolostra pro transport imunoglobulinů, transferinu a prolaktinu. Paracelulární transport umožňuje přímé propojení intersticia a mléčné žlázy, umožňuje přestup leukocytů. Tato transportní cesta je otevřena pouze v době těhotenství a v případě zánětu. Tukové globule jsou transportovány speciální cestou. Jsou protlačeny přes apikální stranu sekretorní buňky, proto zůstávají i v mateřském mléce obklopeny membránou, občas tyto částice obsahují i část cytoplazmy. Tímto způsobem jsou do mléka transportovány tuky, vitamíny rozpustné v tucích [118, 119] a hormony.

Koncentrace vitamínu A v mléce je závislá nejen na sérových hladinách matky, ale podle délky laktace jeho uvolňování klesá [1]. Zatímco koncentrace vitamínu E se v průběhu laktace nemění ani není ovlivňována zvýšeným příjmem v potravě matky [120, 121].

4.4.3 Možnosti stanovení

Koncentrace vitamínu A a E v mateřském mléce, případně vliv suplementace matky na hladiny vitamínů v mléce i séru kojeného dítěte, byly stanovovány mnohokrát [122-127]. Už v roce 1947 byla publikována práce o vitamínu E v mateřském mléce [128].

4.4.3.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku před samotnou analýzou je i přes významný posun stále časově nejnáročnější fází stanovení. Je také zdrojem častých chyb. Protože je složení matrice velmi proměnlivé a změny obsahu tukových kapének v mateřském mléce může ovlivnit stanovení lipofilních vitamínů, musí být příprava vzorku velmi robustní.

Velkým problémem je také vzorkování. Mateřské mléko není homogenní matricí a mimo přirozené podmínky dochází velmi rychle k oddělování tukové a vodné složky. Proto vzorek nedostatečně homogenizovaný může obsahovat velmi rozdílné koncentrace stanovovaných vitamínů. Rozdíly mohou vznikat také při porovnávání vzorků předního a zadního mléka. Vodnatější přední mléko vytváří dvousložkovou matrici mnohem rychleji a je velkým problémem udržet homogenní prostředí v průběhu vzorkování. Homogenizace vzorku může být dosaženo několika způsoby. Nejběžnějším způsobem je zahřívání vzorku na 37 °C za

stálého míchání, dále bývá často používána ultrazvuková lázeň pro rozrušení tukových kapének [129].

Retinol i α -tokoferol jsou v mateřském mléce přítomny v tukových kapénkách, které bývají alespoň částečně obaleny membránou, kterou získají v průběhu transportu sekretorní buňkou. Vazba na transportní proteiny, lipidové kapénky ani na membrány není kovalentní, přesto musí být vitamíny před samotným stanovením uvolněny z matrice [130].

K rozrušení struktur, ve kterých jsou vitamíny navázány, se nejčastěji používá **hydrolýza (saponifikace)**. V průběhu saponifikace dochází k přeměně esterů vitamínů na alkoholy. Tuky (glyceridy a fosfolipidy) jsou hydrolyzovány na volné mastné kyseliny a glycerol, které mohou být od vitamínů separovány extrakcí do organického rozpouštědla.

Saponifikace probíhá nejčastěji hydroxidem sodným v prostředí ethanolu nebo methanolu [130]. Alkohol v reakční směsi rozrušuje vazby vitamínů na proteinové části tukových globulí a odstraňuje z matrice proteiny. Saponifikace může probíhat za studena nebo za tepla. Kompletní alkalická hydrolýza tuků za laboratorní teploty je časově náročná (vyžaduje cca 12 hodin) [131, 132]. Tradiční alkalická hydrolýza za studena byla ale nahrazena hydrolýzou za zvýšené teploty. Vyšší teplota průběh urychlí, při 80° trvá kompletní hydrolýza do 30 minut [133, 134]. Dlouhý čas saponifikace za nižší teploty má za následek sice lepší homogenizaci vzorku a tím i snížení variačního koeficientu, ale dochází k významným ztrátám stanovovaných vitamínů [129]. Association of Official Analytical Chemists' International (AOAC) poskytuje validovanou referenční metodu pro stanovení retinolu [135] a α -tokoferolu [136] ve které je použita saponifikace matrice při 70 °C 25 a 30 minut.

Byla popsána také hydrolýza enzymatická [137], která je šetrnější nejenom k retinolu, ale umožňuje stanovit zároveň estery retinolu a karotenoidy. V roce 2001 byla publikována on-line extrakční metoda, která kombinuje výhody superkritické fluidní extrakce (SFE) a enzymatické hydrolýzy [138].

Vitamíny bývají ze saponifikované směsi **extrahovány** organickými rozpouštědly. Nejčastěji používaná rozpouštědla pro extrakci jsou n-hexan [129, 139] a diethylether. Výťažnost extrakce závisí na objemovém zlomku ethanolu ve vodné fázi extrakční směsi. Prostředí, které vznikne po saponifikaci (voda-ethanol-soli mastných kyselin) se chová jako uhlovodíkové

rozpouštědlo a konkuruje tak organickému rozpouštědlu. Výtěžnost v této situaci závisí také na obsahu mastných kyselin (lipidů) ve vzorku. Pokud nejsou použity optimální podmínky pro uvolnění analytů z lipofilního prostředí po saponifikaci, výtěžnost extrakce je velmi nízká [130]. Optimální koncentrace ethanolu ve vodném prostředí pro extrakci retinolu a α -tokoferolu do n-hexanu je mezi 30-40 % [140]. Kromě nejčastěji používané klasické extrakce byla publikována metoda pro superkritickou fluidní extrakci [141].

4.4.3.2 Stanovení – separace vitamínů, detekce

Ke stanovení obou vitamínů v jednom vzorku se převážně používají chromatografické metody [142-144]. Retinol je možné detekovat spektrofotometricky (absorpční maximum 325 nm), fluorescenčně (excitační maximum 324-328 nm; emisní maximum 470-490 nm) i elektrochemicky. Při elektrochemickém stanovení jsou detekční limity srovnatelné se spektrofotometrickou detekcí. α -Tokoferol lze také detekovat stejnými technikami. Absorpční maximum je 292 nm, při fluorescenční detekci jsou maxima 295 a 330 nm. Elektrochemická detekce je pro α -tokoferol citlivější než fluorescenční. Nejčastěji jsou tyto vitamíny stanovovány spektrofotometricky [145-148].

4.4.3.3 Moderní přístupy, automatizace

Cílem současných analytických metod je zjednodušení postupů a zkrácení doby přípravy vzorku. Minimalizování ruční práce při přípravě vzorku a zavádění automatických metod není pouze cílem, tyto nové metody používají také menší objemy organických rozpouštědel, proto jsou i levnější a šetrnější k životnímu prostředí (zelená chemie). V roce 1999 byla publikována plně automatizovaná metoda pro stanovení vitamínu A a E v mléce a kojeneckých výživách. Stanovení vychází z referenčních metod AOAC, které zahrnují saponifikaci a extrakci, a je prováděno robotickou stanicí propojenou s HPLC systémem s UV detekcí [149].

5 Přístrojové vybavení

5.1 Chromatografické sestavy

Separace, identifikace a kvantifikace stanovovaných liposolubilních vitamínů byly prováděny na chromatografických sestavách firmy Shimadzu. V práci byly použity dvě sestavy: **Prominence Shimadzu (Kyoto, Japan)** patřící do kategorie HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie) a **Nexera Shimadzu (Kyoto, Japan)**, která se řadí do novější kategorie chromatografického přístrojového vybavení UHPLC (ultra účinná kapalinová chromatografie). Výhody a omezení obou přístrojů shrnuje Tabulka 7, která specifikuje jednotlivé součásti sestav. Při vývoji metod byly porovnávány vlastnosti analytických kolon různých typů. Tabulka 6 shrnuje vlastnosti jednotlivých kolon rozdělených podle typu na monolitní, částicové a kolony s částicemi s pevným jádrem a porézním povrchem.

Výrobce	Název	Fáze	Rozměry (mm)	Částice (μm)	Porozita (Å)
monolitní kolony					
Merck ^a	Chromolith Performance	RP-18e	100×4,6	-	130
Merck ^a	SpeedROD	RP-18e	50×4,6	-	130
Phenomenex ^b	Onyx	C18	100×3,0	-	130
částicové kolony					
Supelco ^c	Ascentis	RP-amide	150×3,0	2,7	90
kolony s částicemi s pevným jádrem a porézním povrchem					
Supelco ^c	Ascentis Express	C18	150×2,1	2,7	90
Supelco ^c	Ascentis Express	RP-amide	100×3,0	2,7	90
Supelco ^c	Ascentis Express	RP-amide	75×3,0	2,7	90

Tabulka 6: Popis jednotlivých analytických kolon použitých při vývoji separačních metod

^a Merck (Darmstadt, Německo)

^b Phenomenex (Torrance, USA)

^c Supelco (Bellefonte, USA)

Součásti systému	Prominence	Nexera
Technické specifikace		
řídící software	LC Solution	Lab Solution
komunikační modul	CBM-20AC	CBM-20A
autosampler	SIL/20AC	SIL/30AC
pracovní teplota (° C)	4–40	4–35
max počet vzorků	10+70 (1,5 ml vialky)	
Rack changer/C (max počet vzorků)	(96 x 12) 1152 (MTP)	
dávkové objemy (μl)	1–100 μL	1–50 μL
opakovatelnost nástřiku (RSD)	< 0,3% (10 μL)	< 0,25% (50 μL)
správnost nástřiku	±1% (50 μL, n=10)	±1% (50 μL, n=10)
max pracovní tlak	20 MPa (2 900 PSI)	130 MPa (18 850 PSI)
vysokotlaké čerpadlo (pumpa)	LC–20AB	LC–30AD
průtok (ml/min)	0,0001–10	0,0001–5
správnost průtoku	± 1% (0,01–2 ml/min)	± 1%
přesnost průtoku	± 0,3% (0,05–5 ml/min)	< 0,06%
přesnost mísení (2 rozpouštědla)	± 0,5% (0,05–2 mL/min)	±0,5 %
degasér	DGU–20A5	DGU–20A5
kolonový termostat	CTO–20 A	CTO–20 AC
pracovní teplota (° C)	lab. teplota -10 °C až +85 °C	
detektor	DAD (SPD–M20A)	UV/VIS (SPD–20A)
rozsah (nm)	190–800 (512 diod)	190–700 (duální mód)
pracovní teplota (° C)	9–50	9–50
šum (AU)	± 0,3×10 ⁻³	± 0,25×10 ⁻⁵
optická dráha (mm)	10	10
objem cely (μl)	10	12

Tabulka 7: Technické specifikace chromatografických systémů (zpracováno podle technických listů, Shimadzu)

5.2 Laboratorní vybavení pro přípravu vzorků

Vybavení, které bylo použito při přípravě vzorků extrakcí z kapaliny do kapaliny (LLE) nebo na pevnou fázi (SPE) viz Tabulka 8.

Vybavení	Název	Výrobce
orbitální třepačka	LabDancer V	IKA (Staufen, Německo)
horizontální laboratorní třepačka	LT1	Kavalier (Votice, Česká republika)
termoblok	Transsonic Ultrasonic Cleaning Units TP 680 DP	Elma (Singen, Německo)
termostat	Stericell	BMT (Brno, Česká republika)
centrifuga	Centrifuge 5810-R	Eppendorf (Prague, Česká republika)
rotor	Swing-bucket Rotor A-4-62	Eppendorf (Prague, Česká republika)
laboratorní vakuová odparka	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, Německo)
pH metr	Argus χ	Sentron (Roden, Nizozemí)
elektroda	ISFET	Sentron (Roden, Nizozemí)
manifold	Visiprep™ SPE Vacuum Manifold DL (12-port model)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
vakuová pumpa	VACC-SPACE 50	Chromservis (Praha, Česká republika)
analytické váhy	Sartorius ME5-0CE	Sartorius AG (Goettingen, Německo)

Tabulka 8: Přesné názvy a výrobce laboratorního vybavení

6 Experimentální část I - Stanovení vitamínů A, E a D v lidském séru

Hlavní důraz byl kladen na stanovení vitamínu D a jeho aktivních metabolitů 25(OH)D a 1,25(OH)₂D. Stanovení vitamínů A, E a D z jednoho vzorku odebraného materiálu rozšiřuje možnosti klinického posouzení stavu pacienta a zároveň snižuje zátěž, kterou odběr krve pro některé pacienty bezesporu je. Samozřejmostí je také zmenšení nákladů potřebných pro jednotlivé stanovení.

Postup stanovení koncentrace zkoumaných látek v biologickém materiálu závisí na fyzikálně chemických vlastnostech analyzovaných látek a složitosti matrice. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat chromatografickou metodu, která by umožnila stanovení všech vybraných vitamínů (A, E, D a metabolity vitamínu D), a extrakční postup vhodný pro zvolenou detekci.

6.1 Chromatografická separace vitamínů

Stanovované vitamíny 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃, D₂, D₃, retinol a α -tokoferol mají velmi rozdílnou lipofilitu. Jejich lipofilita vyjádřená logP se pohybuje mezi 5,63–10,96 (viz Tabulka 2), důsledkem této diskrepance je nutnost rychlé změny eluční síly případně velké zvýšení rychlosti mobilní fáze, aby bylo dosaženo přijatelných elučních časů všech analytů. Na druhou stranu vitamery D₂, D₃ a jejich metabolity se od sebe liší pouze přítomností dvojně vazby a dalšího uhlíku na postranním řetězci (D₂), proto jejich oddělení vyžaduje velkou separační účinnost zvoleného systému.

6.1.1 Separace na monolitních kolonách

Cílem tohoto experimentu bylo navrhnout separaci, která by maximálně využívala výhodných vlastností monolitních kolon: 1) Zachování separační účinnosti i při velkých průtocích mobilní fáze. 2) Nízký zpětný tlak, který umožňuje prodloužení kolony pro lepší rozlišení píků bez tlakových omezení. 3) Extrémně rychlá re-ekvilibrace systému po změně průtoku i složení mobilní fáze.

6.1.1.1 Standardy, chemikálie, příprava roztoků

Stanovované vitamíny (název)	Výrobce
1,25-dihydroxycholecalciferol	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
25-hydroxycholecalciferol	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
Ergocalciferol	Fluka (Praha, Česká republika)
Cholecalciferol	Fluka (Praha, Česká republika)
Retinol, $\geq 97,0\%$ (HPLC)	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
(\pm)- α -Tocopherol synthetic, $\geq 96\%$ (HPLC)	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
rac- Tocol 50 mg/ml	Matreya (Pleasant Gap., USA)
mobilní fáze	
Methanol - gradient HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Acetonitrile gradient grade	Merck (Darmstadt, Německo)
2-Propanol gradient HPLC	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
deionizovaná voda	Ultrapure water system, Goro (Praha, Česká republika) ^a

Zásobní roztoky cholecalciferolu a ergocalciferolu byly připraveny rozpuštěním přesného množství naváženého standardu v odměrné baňce methanolem o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Zásobní roztok 1,25(OH)₂D₃ a 25(OH)D₃ byly připraveny stejným způsobem o koncentracích 4,80 μ mol/l a 49,91 μ mol/l.

Zásobní roztoky retinolu a α -tokoferolu byly připraveny o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Pro rozpouštění α -tokoferolu byl jako primární rozpouštědlo použit n-hexan. Následná ředění kalibračních a pracovních roztoků požadovaných koncentrací byla provedena methanolem. Roztok tokolu o deklarované koncentraci 50 mg/ml byl zředěn n-hexanem na zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l. Tokol byl použit jako vnitřní standard.

6.1.1.2 Vývoj metody

Na vývoji metody se podílela Alena Vlčková během vypracování své diplomové (Vývoj HPLC metody stanovení vitamínu D v biologickém materiálu – 2008) a rigorózní práce (HPLC metoda pro současné stanovení liposolubilních vitamínů A, D, E – 2009).

Byly testovány tři kolony: 1) Chromolith Performance (100×4,6 mm), 2) SpeedRod (50×4,6 mm) a 3) Onyx (100×4,6 mm). Všechny tři kolony měly stejnou fázi i porozitu. Přesný popis kolon viz Tabulka 6. Účinnost separace byla hodnocena na základě porovnání naměřených retenčních časů (t_R), teoretických pater (N), výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP) a rozlišení (R_s).

Krátká kolona SpeedRod a kolona Onyx při optimalizovaném průtoku sice separovaly píky vitamínu D_3 a D_2 s podobným rozlišením jako kolona Chromolith Performance, ale počet teoretických pater metabolitů vitamínu D nespĺňoval požadavky FDA.

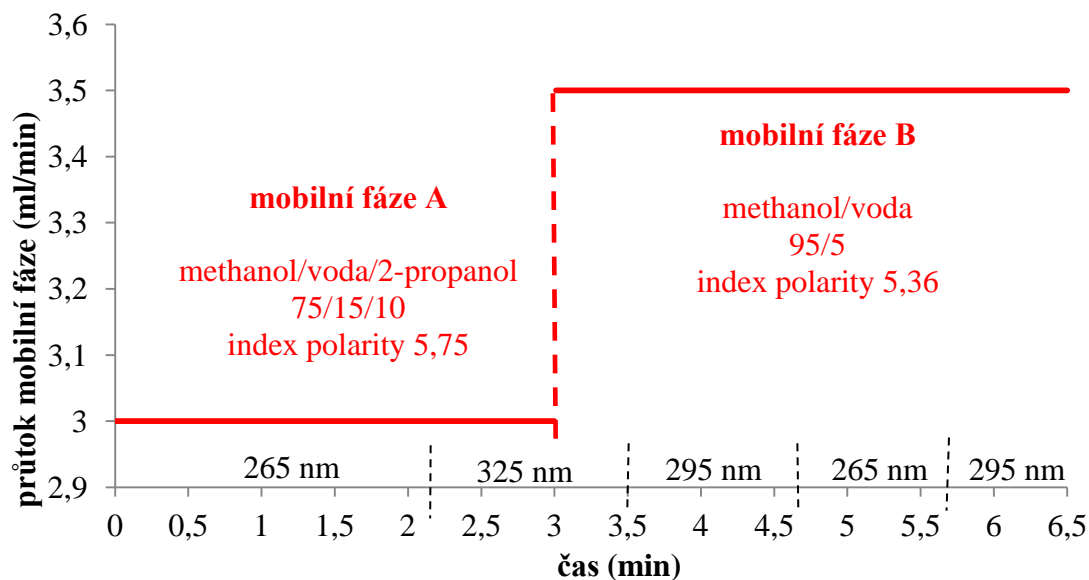
Právě tyto metabolity se v lidském séru vyskytují v koncentracích 10^{-9} (kalcidiol) a 10^{-12} (kalcitriol) mol/l. Proto byl při vývoji chromatografické metody s ohledem na použití stanovovaných vitamínů v séru kladen důraz na účinnost separace a limity detekce a kvantifikace těchto metabolitů. Pro zvýšení účinnosti separace byly použity dvě kolony (Chromolith Performance a SpeedRod) sériově zapojené.

Kalcidiol, kalcitriol a retinol mají $\log P$ v rozmezí 5,63 až 7,08 na rozdíl od molekul vitamínu D_3 , D_2 a α -tokoferolu jejichž lipofilita vyjádřená $\log P$ odpovídá hodnotám mezi 9,09 a 10,96. Změny eluční síly mobilní fáze lze dosáhnout postupným nebo stupňovitým (skokovým) gradientem. Protože monolitní kolony umožňují velmi razantní změnu při zachování separační účinnosti kolony, byla zvolena metoda skokového gradientu.

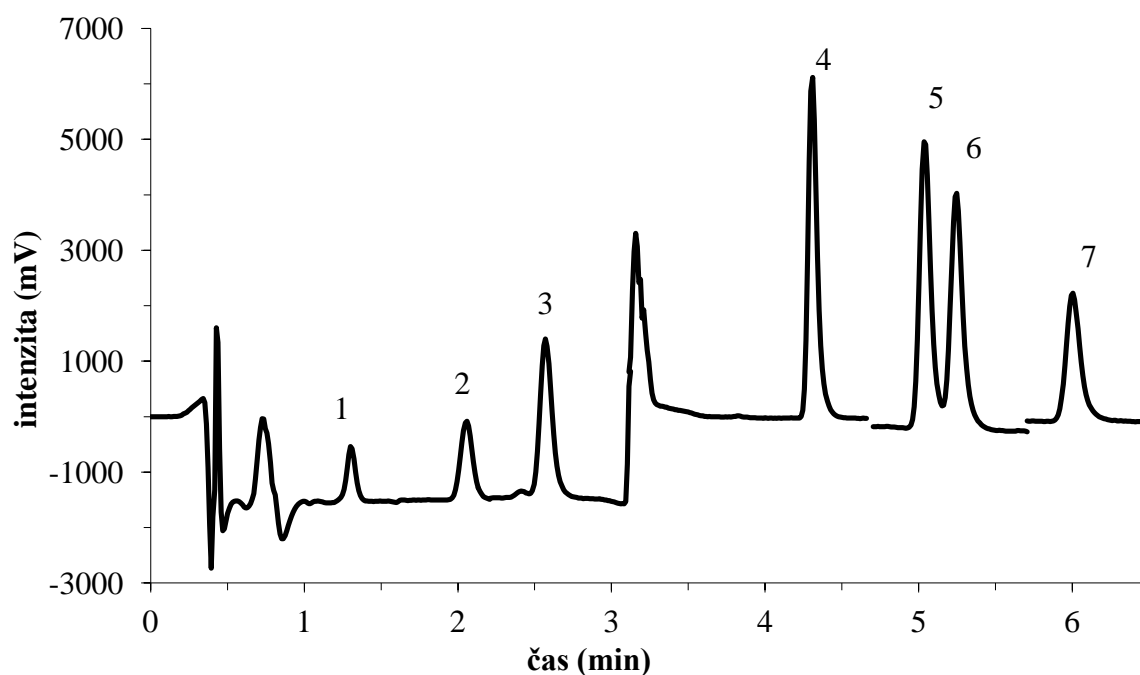
6.1.1.3 Výsledky

Popis chromatografické metody

Pro separaci byly použity dvě sériově zapojené monolitní kolony Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4,6 mm a SpeedRod RP-18e, 50 × 4,6 mm, celková délka kolony byla 150 mm. Skokový gradient byl použit pro změnu složení i průtoku mobilní fáze, změna byla provedena ve třetí minutě separace. Celková doba analýzy byla 6,5 minuty (včetně ekvilibrace kolony). Nástřik vzorku na kolonu byl 20 μ l. Přesný popis chromatografických podmínek viz Obrázek 11.



Obrázek 11: Popis chromatografických podmínek separace



Chromatogram 1: Chromatogram separovaných analytů (1 – 1,25(OH)D₃ 0,80 μmol/l, 2 – 25(OH)D₃ 0,83 μmol/l, 3 – retinol 0,83 μmol/l, 4 – tokol 20 μmol/l, 5 – vitamín D₂ 4,17 μmol/l, 6 – vitamín D₃ 4,17 μmol/l, 7 – α-tokoferol 16,67 μmol/l)

Separace vitamínů a tokolu jako vnitřního standardu je zobrazeno na záznamu Chromatogram 1. Mezi třetím a čtvrtým píkem je ve třetí minutě analýzy vidět odezva při přepnutí na mobilní

fázi B a změna průtoku na 3,5 ml/min. K ustálení základní linie došlo během půl minuty, což je dostatečné pro separaci píku č. 4. Druhé přepnutí mobilní fáze nastává po skončení separace. Další analýza v sérii začíná přepnutím mobilní fáze A a snížením průtoku na 3,0 ml/min, protože je v této části separace nižší průtok, odezva skokové změny proběhne během jedné minuty. Přesto je před prvním píkem stanovovaného analytu základní linie rovná.

Validace metody

Metoda byla validována podle požadavků FDA [150]. Účinnost separace systému byla hodnocena na základě následujících parametrů: kapacitní faktor ($k' > 2$), počet teoretických pater ($N > 2000$), výškový ekvivalent teoretického patra (HETP), faktor symetrie ($T \leq 2$) a rozlišení ($R_s > 2$). Parametry, které nesplňují stanovené požadavky, jsou v tabulce Tabulka 9: označeny přeškrtnutím. V tabulce nejsou uvedeny hodnoty testu vhodnosti systému pro analyt 1,25(OH)₂D₃, přestože separace byla dostatečná ($k' = 3,19$). Na základě vypočítaných limitů detekce a kvantifikace (viz. Tabulka 10) je zcela jasné, že koncentrace vitamínu přítomné v lidském séru touto metodou nelze stanovit. Proto pro tento analyt nebyly hodnoceny další validační parametry.

	k'	N	H (μm)	T	R_s
25(OH)D ₃	5,61	3 187	47	1,13	4,03
retinol	7,29	2 544	58	1,12	2,34
tokol	12,90	20 888	7	1,04	
ergokalciferol	15,23	9 723	15	1,13	3,071
cholecalciferol	15,90	7 908	19	1,29	0,84
α-tokoferol	18,39	6 492	23	1,27	2,394

Tabulka 9: Test způsobilosti systému

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

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

$$H = L/N$$

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

$$R_s = 2 * (t_{Ri} - t_{Rj}) / (W_i - W_j)$$

Parametr rozlišení (R_s) je v tabulce počítán vždy pro pík, který je eluován před konkrétním analytem (tabulka je uspořádána podle vzrůstajících retenčních časů analytů). Pro tokol nebylo R_s počítáno, protože mezi píkem vnitřního standardu a předcházejícím píkem retinolu dochází ke skokovému přepnutí mobilní fáze i změně průtoku. Nedostatečné rozlišení mezi vitamery ergokalciferolem a cholecalciferolem ($R_s = 0,84$) není pro stanovení vitamínů v séru problémem. Tyto vitamery se v reálném vzorku společně v podstatě nemohou vyskytnout,

protože ergokalciferol je přijímán z potravy v minimálním množství a pokud je pacient suplementován, tak vždy pouze jedním z vitamérů případně už konkrétním hydroxymetabolitem.

Další validační parametry: opakovatelnost nástřiku ($\leq 2\%$ pro retenční čas i plochu píku), linearita vyjádřená rovnicí přímky, koeficientem regrese a rozsahem, a limity detekce a kvantifikace shrnuje Tabulka 9.

	jednotky	Opakovatelnost		Linearita			Limity	
		t _R RSD %	A RSD %	rovnice přímky	r ²	rozsah	LOD	LOQ
1,25(OH) ₂ D ₃	nmol/l						132,9	265,7
25(OH)D ₃	nmol/l	1,32	1,72	y = 0,0089 x - 0,0120	0,99982	50 - 1 500	42,50	85,00
retinol	μmol/l	1,31	1,87	y = 25,1745 x - 0,2571	0,99279	0,25 - 10	0,05	0,11
tokol (IS)		0,20	1,35					
D ₂	nmol/l	0,20	1,33	y = 6,1648 x - 0,0432	0,99976	500 - 50 000	11,33	22,66
D ₃	nmol/l	0,19	1,51	y = 7,6854 x - 0,0563	0,99847	500 - 50 000	10,59	21,19
α-tokoferol	μmol/l	0,16	1,46	y = 1,1631 x - 0,0082	0,99979	1,0 - 50	1,55	3,10

Tabulka 10: Validační parametry

6.1.2 Separace na kolonách s pevným jádrem a porézním povrchem

Další možností, jak zvýšit separační účinnost chromatografického systému, je volba kolony s technologií částic s pevným jádrem a porézním povrchem. Tyto částice umožňují dosahovat vysokých separačních účinností při tvorbě nízkého zpětného tlaku kolony. Další výhodou je výrazné snížení spotřeby mobilní fáze.

Cílem tohoto pokusu bylo vyvinout separační metodu vhodnou pro komplexní stanovení vitamínu D, retinolu a α -tokoferolu. Vitamínem D se v tomto případě myslí jeho aktivní metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a oba dva vitamery prvního metabolitu ($25(\text{OH})\text{D}_2$ a $25(\text{OH})\text{D}_3$). Důraz byl kladen především na vyvinutí a validaci takové metody, která by byla dostatečně citlivá pro stanovení prvního metabolitu vitamínu D ($25(\text{OH})\text{D}$) a umožnila rozlišit jeho dva vitamery ($25(\text{OH})\text{D}_2$ a $25(\text{OH})\text{D}_3$) pro klinické využití. Mezi zásadní kritéria posuzování vhodnosti metody patřila také rychlost separace s ohledem na plánované využití metody pro velké série vzorků a samozřejmě i spotřeba organické mobilní fáze.

6.1.2.1 Standardy, chemikálie, příprava roztoků

Stanovované vitamíny (název)	Výrobce
$1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 , $\geq 99\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
25-Hydroxyvitamin D_2 , $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
25-Hydroxycholecalciferol, $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Cholecalciferol, $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Ergocalciferol, $\geq 98\%$ ^a (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Retinol, $\geq 97\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
(\pm)- α -Tocopherol synthetic, $\geq 96\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
rac-Tocol 50 mg/ml	Matreya (Pleasant Gap., USA)

Mobilní fáze

Acetonitrile gradient grade	Merck (Darmstadt, Německo)
2-Propanol gradient HPLC	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Methanol - gradient HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Deionizovaná voda	Goro (Praha, Česká republika) ^b

^a součet všech enantiomerů

^b deionizovaná voda byla připravována metodou reverzní osmózy a filtrace (Ultrapure water system, Goro, Praha Česká republika) přímo v laboratoři

Zásobní roztoky metabolitů vitamínu D (25(OH)D₂ a 25(OH)D₃) byly připraveny kvantitativním rozpuštěním 1 mg standardu v methanolu. Výsledné koncentrace roztoků byly 242,34 μmol/l a 249,56 μmol/l.

Zásobní roztoky retinolu a α-tokoferolu byly připraveny o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Pro rozpouštění α-tokoferolu byl jako primární rozpouštědlo použit n-hexan. Následná ředění kalibračních a pracovních roztoků požadovaných koncentrací byla provedena methanolem.

Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním základní směsi stanovovaných vitamínů. Jednotlivé koncentrace byly pro retinol 38,00 μmol/l, pro 25(OH)D₂ 2,42 μmol/l a pro 25(OH)D₃ 2,50 μmol/l. Tato směs byla ředěna 1/1, 1/3, 1/5, 1/7, 1/9, 1/20, a 1/25 (v/v) methanolem. Každá kalibrační hladina obsahovala 15 mmol/l interního standardu (tokolu).

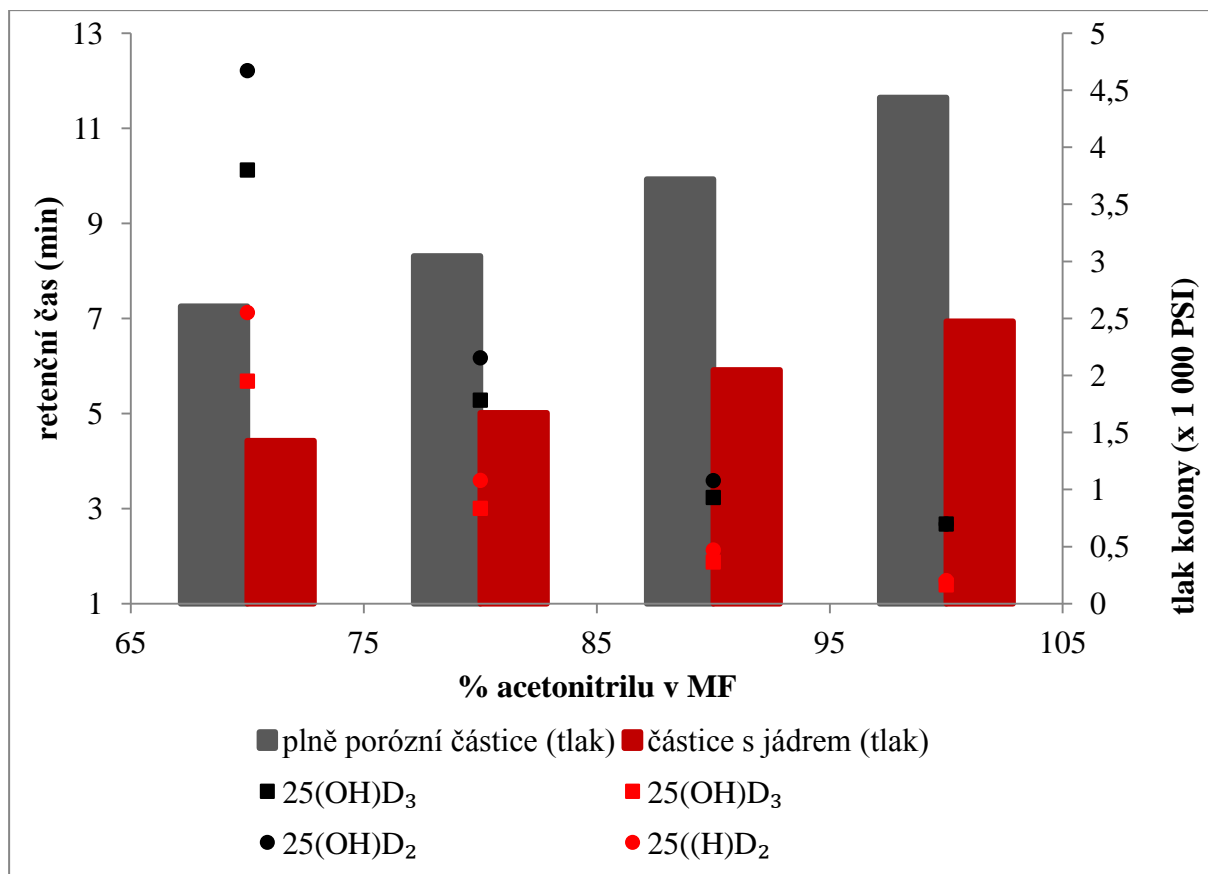
6.1.2.3 Vývoj metody

Vývoj separační metody probíhal na chromatografickém systému Nexera Shimadzu (Kyoto, Japan), podrobnosti o sestavě viz Tabulka 7:.

V první fázi testování byly ověřeny výhody kolon plněných částicemi s pevným jádrem v porovnání s plně porézními částicemi. Zároveň byl sledován vliv modifikace stacionární fáze vloženou amidovou skupinou. Toto porovnání bylo provedeno na kolonách Ascentis, které délkou odpovídaly kolonám monolitním, na kterých byla vyvinuta první metoda separace vitamínů (viz kapitola 6.1.1.3). 1) Kolona plněná plně porézními částicemi měla stacionární fázi C18 modifikovanou vloženou amidovou skupinou (Ascentis RP-amide, 150×2,1 mm, 3,0μm) a 2) kolona plněná částicemi s pevným jádrem a porózním povrchem (Ascentis Express C-18, 150×3,0 mm, 2,7μm).

Kolona plněná částicemi s pevným jádrem vykazovala téměř poloviční zpětný tlak i retenční časy obou hlavních koeluujících píků (25(OH)D₃ a 25(OH)D₂) oproti koloně s plně porézními částicemi (Graf 1).

Difuzní vrstva plně porézní částice (velikost částice 3 μm) je 1,5 μm, u částice s pevným jádrem (částice 2,7 μm) je 0,5 μm. Zkrácení difuzní cesty analytu má za následek významné zkrácení retenčních časů, ale separační účinnost kolony je zachována. Výsledky porovnání separačních účinností testovaných kolon na základě hodnot kapacitních faktorů pro 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂, faktoru selektivity a rozlišení viz Tabulka 11.



Graf 1: Porovnání plně porézních částic a částic s pevným jádrem na základě zpětného tlaku kolony a retenčních časů analytů

Částice	%	25(OH)D ₃			25(OH)D ₂			α	R	
		ACN	T	k'	N	T	k'			N
s jádrem	100		--	1,71	2 455	--	1,88	2 270	1,10	0,00
	90		1,27	1,70	4 037	1,22	2,60	4 789	1,21	1,00
	80		1,17	3,73	8 385	1,13	4,65	10 132	1,25	1,70
plně porézní	100		1,09	2,49	1 855	1,09	2,49	1 855	1,00	0,00
	90		1,20	3,13	4 512	1,15	3,58	4 943	1,14	0,80
	80		1,11	5,66	6 971	1,09	6,79	7 594	1,20	1,30
	75		1,05	9,97	8 559	1,30	12,10	9 202	1,21	1,90

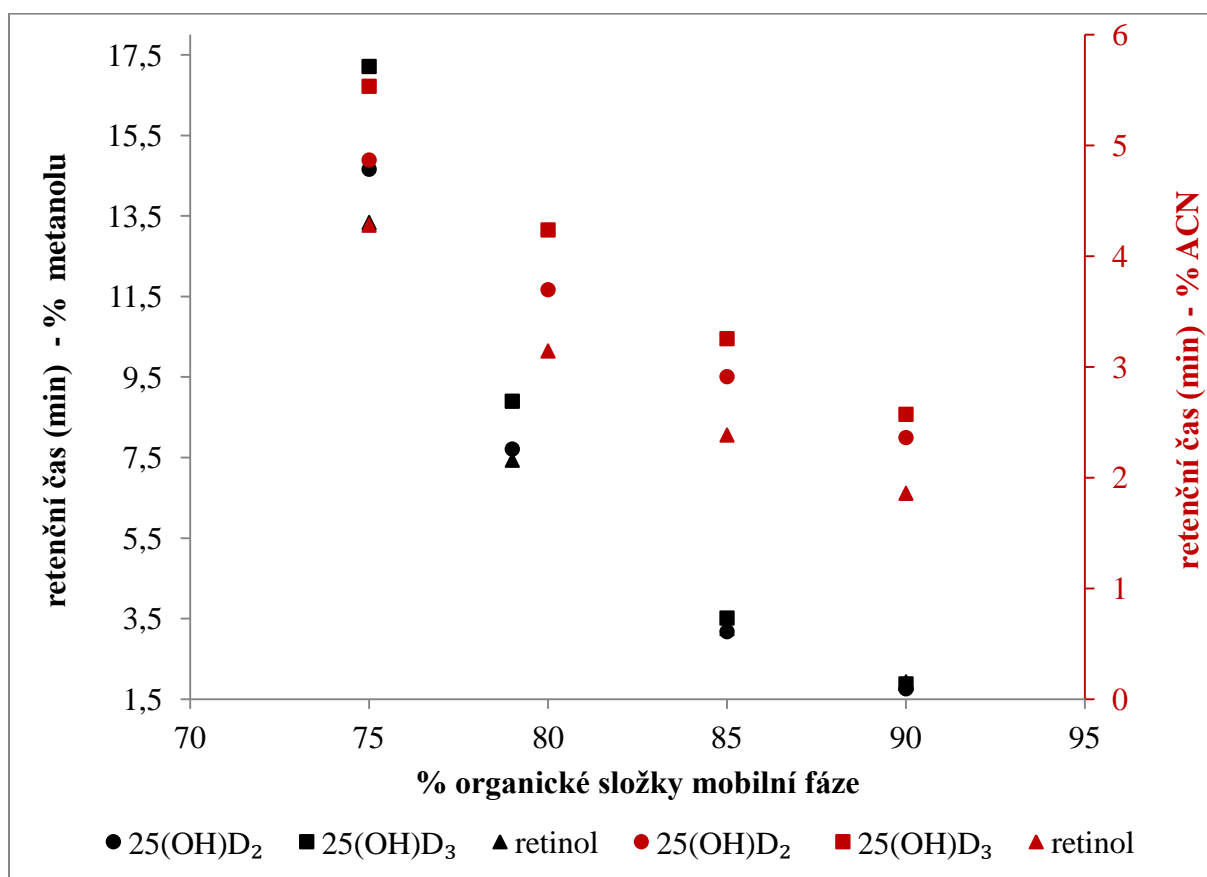
Tabulka 11: Test způsobilosti porovnávaných kolon (kapacitní faktor, faktor selektivity a rozlišení hlavních koeluujících píků splňující požadavky $k' \geq 2$, $\alpha \geq 1$ a $R \geq 1,5$ jsou vyznačeny tučně)

T = faktor symetrie
 k' = kapacitní faktor
 N = počet teoretických pater

α = faktor selektivity (separační faktor)
 R = rozlišení

Na základě těchto výsledků byly pro další testování zvoleny kolony s pevným jádrem a modifikovanou stacionární fází Ascentis Express RP-Amide 100×3,0 a 75×3,0 mm. Pro finální optimalizaci separace byla zvolena kratší kolona Ascentis Express RP-Amide 75×3,0 mm, která vykazovala dostatečnou separační účinnost pro stanovení ve velmi krátkém čase.

V další fázi vývoje metody byly porovnány eluční síly mobilních fází acetonitril/voda (ACN/voda) a methanol/voda (MeOH/voda). Eluční síla směsi mobilní fáze ACN/voda byla významně větší než směsi methanol/voda. Při stejném objemovém % organické složky (75 %) byl rozdíl v retenčních časech téměř 10 minut při dostatečném rozlišení pro 3 koelující vitamíny – 25(OH)D₂, 25(OH)D₃ a retinol. Výsledky tohoto pokusu znázorňuje graf závislosti retenčního času na % organické složky mobilní fáze pro methanol a acetonitril (Graf 2). Pro výslednou metodu byla zvolena gradientová eluce směsi ACN/voda.



Graf 2: Retenční graf závislosti na % organické složky mobilní fáze

V dalším kroku byl testován vliv pH vodné složky mobilní fáze na účinnost separace. Jako limitující kritérium byly zvoleny hodnoty kapacitních faktorů a rozlišení dvou vitamérů 25(OH)D, protože jejich dostatečná separace byla pro vyvíjenou metodu zásadní. Vliv pH byl testován v rozsahu 3–7. Separace čtyř vitamínů (25(OH)D₂, 25(OH)D₃, retinolu a α -tokoferolu) byla významněji ovlivněna pouze při pH=4. Došlo ke zlepšení rozlišení mezi píky vitamérů 25(OH)D o 2%, ke zlepšení o 5% došlo také u počtu teoretických pater a HETP. Naopak tvar píků byl při tomto pH ovlivněn negativně, chvostování píků vyjádřené hodnotou tailing faktoru (T) se zhoršilo o 12 % u píku 25(OH)D₂. Plocha a výška píku retinolu byly sníženy o 7 %, stejně parametry pro pík α -tokoferolu poklesly dokonce o 36%. Proto byla pro další optimalizace používána deionizovaná voda o pH 5–6.

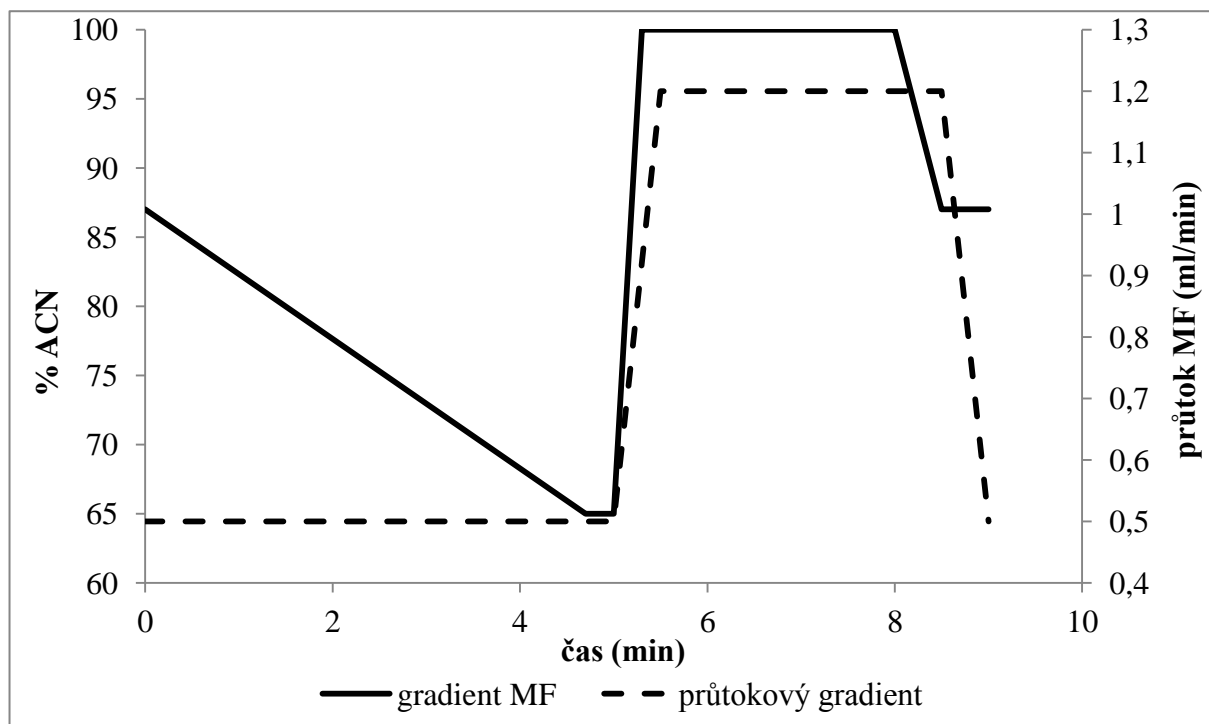
6.1.2.4 Výsledky

Popis chromatografické metody

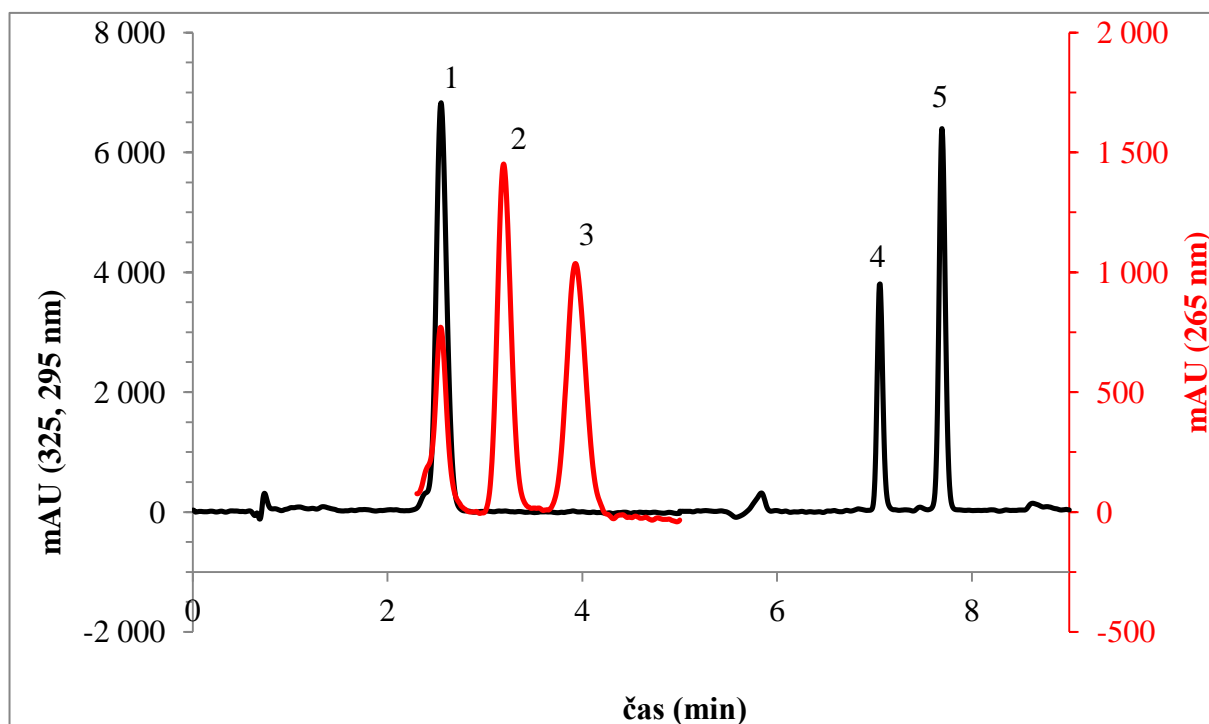
Separace probíhala na chromatografické sestavě Nexera Shimadzu (Kyoto, Japan) podrobnosti o sestavě viz Tabulka 7: s analytickou kolonou Ascentis Express RP-Amide 75×3,0 mm. Kolonový termostat byl nastaven na 30 °C a teplota v cele detektoru na 35 °C.

Stanovované vitamíny byly detekovány při vlnových délkách: 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂ (kalcidiol) –265 nm, α -tokoferol a tokol (vnitřní standard) – 295 nm a retinol – 325 nm. Celková doba analýzy byla 9,0 minut včetně ekvilibrace kolony. Nástřik na kolonu byl 5 μ l.

Optimalizovaná metoda má gradient mobilní fáze i průtokový gradient. Průběh metody (gradienty) znázorňuje Graf 3. Záznam separace standardů viz Chromatogram 2.



Graf 3: Popis gradientu MF a průtokového gradientu



Chromatogram 2: Separace standardů (1 – retinol 0,63 $\mu\text{mol/l}$, 2 – 25(OH) D_3 41,9 nmol/l, 3 – 25(OH) D_2 41,5 nmol/l, 4 – tokol 15 $\mu\text{mol/l}$, 5 – α -tokoferol 10,3 $\mu\text{mol/l}$)

Validace

Metoda byla validována podle požadavků FDA [150]. Účinnost separace systému byla hodnocena na základě následujících parametrů: kapacitní faktor ($k' > 2$), počet teoretických pater ($N > 2000$), výškový ekvivalent teoretického patra (HETP), faktor symetrie ($T \leq 2$). Rozlišení ($R_s \geq 2,0$). Výsledky testu způsobilosti systému viz Tabulka 12.

Analyt	k'	N	H (μm)	T	R_s
retinol	3,94	2 818	27	1,08	
25(OH)D ₃	3,59	2 620	29	1,01	
25(OH)D ₂	4,71	2 410	31	1,10	2,7
tokol	12,37	52 403	1,4	1,10	
α -tokoferol	13,58	50 591	1,4	1,07	13,6

Tabulka 12: Test způsobilosti systému

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$
$$N = 5,545 \cdot (t_R/W_{0,5})^2$$
$$H = L/N$$

$$T = W_{0,01}/2F$$
$$R_s = 2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj})/(W_i - W_j)$$

Rozlišení mezi retinolem a 25(OH)D₃ nebylo počítáno, protože detekce probíhá na rozdílných vlnových délkách (325 a 265 nm). Další validační parametry opakovatelnost nástřiku ($\leq 2\%$ pro retenční čas i plochu píku, $n=6$), linearita vyjádřená rovnicí přímky, koeficientem regrese a rozsahem a limity detekce a kvantifikace jsou zpracovány viz Tabulka 13.

Robustnost metody byla testována při změně teploty kolony ± 5 C od nastavené teploty a při změně průtoku mobilní fáze ± 10 a 15% nastaveného průtoku. Výsledky hodnocené podle požadavků [151] (faktor symetrie musí být $\leq 1,5$ a rozlišení u píků, které mají největší koeluci, musí být $\geq 1,5$). Výsledky měření shrnuje Tabulka 14.

	jednotky	Opakovatelnost		Linearita		Limity		
		t _R RSD %	A RSD %	rovnice přímky	r ²	Rozsah	LOD	LOQ
25(OH)D ₃	nmol/l	0,07	1,19	y = 1770,42 x - 3,34984	0,9995	12,8–166,7	1,60	5,32
25(OH)D ₂	nmol/l	0,14	1,17	y = 1779,93 x + 24,0668	0,9998	12,8–166,7	2,71	9,37
retinol	μmol/l	0,02	0,80	y = 1,13029 x - 0,140164	0,9997	0,05–2,53	0,001	0,005
tokol (IS)	plocha	0,08	0,29					
α-tokoferol	μmol/l	0,01	0,52	y = 38,8999 x + 0,442027	0,9997	0,79–40	0,026	0,087

Tabulka 13: Validační parametry separační metody (kolona Ascentis Express RP-Amide 75×3,0 mm, částice 2,7μm)

Teplota kolony (°C)	25(OH)D ₃					25(OH)D ₂					R _s	
	t _R	T	k'	N	HETP	t _R	T	k'	N	HETP		
25	4,14	1,07	4,64	2 047	37	5,58	1,02	6,60	1 152	65	1,7	
30	3,46	1,09	3,71	2 234	34	4,36	1,10	4,95	1 619	46	1,5	
35	2,88	1,12	2,99	2 461	30	3,46	1,11	3,79	2 161	35	1,1	
Průtok MF (ml/min)												
0,375	5,33	1,15	6,67	1 206	62	4,92	1,04	9,83	1 420	53	2,0	
0,45	3,96	1,10	3,93	2 054	37	3,66	1,12	5,45	1 169	64	1,5	
0,50	3,46	1,09	3,71	2 234	34	3,23	1,10	4,95	1 619	46	1,5	
0,55	3,01	1,10	3,46	2 540	30	2,81	1,09	4,45	2 139	35	1,2	
0,625	2,58	1,09	3,26	2 612	29	2,42	1,07	4,10	2 457	31	1,2	

Tabulka 14: Robustnost – změna průtoku mobilní fáze (hodnocené parametry T ≤ 1,5 a R_s ≥ 1,5, které odpovídají požadavkům, jsou v tabulce zvýrazněny)

6.2 Příprava vzorku před chromatografickou separací

Neupravené vzorky obsahující biologickou matici (sérum, plazma, moč, plná krev, ...) jsou většinou nevhodné pro přímou chromatografickou analýzu. Příprava vzorku před samotnou analýzou většinou odstraňuje ze vzorku matici, která je nekompatibilní s chromatografickým systémem. Dalším důvodem pro předúpravu vzorku je přítomnost interferujících látek, které ruší samotné stanovení. V neposlední řadě je potřeba zakoncentrovat stanovované látky pro dostatečnou citlivost metody.

Cílem těchto pokusů bylo porovnat výhody tradiční přípravy vzorku (LLE) a modernějšího postupu extrakce na pevnou fázi (SPE). Na základě tohoto porovnání zvolit optimální postup přípravy vzorku pro stanovení vitamínu D a ostatních liposolubilních vitamínů (A a E) v séru.

6.2.1 Extrakce na pevnou fázi (SPE)

Jako první byla testována extrakce na pevnou fázi. Při postupu byla zdůrazněna nižší spotřeba organických rozpouštědel oproti LLE. Velkou výhodou tohoto zpracování vzorku je rychlejší odstranění interferujících látek a větší čistota extraktu, která umožňuje stanovit látky o velmi nízkých koncentracích.

6.2.1.1 Standardy, chemikálie, příprava roztoků

Stanovované vitamíny (název)	Výrobce
1,25-dihydroxycholecalciferol	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
25-hydroxycholecalciferol	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
Ergocalciferol	Fluka (Praha, Česká republika)
Cholecalciferol	Fluka (Praha, Česká republika)
Retinol, $\geq 97,0\%$ (HPLC)	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
(\pm)- α -Tocopherol synthetic, $\geq 96\%$ (HP LC)	Calbiochem (Darmstadt, Německo)
rac- Tocol 50 mg/ml	Matreya (Pleasant Gap., USA)

Chemikálie použité při přípravě vzorku

Ethanol absolute	Merck (Darmstadt, Německo)
Acetonitrile gradient grade	Merck (Darmstadt, Německo)
n-Hexane 96 % multisolvent HPLC grade ACS UV-VIS	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
2-Propanol gradient HPLC	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
n-Hexane 96 % multisolvent HPLC grade ACS UV-VIS	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Methanol - gradient HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Deionizovaná voda	Goro (Praha, Česká republika) ^b

Zásobní roztoky cholekalciferolu a ergokalciferolu byly připraveny rozpuštěním přesného množství naváženého standardu v odměrné baňce methanolem o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Zásobní roztok $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a $25(\text{OH})\text{D}_3$ byly připraveny stejným způsobem o koncentracích 4,80 $\mu\text{mol/l}$ a 49,91 $\mu\text{mol/l}$.

Zásobní roztoky retinolu a α -tokoferolu byly připraveny o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Pro rozpouštění α -tokoferolu byl jako primární rozpouštědlo použit n-hexan. Následná ředění kalibračních a pracovních roztoků požadovaných koncentrací byla provedena methanolem. Roztok tokolu o deklarované koncentraci 50 mg/ml byl zředěn n-hexanem na zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l. Tokol byl použit jako vnitřní standard.

6.2.1.2 Výsledky

Vývoj metody

Na vývoji metody se podílela Šárka Horčíčková, podrobně je vývoj extrakční metody popsán v její diplomové práci „Aplikace SPE a technologie monolitních kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek“ (2009). Byly testovány SPE kolonky s různým sorbentem, optimalizována deproteinace séra, promývací a eluční kroky postupu.

Pro extrakci byly vybrány SPE kolonky - Speed C18/18 500 mg/3 ml. 250 μ l séra bylo smíseno s 1000 μ l ethanolu, který obsahoval vnitřní standard. Deproteinace séra probíhala 10 minut v lednici (4 °C). Dále byla směs centrifugována při 4000 \times g 15 minut opět při 4°C. Před aplikací supernatantu odděleného centrifugací od sraženiny byly SPE kolonky aktivovány. Aktivace sorbentu byla provedena 1 ml methanolu a kondicionace 1 ml redestilované vody. Na takto připravený sorbent byl aplikován vzorek – celý objem supernatantu. Po navázání extrahovaných analytů na sorbent byly vymyty nežádoucí látky aplikací 1 ml směsi vody (pH 7,5) a methanolu (95/5, v/v). SPE kolonka byla před elucí vysušena proudem dusíku z důvodu snížení množství vodných roztoků v následně získaném eluátu. Stanovované vitamíny byly eluovány 1,5 ml methanolu a následně 2 ml n-hexanu. Získaný eluát byl vysušen při 45 °C ve vakuové odparce (odpařování trvalo cca 2 hodiny).

Metoda byla dále optimalizována v rámci diplomové práce Bc. Lenky Nápravníkové „Porovnání extrakčních postupů ze séra pro HPLC stanovení liposolubilních vitamínů“ (2011). Pro dosažení lepších výsledků výtěžnosti extrakce vitamínů byly testovány změny v podmínkách deproteinace séra (množství vzorku, vliv teploty, různá deproteinační činidla a také čas deproteinace), postupu eluce (dávkování vzorku a elučních rozpouštědel na SPE kolonku) a vliv centrifugace na čistotu extraktu.

Významné zlepšení účinnosti eluce změnou elučního činidla (n-hexan/2-propanol v poměru 1/1, v/v) bylo prokázáno na standardech vitamínů. Výtěžnost eluce byla pro 25(OH)D₃ 112 %, ergokalciferol 89 %, cholekalciferol 86 %, retinol 95 %. Pouze pro α -tokoferol byla výtěžnost nižší než v původně vypracovaném postupu 68 %. Dále byl optimalizován postup deproteinace. Změna deproteinačního činidla (DČ) a snížení teploty pro lepší uvolnění analytů z matrice sice zvýšily výtěžnost procesu, ale účinnost nebyla dostatečná, proto jsme v optimalizaci postupu dále nepokračovali. Zkušenosti získané v průběhu optimalizace deproteinačního postupu byly dále využity pro vývoj extrakčního postupu z kapaliny do kapaliny (LLE), který by měl snížit ztráty vitamínů, které v tomto kroku zůstávají pravděpodobně v peletce sraženiny po deproteinaci séra. Zatímco deproteinované sérum je při LLE v kontaktu s extrakčním činidlem (EČ) během celého procesu a může snadněji dojít k přechodu vitamínů do EČ.

Popis validované extrakční metody

250 μ l séra bylo smíseno s 1000 μ l ethanolu, deproteinace probíhala 10 minut při 4°C. Po centrifugaci (4000 \times g, 15 minut, 4°C) byl supernatant aplikován na aktivovanou a kondiciovanou SPE kolonku (1 ml methanolu, 1 ml redestilované vody). Sorbent byl promyt 1 ml směsí vody (pH 7,5) a methanolu (95/5, v/v). SPE kolonka byla před elucí vysušena proudem dusíku. Stanovované vitamíny byly eluovány 1,5 ml methanolu a následně 2 ml n-hexanu. Získaný eluát byl vysušen při 45 °C ve vakuové odparce při 45 °C.

Validace

Extrahované vitamíny byly stanoveny HPLC metodou popsanou v kapitole 6.1.1. Odparek získaný po extrakci byl rozpuštěn v 50 μ l methanolu, přepipetován do mikrotitrační destičky a bylo provedeno HPLC stanovení vitamínů. Celková doba preanalytické fáze byla asi 140 minut. Zakoncentrování vzorku před samotným měřením bylo nutné z důvodu velmi nízké koncentrace 25(OH)D₃. V případě stanovení kontrolního séra Level I (deklarované hodnoty 87,6 \pm 17,4 nmol/l), byly koncentrace tohoto vitamínu velmi blízko limitu kvantifikace (85 nmol/l) použité chromatografické metody.

Pravdivost (dříve správnost) extrakčního postupu byla ověřena různým způsobem pro jednotlivé analyty. Pro 25(OH)D₃ bylo použito kontrolní sérum na dvou koncentračních hladinách 25-OH-Vitamin D3/D2 Serum Controls Chromsystems (Mnichov, Německo). Deklarované hodnoty 25(OH)D₃ byly pro Level I: 87,6 \pm 17,4 nmol/l, pro Level II: 185 \pm 37 nmol/l. Každá hladina byla zpracována 3 \times , výsledné hodnoty výtěžnosti a bias jsou vypočítány jako průměry obou měřených hladin. Pro vitamíny ergokalciferol a cholekalciferol neexistovalo kontrolní sérum, proto byla pravdivost ověřena spikováním séra (sérum bylo zpracováno 6 \times). Správnost (výtěžnost) extrakce vitamínů A a E byla vztahována k LLE používané ve Výzkumné laboratoři rutinně [152]. Také v tomto pokusu byla séra zpracována postupem SPE 6 \times .

Preciznost (dříve přesnost) extrakčního postupu byla hodnocena jako % relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti. Extrakce byla provedena 10 \times . Výsledky pravdivosti a preciznosti extrakčního postupu shrnuje Tabulka 15.

	% RSD	výtěžnost %	bias
25(OH)D ₃	7,79	69	-42 nmol/l
retinol	7,96	92	-0,1 μmol/l
ergokalciferol	4,17	67	-1,75 μmol/l
cholecalciferol	4,11	67	-1,30 μmol/l
α-tokoferol	6,93	73	-5,7 μmol/l

Tabulka 15: Pravdivost a preciznost SPE metody

Preciznost extrakční metody splňuje požadavky FDA [150], všechny hodnoty % RSD jsou menší než maximální povolená nepřeciznost 15%. Výtěžnost extrakce byla splněna pouze pro retinol, ostatní analyty byly extrahovány s výtěžností menší než 75 %.

6.2.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

Tato metoda extrakce je sice mnohem starší oproti SPE, ale protože nevyžaduje téměř žádné přístrojové vybavení (pouze laboratorní třepačku) a samotné oddělení analytů a nečistot neprobíhá na speciálních kolonkách, ale pouze na fázovém rozhraní dvou nemísitelných kapalin, byla LLE zkoušena jako dostupnější alternativa pro zpracování vzorků.

Cílem tohoto pokusu bylo vyvinout a validovat extrakční metodu, která by byla jednodušší a časově méně náročná než dříve vyvinutá SPE metoda. A využít informací získaných při optimalizaci deproteinace séra pro SPE postup, které zlepšily uvolnění stanovovaných analytů z vazeb na proteinové nosiče, pro zlepšení výtěžnosti extrakce.

6.2.2.2 Standardy, chemikálie, příprava roztoků

Stanovované vitamíny (název)	Výrobce
25-Hydroxyvitamin D ₂ , ≥98,0% (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
25-Hydroxycholecalciferol, ≥98% (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Cholecalciferol, ≥98% (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Ergocalciferol, ≥98,0% ^a (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Retinol, ≥97,0% (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
(±)- α -Tocopherol synthetic, ≥96% (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
rac-Tocol 50 mg/ml	Matreya (Pleasant Gap., USA)

Chemikálie použité při přípravě vzorku	
2-Propanol gradient HPLC	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Acetonitril gradient grade	Merck (Darmstadt, Německo)
Deionizovaná voda	Goro (Praha, Česká republika) ^b
Ethanol absolute	Merck (Darmstadt, Německo)
Kyselina chlorovodíková 35% p.a.	Penta (Praha, Česká republika)
Methanol gradient HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
n-Hexan 96 % multisolvent HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Titriplex II (EDTA, kyselina ethylendiamintetraoctová)	Merck (Darmstadt, Německo)

Zásobní roztoky metabolitů vitamínu D (25(OH)D₂ a 25(OH)D₃) byly připraveny kvantitativním rozpuštěním 1 mg standardu v methanolu. Výsledné koncentrace roztoků byly 242,34 μ mol/l a 249,56 μ mol/l. Zásobní roztoky retinolu a DL- α -tokoferolu byly připraveny o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Pro rozpouštění α -tokoferolu byl jako primární rozpouštědlo použit n-hexan. Následná ředění kalibračních a pracovních roztoků požadovaných koncentrací byla provedena methanolem.

Pracovní roztoky kyseliny askorbové (0,1 mol/l), kyseliny trichloroctové 0,01 mol/l a EDTA 2 % byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství substance v deionizované vodě.

Pro validaci extrakčního postupu bylo použito kontrolní sérum na dvou koncentračních hladinách 25-OH-Vitamin D₃/D₂ Serum Controls Chromsystems (Mnichov, Německo).

6.2.2.3 Výsledky

Vývoj metody

První část vývoje této metody probíhala v rámci diplomové práce Bc. Lenky Nápravníkové „Porovnání extrakčních postupů ze séra pro HPLC stanovení liposolubilních vitamínů“ (2011). Závěrečná optimalizace metody probíhala po odevzdání této diplomové práce.

Na základě zkušeností z vývoje SPE metody byl testován vliv objemu deproteinačního činidla a jeho složení. Opět bylo potvrzeno, že menší objem zvyšuje výtěžnost extrakce (jako optimální se ukázal poměr DČ/vzorek (1/1, v/v). Nejlepších výtěžností, obdobně jako u SPE metody, bylo dosaženo při použití směsi ethanolu a acetonitrilu 1/1 (v/v). Dále byl testován vliv okyselení extrakční směsi. Přídavek kyseliny trichloroctové (200 µl; 0,01 mol/l) po deproteinaci významně zvýšil výtěžnost extrakce na 87-95% pro 25(OH)D₃, cholekalciferol, ergokalciferol i pro vnitřní standard. Stanovení retinolu a α-tokoferolu bylo ovlivněno nečistotami přítomnými v extraktu. V některých vzorcích se nacházely nečistoty, které ovlivňovaly také stanovení 25(OH)D₃. Čistota extraktu nebyla ovlivněna ani změnou organických rozpouštědel použitých jako extrakční činidlo. Jako nejvhodnější se ukázala směs n-hexanu a 2-propanolu (96/4, v/v). Vitamíny během těchto pokusů byly stanovovány HPLC metodou popsanou v kapitole 6.1.1. Pro další pokusy byla vyvinuta nová HPLC metoda na koloně s pevným jádrem a porézním povrchem, popsaná v kapitole 6.1.2.

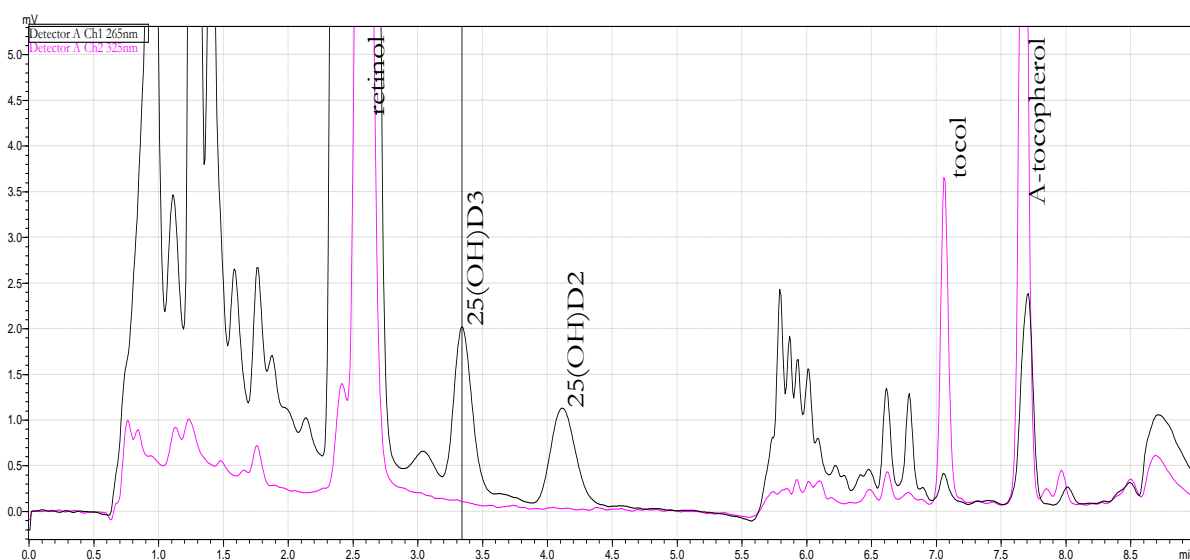
Pro zlepšení uvolnění analytů z proteinových nosičů byl testován vliv EDTA. Sérum bylo před deproteinací naředěno roztokem EDTA. Zvýšení výtěžnosti extrakce bylo zcela zřejmé pro všechny vitamíny.

Popis extrakční metody

Deproteinační a extrakční činidlo bylo připraveno smícháním odpovídajících objemových dílů rozpouštědel. Deproteinační činidlo (DČ): ethanol/acetonitril (1/1). K takto připravenému DČ byl přidán vnitřní standard (tokol) o výsledné koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$. Extrakční činidlo bylo připraveno smícháním n-hexanu/2-propanolu v poměru (94/6).

500 μl séra bylo v Eppendorf zkumavce naředěno 2 % roztokem EDTA v poměru (1/1, v/v). Naředěné sérum bylo napipetováno do extrakční zkumavky s 500 μl DČ. Směs byla promíchána (vortex 10 s) a deproteinace probíhala 10 minut při -28° . Po deproteinaci bylo do extrakční zkumavky přidáno 200 μl kyseliny trichloroctové a 2 ml extrakčního činidla, směs byla 5 minut vytřepávána. Poté byla směs centrifugována ($3220 \times g$, 10 minut, 4°C). Z oddělené organické fáze bylo odebráno 1,5 ml do Eppendorf zkumavky, tento objem byl odpařen ve vakuové odparce během 12 minut při 45°C .

Získaný odparek byl rozpuštěn v 50 μl methanolu a přepipetován do mikrotitrační destičky pro HPLC stanovení (analyty jsou ve vzorku zkoncentrovány $7,5\times$). Vitamíny byly v takto zpracovaných vzorcích stanoveny chromatografickou metodou popsanou v kapitole 6.1.2. Chromatografický záznam séra je zobrazen viz Chromatogram 3.



Chromatogram 3: Záznam séra zpracovaného extrakcí z kapaliny do kapaliny (retinol $c=1,37 \mu\text{mol/l}$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ $c=240 \text{ nmol/l}$, $25(\text{OH})\text{D}_2$ $c=217 \text{ nmol/l}$, tocol (vnitřní standard), α -tokoferol $c=15,54 \mu\text{mol/l}$)

Nečistoty, které ve vzorku zůstaly po extrakci, mají sice velkou odezvu v detektoru, protože jejich koncentrace byla 7,5× zvětšena zakoncentrováním vzorku, ale jsou eluovány v dostatečném čase před stanovovanými analyty. Zakoncentrování vzorku umožňuje stanovení obou vitamérů 25(OH)D.

Validace

Výtěžnost extrakce byla pro jednotlivé analyty: 25(OH)D₃ – 102 %, 25(OH)D₂ – 109 %, retinol – 104 % a pro vnitřní standard (tokol) 98 %. α-Tokoferol nelze v takto zakoncentrovaných vzorcích stanovit. Jeho nedostatečná rozpustnost v methanolu neumožňuje převést všechny α-tokoferol z odparku do 50 µl methanolu. Protože vyvíjená metoda měla být primárně zaměřená na stanovení vitamínu D, nebyl α-tokoferol dále stanovován.

Dále byla ověřena opakovatelnost extrakce vždy na dvou koncentračních hladinách stanovovaného analytu (n=6). Sérum, které neobsahovalo žádný vitamín D, bylo obohaceno standardy 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂ a vyšší koncentrací retinolu než bylo ve vzorku zjištěno. Metoda byla validována podle požadavků FDA [150]. Relativní směrodatná odchylka šesti měření nesmí být vyšší než 15%. Výsledky viz Tabulka 16. Tento požadavek splňují všechny stanovované analyty. Procenta RSD se na koncentračních hladinách 30 nmol/l u vitamínů 25(OH)D₃ a 25(OH)D₂ blíží k požadovaným 15%, důvodem je nízká koncentrace blízká limitům kvantifikace metody.

Analyt	Jednotky	Koncentrace	% RSD
25(OH)D ₃	nmol/l	30	11
		291	3
25(OH)D ₂	nmol/l	30	13
		262	5
tokol	plocha pod píkem	1 236	9
retinol	µmol/l	1,80	5
		4,06	4

Tabulka 16: Opakovatelnost extrakce

Aplikace metody

Tato extrakční metoda byla použita při vyšetření hladin vitamínů 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ a retinolu u čtyř dobrovolníků: 1) Muž 28 let – stanovení bylo provedeno v době léčby únavové zlomeniny v měsíci červnu. 2) Žena 25 let - odběr v letním období. 3) Žena 28 let – odběr v letním období. 4) Žena 56 let – odběr v zimním období. Vitamíny byly stanoveny chromatografickou metodou na analytické koloně s částicemi s pevným jádrem popsanou v kapitole 6.1.2.

Dobrovolníkům byla odebrána srážlivá krev a separované sérum bylo zamraženo v Eppendorf zkumavkách –28 °C až do zpracování. Stanovení byla provedena u každého pacienta dvakrát. Výsledky naměřených hodnot jsou uspořádány v Tabulka 17.

Dobrovolník	25(OH)D ₃ (nmol/l)	25(OH)D ₂ (nmol/l)	Retinol (μmol/l)
1	< LOQ	< LOQ	2,01±0,01
2	51±16	< LOQ	1,64±0,73
3	< LOQ	< LOQ	1,00±0,02
4	< LOQ	< LOQ	1,24±0,03

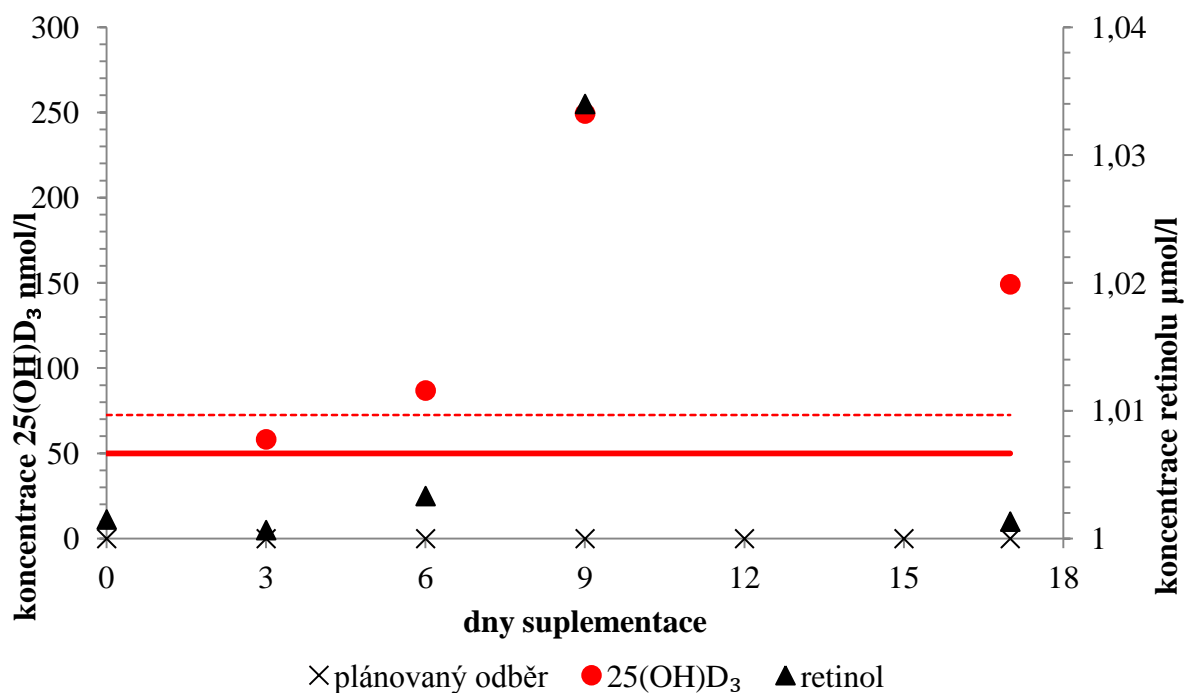
Tabulka 17: Koncentrace vitamínů stanovovaných u dobrovolníků

Pouze dobrovolník č. 2 byly v séru nalezeny stanovitelné koncentrace 25(OH)D₃. U žádného z dobrovolníků nebyl stanoven metabolit 25(OH)D₂, metabolit vitamínu ergokalciferolu bývá v séru stanoven pouze v případě jeho suplementace. V potravě je běžně přijímáno pouze minimální množství ergokalciferolu, proto se jeho první metabolit v séru téměř nevyskytuje. Koncentrace retinolu se pohybovaly mezi hodnotami 1,00–2,01 μmol/l což odpovídá fyziologickým hodnotám.

Dobrovolníkovi č. 1 byla po námažové zlomenině a prokázané insuficienci vitamínu D doporučena suplementace volně dostupným přípravkem Osteocare (jedna tableta obsahuje 2,5 μg cholekalciferolu). Přípravek byl podáván v průběhu jednoho měsíce 1 tableta/denně. Po měsíčním užívání přípravku nebyl zaznamenán nárůst koncentrace 25(OH)D₃.

Dobrovolníkovi č. 3 s prokázanou insuficiencí vitamínu D byl podáván přípravek Vigantol (10 kapek obsahuje 167 μg cholekalciferolu). Bylo podáváno 10 kapek/denně v průběhu 14 dní.

Kontrolní odběry krve byly plánované od začátku suplementace (den nula) vždy s odstupem 2 dní. Bohužel odběry 12. a 15. den nebyly uskutečněny, po ukončení suplementace byl proveden odběr 17. den. Koncentrace stanovovaných vitamínů je zaznamenána v grafu Graf 4.



Graf 4: Koncentrace stanovovaných vitamínů a v závislosti na dnech suplementace Vigantolem

Plánované odběry krve jsou znázorněny na časové ose ×.

Hodnocení deficitních stavů vitamínu D podle IOM:

deficit - do 50 nmol/l

nedostatek – do 72,5 nmol/l

Koncentrace 25(OH)D₂ nebyla léčbou změněna, hodnoty byly menší než limit kvantifikace. Průměrná koncentrace retinolu byla 1,01 μmol/l s maximální odchylkou 1,6% šestý den měření. Tato odchylka je vzhledem k možné chybě měření a biologické variabilitě zanedbatelná. Koncentrace 25(OH)D₃ vzrostla už po 3 dnech suplementace z hodnot definovaných jako deficit na hodnoty spadající do kategorie nedostatečnosti.

6.3 Závěr

V průběhu vývoje vhodné chromatografické metody pro stanovení vitamínů A, E a D v lidském séru byly testovány různé druhy stacionárních fází pro zvýšení selektivity separace. Byla vyvinuta metoda s použitím dvou sériově zapojených monolitních kolon Chromolith Performance RP-18e, 100×4,6 mm a SpeedRod RP-18e, 50×4,6 mm. Extrémně rychlá změna složení i průtoku mobilní fáze byla zajištěna skokovým gradientem. Tímto postupem byla maximálně využita velmi rychlá ekvilibrace monolitních kolon a celková doba analýzy mohla být zkrácena na pouhých 6,5 minuty při separaci šesti analytů (1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ retinolu, cholekalciferolu, ergokalciferol, α-tokoferolu) a vnitřního standardu. Separace metabolitu 1,25(OH)₂D₃ byla sice dostatečná, ale limity detekce a kvantifikace (133 a 267 nmol/l) při 265 nm nebyly dostatečné pro stanovení reálných koncentrací v séru pacientů. Opakovatelnost plochy piků se pohybovala v rozmezích 1,33–1,87 % RSD. Opakovatelnost retenčních časů byla odlišná při průtoku mobilní fáze A a mobilní fáze B. Analyty separované v přítomnosti mobilní fáze A (průtok kolonou 3,0 ml/min) měly opakovatelnost retenčních časů znatelně vyšší (1,31–1,32 % RSD) oproti analytům, které byly separovány v druhé části chromatogramu (0,16–0,20 % RSD). Při menším průtoku kolonou pravděpodobně nebylo dosaženo úplné ekvilibrace kolony, zatímco vyšší průtok při změně mobilní fáze A na B umožnil rychlejší nasycení stacionární fáze. Hlavním negativem je velká spotřeba rozpouštědel použitých jako mobilní fáze. Důvodem jsou použité velké průtoky mobilní fáze analytickou kolonou. Z toho vyplývá samozřejmě vyšší cena jedné analýzy oproti metodám, které používají stacionární fáze optimalizované pro menší průtoky. Také množství vzniklého organického odpadu je vyšší. Přesto výhody monolitních kolon byly v této metodě plně využity a ani extrémní změny podmínek neměly negativní vliv na kvalitu separace a selektivitu.

Dále byly testovány kolony s částicemi s pevným jádrem jako vhodná alternativa pro zlepšení separace s použitím menších průtoků mobilní fáze. Pro finální optimalizaci separace byla zvolena kolona Ascentis Express RP-Amide 75×3,0 mm, která vykazovala dostatečnou separační účinnost pro stanovení ve velmi krátkém čase. Důraz byl kladen na separaci vitamerů kalcidiolu (25(OH)D₂ a 25(OH)D₃), které jsou pro klinické hodnocení stavu vitamínu D vhodnější než stanovení kalcitriolu (1,25(OH)D). Také dostupnost vitameru D₂ byla v době vývoje této metody lepší než během vývoje předcházející separační metody.

Amidová skupina vložená do 18 uhlíkatého řetězce stacionární fáze zlepšila selektivitu analytické kolony. Gradientovou elucí bylo dosaženo separace interferujícího retinolu od kalcidiolu během 5 minut. Separace byla optimalizována pro stanovení vitamínů po LLE (viz kapitola 6.2.2.3). Nečistoty, které jsou v extraktu po LLE 7,5× zakoncentrovány, byly eluovány dříve než vitamíny a stanovení neruší. Zrychlením průtoku zároveň se změnou mobilní fáze na 100% acetonitril, bylo dosaženo eluce lipofilnějšího α -tokoferolu a tokolu, který byl v metodě použit jako vnitřní standard. Celá separace včetně ekvilibrace kolony trvala 8,5 minuty. Záznam stanovení vitamínů v séru po LLE viz Chromatogram 3.

Vyvinuté postupy úpravy vzorku (SPE a LLE) byly porovnány na základě přítomnosti interferujících látek a výtěžnosti a preciznosti postupu. Vzorky zpracované SPE postupem obsahovaly podle očekávání méně interferujících látek. Preciznost metody splňovala požadavky FDA [150], relativní směrodatná odchylka pro všechny stanovované vitamíny byla <8 %. Velkým nedostatkem byla malá výtěžnost postupu pro vitamín D (25(OH)D₃ 69 %, ergokalciferol a cholekalciferol 67 %) a α -tokoferol 73 %. Vitamíny pravděpodobně nejsou dostatečně uvolněny z bílkovin. Při centrifugaci deproteinovaného vzorku se vytváří peletka, ve které pravděpodobně zůstávají analyty, pouze supernatant je nanášen na SPE kolonku. Zatímco deproteinované sérum je při LLE v kontaktu s extrakčním činidlem (EČ) během celého procesu a může snadněji dojít k přechodu vitamínů do EČ. Uvolnění analytů ze vzorku usnadnění jejich přechodu do EČ bylo podpořeno naředěním vzorku roztokem EDTA a přidavkem kyseliny trichloroctové. Výtěžnost extrakce se pro jednotlivé analyty pohybovala v rozmezí 98–109 %. Nečistoty, které ve vzorku zůstaly po extrakci, měly sice velkou odezvu v detektoru, protože jejich koncentrace byla 7,5× zvětšena zakoncentrováním vzorku, ale byly od stanovovaných analytů separovány gradientovou elucí viz kapitola 6.1.2. Zakoncentrování vzorku umožňuje stanovení obou vitamerů 25(OH)D. α -Tokoferol naopak nelze v takto zakoncentrovaných vzorcích stanovit. Jeho nedostatečná rozpustnost neumožňuje převést všechny α -tokoferol z odparku do 50 μ l methanolu. Protože vyvíjená metoda měla být primárně zaměřená na stanovení vitamínu D, nebyl α -tokoferol dále stanovován. Opakovatelnost této extrakční metody splňuje požadavky FDA [150].

Optimalizovaný postup přípravy vzorku (LLE – viz kapitola 6.2.2.3) a chromatografické stanovení analytů gradientovou elucí s UV detekcí (viz kapitola 6.1.2) byly aplikovány na vzorky 4 dobrovolníků. Pouze v jednom případě byla koncentrace 25(OH)D₃ větší než limit

kvantifikace. Vitamer $25(\text{OH})\text{D}_2$ nebyl stanoven v žádném vzorku. Po suplementaci Vigantolem (167 μg cholekalciferolu denně) pacienta s prokázanou insuficiencí vitamínu D byly 3. den stanoveny koncentrace $25(\text{OH})\text{D}_3$ hodnocené jako nedostatek a 9. den už byly stanovené hodnoty hodnocené jako normální (dostatečné).

7 Experimentální část II – Stanovení retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce

Kvantifikací retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce může být posouzen příjem těchto vitamínů dítětem. Stanovované vitamíny jsou pro vývoj novorozenců a obzvláště předčasně narozených dětí zcela zásadní a v případě plného kojení je mateřské mléko jejich jediným zdrojem. Cílem této práce bylo vyvinout vhodný postup úpravy vzorku a extrakční metodu a celý postup přípravy vzorku před chromatografickým stanovením validovat.

7.1 Použité chemikálie a příprava roztoků

Stanovované vitamíny (název)	Výrobce
Retinol, $\geq 97,0\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
(\pm)- α -Tocopherol synthetic, $\geq 96\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
chemikálie použité při přípravě vzorku	
Titriplex II (EDTA, kyselina ethylendiamintetraoctová)	Merck (Darmstadt, Německo)
Hydroxid draselný – peletky, pure Ph. Eur., NF	AppliChem GmbH (Darmstadt, Německo)
Kyselina L-askorbová purris p.a.	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Kyselina chlorovodíková 35 % p.a	Penta (Praha, Česká republika)
Ethanol absolute	Merck (Darmstadt, Německo)
Methanol – gradient HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Acetonitril – gradient grade	Merck (Darmstadt, Německo)
n-hexan 96 % – multisolvent HPLC grade	Scharlau Chemie (Sentmenat, Španělsko)
Deionizovaná voda	Ultrapure water system, Goro (Praha, Česká republika) ^a

^a deionizovaná voda byla připravována přímo v laboratoři metodou reverzní osmózy a filtrace

Zásobní roztok retinolu byl připraven rozpuštěním přesného množství naváženého standardu v odměrné baňce methanolem o výsledné koncentraci 2 mmol/l. Tento roztok byl dále ředěn methanolem na kalibrační a pracovní roztoky potřebných koncentrací. Zásobní roztok α -tokoferolu byl připraven stejným způsobem, pouze jako rozpouštědlo byl použit n-hexan. Následná ředění kalibračních a pracovních roztoků byla provedena methanolem.

Pracovní roztoky KOH 5, 10, 15 mol/l, kyseliny askorbové (0,1 mol/l) byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství substance v deionizované vodě. HCl 1 mol/l byla připravena ředěním koncentrované 35% kyseliny deionizovanou vodou. pH vodných pracovních roztoků bylo adjustováno přidáním 1 mol/l HCl, změna pH v průběhu adjustace byla sledována pH metrem.

7.2 Chromatografická metoda

Separace analytů probíhala na HPLC sestavě Prominence (specifikace systému viz Tabulka 7:) s monolitní kolonou Chromolith Performance RP-18e, 100mm×4,6mm. Nástřik byl 20 μ l methanolového roztoku odparku po LLE. Mobilní fázi byl 100 % methanol o průtoku 2,5 ml/min. Stanovované vitamíny byly detekovány při 325 nm (retinol) a 295 nm (α -tokoferol). Limity detekce a kvantifikace byly 0,13 a 0,27 μ mol/l pro retinol a 0,09 a 0,19 μ mol/l pro α -tokoferol.

Tato metoda již byla optimalizována Výzkumnou laboratoří Kliniky gerontologické a metabolické ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové pro stanovení vitamínů A a E v lidském séru [153]. Vhodnost metody pro stanovení vitamínů v mateřském mléce byla ověřena.

7.4 Vývoj postupu pro přípravu vzorku

Výchozí postup, který byl následně optimalizován, vycházel z informací získaných z literatury [133-136]. Doporučované postupy byly hodnoceny s cílem vyvinout jednoduchou a časově nenáročnou přípravu vzorku s ohledem na množství vzorků, pro jejichž přípravu měla být vyvinutá a validovaná metoda použita.

V této fázi byl zvažován objem vzorku, který bude možné použít, aniž by byla omezena výživa novorozence. 1 ml homogenizovaného mateřského mléka byl zvolen jako dostatečný objem pro analýzu. Vzorek by měl být odebrán z 5–20 ml odstříkaného mateřského mléka za stálého míchání při teplotě 37 °C.

7.4.1 Optimalizace deproteinace

Výtěžnost procesu extrakce závisí mimo jiné na uvolnění analytů z proteinových nosičů a lipidových struktur vzorku. Pouze uvolněné analyty mohou být za vhodných podmínek extrahovány.

Byl testován vliv poměru deproteinačního činidla a vzorku v reakční směsi. Deproteinace probíhala lépe v případě přidání vzorku do deproteinačního činidla (DČ). Na základě předběžných testů byl zvolen poměr 4/1 (v/v) při objemu vzorku 0,5 ml.

Pro optimální efekt uvolnění analytů z proteinových nosičů byly jako DČ testovány různé chemikálie. Deproteinační efekt – uvolnění analytů z proteinových nosičů – byl hodnocen na základě stanovených koncentrací vitamínů po extrakci.

7.4.1.1 Pracovní postup

500 µl homogenizovaného mateřského mléka bylo deproteinováno v poměru 1:4 (v/v). Vzorek byl pipetován do DČ a směs důkladně promíchána. Deproteinace probíhala 10 minut za laboratorní teploty. Jako DČ byl testován ethanol, methanol a acetonitril.

Do extrakční směsi byl přidán 1 ml kyseliny askorbové (0,1 mol/l), 1 ml KOH (10 mol/l). Saponifikace probíhala 30 minut při teplotě 80 °C. Extrakce byla provedena 2 ml n-hexanu. n-

Hexan byl po extrakci odebrán a odpařen a odparek poté rozpuštěn v 500 μ l methanolu. Vitamíny byly stanoveny chromatografickou metodou popsanou v kapitole 7.2.

7.4.1.2 Výsledky pokusu

Stanovené koncentrace vitamínů ($n=3$) při použití třech různých deproteinačních viz Tabulka 18. Stanovené koncentrace po deproteinaci acetonitrem byly pro oba vitamíny významně nižší, proto bylo toto DČ vyhodnoceno jako nevhodné. Koncentrace α -tokoferolu při deproteinaci alkoholickými DČ se významně nelišila. Naopak naměřené koncentrace retinolu byly významně vyšší při použití ethanolu, který byl proto zvolen jako vhodné deproteinační činidlo.

DČ	Retinol $c \pm SD$ (μ mol/l)	α -Tokoferol $c \pm SD$ (μ mol/l)
Acetonitril	0,87 \pm 0,17	12,46 \pm 0,45
Methanol	1,77 \pm 0,13	22,67 \pm 1,03
Ethanol	2,33 \pm 0,12	21,45 \pm 0,42

Tabulka 18: Výběr deproteinačního činidla

7.4.2 Optimalizace saponifikačního procesu

Pro odstranění lipidů ze vzorku byl zvolen hydroxid draselný. Pro optimalizaci saponifikačního procesu byly testovány různé podmínky: koncentrace KOH (5, 10 a 15 mol/l), objem KOH (1, 1,5 a 2 ml), délka saponifikace a vliv kyseliny askorbové na oxidaci stanovovaných vitamínů.

Pokud byla kyselina askorbová přítomna v saponifikační směsi, byly naměřené koncentrace stanovovaných vitamínů vyšší. Kyselina byla do směsi přidána před hydroxidem, přidavek kyseliny po hydroxidu případně po saponifikaci nezvýšila měřené koncentrace vitamínů.

Optimální podmínky saponifikace byly zvoleny na základě porovnání opakovatelnosti procesu (% RSD).

7.4.2.1 Pracovní postup

500 μ l homogenizovaného mateřského mléka bylo deproteinováno 2 ml ethanolu. Vzorek byl pipetován do DČ a směs byla důkladně promíchána. Po 10 minutách byl ke směsi přidán 1 ml kyseliny askorbové 0,1 mol/l.

Koncentrace KOH optimální pro odstranění všech tuků ze vzorku byla testována při koncentracích 5, 10 a 15 mol/l. Pro tento pokus byl zvolen objem hydroxidu 1 ml.

Pro ověření dostatečného objemu hydroxidu pro saponifikaci, byl k deproteinované směsi přidán postupně zvyšující se objem 10 mol/l KOH. Byly použity objemy 1, 1,5 a 2 ml KOH. Bylo zjištěno, že objem 1 ml je dostatečný.

Dále byla testována délka saponifikace 30, 40 a 50 minut a porovnán způsob ohřevu vzorku. Pro udržení teploty 80 °C po celou dobu saponifikace byl otestován termoblok s otvory pro zkumavky, vodní lázeň a termostat. Tyto podmínky byly testovány při saponifikaci 1 ml KOH 10 mol/l. Po saponifikaci byly vitamíny ze směsi extrahovány 2 ml hexanu, a stanoveny chromatografickou metodou viz. 7.2.

7.4.2.2 Výsledky pokusu

Optimální koncentrace hydroxidu byla vybrána na základě opakovatelnosti vyjádřené jako % RSD pro 6 měřených vzorků (výsledky viz Tabulka 19).

Relativní směrodatné odchylky vypočítané pro koncentrace retinolu byly vyšší při použití hydroxidu o koncentracích 5 a 15 mol/l oproti hodnotám získaným pro koncentraci 10 mol/l. Naopak naměřené hodnoty α -tokoferolu vykazovaly nejvyšší % RSD při koncentraci 10 mol/l, přesto byly při všech hodnotách hydroxidu % RSD nižší nebo stejné jako pro retinol. Jako optimální byla zvolena koncentrace hydroxidu 10 mol/l na základě hodnot % RSD při koncentracích retinolu 0,50–0,58 μ mol/l, RSD 7,94 % a α -tokoferolu 6,11–7,16 μ mol/l, RSD 7,93 %.

	KOH (mol/l)	5	10	15
Retinol	c (μmol/l)	0,40	0,54	0,41
	% RSD	10,48	7,94	18,06
α-Tokoferol	c (μmol/l)	7,34	6,64	6,95
	% RSD	1,42	7,93	4,81

Tabulka 19: Výběr optimální koncentrace KOH

Protože po přidání větších objemů hydroxidu (1,5 a 2 ml) nebyly naměřené koncentrace stanovovaných vitamínů vyšší, byl objem 1 ml zvolen jako dostatečný.

Při porovnávání možností způsobu ohřevu zkumavky se vzorkem v průběhu saponifikace byly získány nejlepší výsledky v termostatu, který udržoval konstantní teplotu v celém prostoru, kde byly vzorky umístěny a kde byly zároveň chráněny před světlem.

Prodlužování saponifikace na 40 a 50 minut nemělo za následek statisticky významné změny v koncentracích stanovovaných vitamínů, proto byl zvolen nejkratší testovaný čas (30 minut), který odpovídá podmínkám pro saponifikaci doporučeným AOAC [135, 136].

7.4.3 Optimalizace LLE

7.4.3.1 Pracovní postup

Po ochlazení saponifikované směsi (1 ml KOH, 10 mol/l) na laboratorní teplotu byly vitamíny extrahovány do 2 ml n-hexanu v průběhu 5 minut intenzivního vytřepávání. Organická a vodná vrstva byly odděleny centrifugací (10 minut, 3220× g, 4 °C). 1,5 ml organické vrstvy bylo odebráno a odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v 375 μl methanolu.

Pro zvýšení výtěžnosti extrakce byl testován čas potřebný k přechodu vitamínů mezi vodnou a organickou fází. Čas třepání extrakční zkumavky byl zvýšen na 10 a 15 minut. Dále byl testován přídavek 1 ml vody k extrakčnímu činidlu a následně také vliv pH přidané vody. pH vody bylo v tomto pokuse upraveno přídavkem HCl 0,1 mol/l a KOH 0,1 mol/l.

7.4.3.2 Výsledky pokusu

Prodloužení extrakčního času nemělo za následek statisticky významné zvýšení měřených koncentrací vitamínů, proto byl jako dostatečný čas zvolen 5 minut, aby celková doba přípravy vzorku byla co nejkratší.

Výtěžnost extrakce byla zvýšena přidáním 1 ml vody k extrakčnímu činidlu, koncentrace retinolu vzrostla oproti extrakci bez přídavku vody o 48 %, koncentrace α -tokoferolu o 43 %. Opakovatelnost extrakce se přídavkem vody významně zlepšila. Opakovatelnost vyjádřena jako % RSD tří měření byla statisticky významně nižší po přídavku 1 ml vody do extrakční směsi, pokles u hodnot retinolu byl z 15 % na 7 % a u α -tokoferolu z 5 % na 1 % RSD.

Při testování vlivu pH vody přidané k extrakčnímu činidlu, byly naměřené hodnoty pro pH jiné než 5,2 u retinolu téměř o 20 % a u α -tokoferolu o 10 % nižší.

7.5 Optimalizovaný postup přípravy vzorku:

500 μ l homogenizovaného mateřského mléka bylo napipetováno do 2 ml ethanolu, směs byla důkladně promíchána a deproteinace probíhala 10 minut za laboratorní teploty. Do směsi byl přidán 1 ml kyseliny askorbové (0,1 mol/l) a 1 ml KOH (10 mol/l), saponifikace probíhala 30 minut při teplotě 80 °C v termostatu. Po ochlazení vzorku na laboratorní teplotu byl do zkumavky přidán 1 ml deionizované vody o pH 5,2 a extrakce byla provedena 2 ml n-hexanu při 5 minutovém třepání. Poté byla zkumavka se vzorkem centrifugována (10 minut, 3 220x g, 4°C). 1,5 ml organické vrstvy bylo odebráno a odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v 375 μ l methanolu. Vitamíny byly stanoveny chromatografickou metodou popsanou v kapitole 7.2.

7.5.1 Validace extrakčního postupu

Všechny výsledky validace shrnuje Tabulka 20. Validace extrakčního postupu byla provedena podle doporučení FDA [150]. Výtěžnost extrakce by měla být v rozmezí od 75 % do 125 %, preciznost metody vyjádřená % relativní standardní odchylky by neměla přesáhnout 15 %.

7.5.1.1 Pravdivost

Pravdivost (dříve správnost) byla ověřena výpočtem výtěžností extrakčního postupu. Bylo analyzováno mateřské mléko obohacené o stanovované vitamíny. Příklad vitamínů do vzorku byl proveden pomocí deproteinačního činidla. Vzorky byly obohaceny retinolem na koncentračních hladinách 1, 2,5, a 5 $\mu\text{mol/l}$ a α -tokoferolem na koncentračních hladinách 2,5, 5, a 10 $\mu\text{mol/l}$. Každá hladina byla připravena 6 \times .

Výtěžnosti validované metody pro všechny hladiny obou vitamínů jsou v rozmezí 82–110 %, což splňuje požadavky FDA. Metoda je vhodná pro analýzu lidského mateřského mléka.

7.5.1.2 Preciznost

Preciznost (dříve přesnost) během krátkého časového úseku označená jako opakovatelnost byla ověřena stanovením 6 vzorků mateřského mléka. Průměrné koncentrace retinolu byly $1,24 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$ s RSD 3 %, koncentrace α -tokoferolu byly $7,7 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ a RSD 5 %.

Mezilehlá preciznost vyjadřuje přesnost metody v delších časových intervalech. V průběhu jednoho dne byla stanovena jako % RSD z 6 vzorků extrahovaných s minimálním odstupem 0,5 hodiny. Mezi denní preciznost byla měřena v průběhu 4 dní. 25 ml pasterizovaného a zmrazeného lidského mateřského mléka bylo ve vodní lázni ohřáto na 37 °C, celý objem mléka byl nepřetržitě míchán a rozdělen do 1,5 ml Eppendorf zkumavek na 24 homogenních alikvotů. První den byly vzorky změřeny bez zmrazení získaných alikvotů, ostatní vzorky byly v průběhu testování uchovávány při –28 °C. Každý den bylo změřeno 6 extrahovaných vzorků. Relativní směrodatná odchylka a průměrná koncentrace byly vždy počítány ze všech do aktuálního dne změřených vzorků (první den n=6, druhý den n=12, ...).

Preciznost metody pro oba vitamíny je podle požadavků FDA [150] dostatečná. Pro α -tokoferol jsou hodnoty RSD i během čtyřdenního měření stabilní v rozsahu 6–8 % RSD. Na rozdíl od hodnot získaných pro retinol, koncentrace vitamínu E významně klesá a tím se zvyšuje relativní směrodatná odchylka.

Preciznost měření mezi osobami byla ověřena stanovením vitamínů v 15 alikvotech, které extrahovali dva pracovníci v průběhu jednoho dne. Preciznost byla vyjádřena jako celková

relativní směrodatná odchylka všech třiceti měření. Také tato preciznost splňuje požadavky FDA [150]. Hodnoty RSD retinolu byly 10 % a α -tokoferolu 7 %.

7.5.2 Aplikace metody

Pro testování hladin vitamínů (retinolu a α -tokoferolu) v mateřském mléce v průběhu laktace bylo vybráno 27 žen ve věku 25–33 roků. Ženy byly požádány o dodání čtyř vzorků mateřského mléka v množství cca 25 ml, každý vzorek měl být z jiného laktačního období (1–2, 3–4, 5–6 a 9–12 měsíc po porodu). Statisticky byly hodnoceny pouze vzorky, které byly dodány od jedné ženy ve všech zvolených obdobích laktace. Ke statistickému hodnocení byl použit software NCSS (Kaysville, USA), konkrétně byl použit neparametrický párový t-test (Wilcoxon).

Vzorky mateřského mléka byly skladovány při $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ v injekčních stříkačkách o objemu cca 25 ml. Maximální doba skladování byla 2 roky. Před extrakcí vitamínů byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě až do úplného rozmražení. Následně byly za konstantního míchání ve vodní lázni při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ homogenizovány a rozděleny do 3 reprezentativních analytických vzorků pro požadovaná stanovení. Před samotným zpracováním byly tyto vzorky uchovávány při $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximálně 5 dní. Po extrakci byly vzorky stanoveny HPLC metodou. Záznam stanovení retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce čtyři měsíce po porodu je zobrazen na chromatogramu Chromatogram 4.

		Retinol				α-Tokoferol			
Výtěžnost	c ^a (μmol/l)	1,0	2,5	5,0		2,5	5,0	10,0	
	%	86	82	90		109	95	92	
	% RSD	10	4	7		0,5	2	2	
Opakovatelnost	c±SD ^b (μmol/l)	1,24±0,04				7,7±0,4			
	% RSD	3				5			
Mezipersonální preciznost	c±SD ^c (μmol/l)	0,80±0,08				6,3±0,4			
	% RSD	10				7			
mezilehlá preciznost (dny 1–4)	den	1 ^f	2 ^g	3 ^h	4 ⁱ	1 ^f	2 ^g	3 ^h	4 ⁱ
	c±SD (μmol/l)	0,78±0,04	0,77±0,07	0,61±0,05	0,61±0,03	6,0±0,4	5,0±0,3	5,2±0,3	5,4±0,5
	cd ^d (μmol/l)	---	0,01	0,17	0,18	---	0,6	0,7	0,5
	D ^e (%)	---	1,07	21,96	22,60	---	9,5	11,8	9,0
	% RSD	5	7	14	14	6	8	8	8

Tabulka 20: Validace LLE metody pro stanovení retinolu a α-tokoferolu v mateřském mléce

^a koncentrace vitamínů použité pro obohacení vzorků mléka (n = 6)

^b průměrná koncentrace vitamínů ± směrodatná odchylka (n = 6)

^c průměrná koncentrace vitamínů ± směrodatná odchylka (n = 30)

^d pokles koncentrace (μmol/l) vztažená k hodnotě naměřené první den

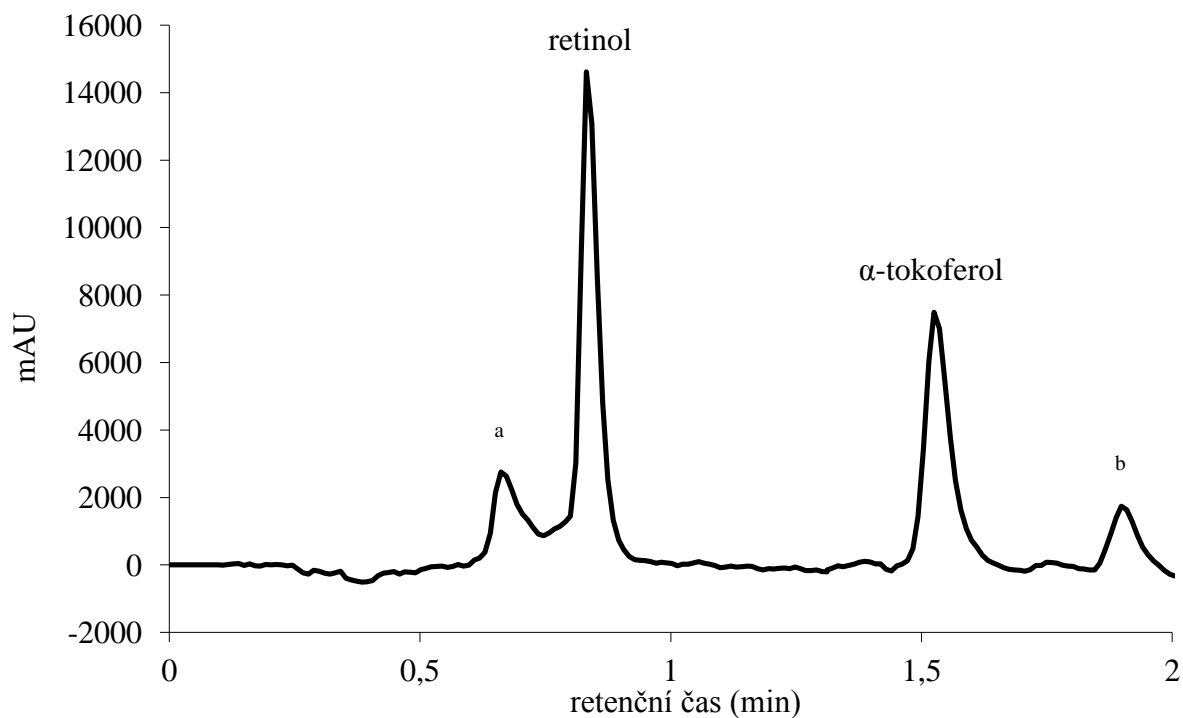
^e procentuální pokles koncentrace

^f průměrná koncentrace a směrodatná odchylka počítaná ze 6 vzorků

^g průměrná koncentrace a směrodatná odchylka počítaná z 12 vzorků

^h průměrná koncentrace a směrodatná odchylka počítaná z 18 vzorků

ⁱ průměrná koncentrace a směrodatná odchylka počítaná z 24 vzorků



Chromatogram 4: Chromatogram stanovených vitamínů v mateřském mléce 4 měsíce po porodu

retinol ($t_R = 0,83$ min, $c = 1,17$ $\mu\text{mol/l}$)

α -tokoferol ($t_R = 1,52$ min, $c = 21,22$ $\mu\text{mol/l}$)

^{a, b} odezvy nečistot ve vzorku

Při statistickém hodnocení byly porovnávány hladiny stanovených vitamínů v různých obdobích laktace. Statisticky bylo zpracováno celkem 48 vzorků rozdělených do čtyř laktačních období (1–2, 3–4, 5–6 a 9–12 měsíce od porodu), v každém období bylo porovnáno 12 výsledků změřených vitamínů. Na rozdíl od koncentrací α -tokoferolu hodnoty retinolu v průběhu laktace statisticky významně klesají na hladině významnosti 5% mezi obdobími 1–2 / 5–6 a 1–2 / 9–12 měsíců od porodu. Koncentrace vitamínů a hodnoty statistických významností porovnávaných období shrnuje Tabulka 21.

Měsíce od porodu	1–2	3–4	5–6	9–12
Retinol c±SD ^a (μmol/l)	1,55±1,04	1,11±0,87	0,77±0,36	0,60±0,36
t-test párový (p ^b)		0,432591	0,037633	0,010787
α-Tokoferol c±SD (μmol/l) ^a	9,19±3,26	8,72±3,89	8,41±3,54	9,25±3,05
t-test párový (p ^b)		0,724082	0,666137	0,504903

Tabulka 21: Změny koncentrace retinolu a α-tokoferolu v závislosti na měsíci laktace

^a koncentrace měřených vitamínů ± směrodatná odchylka (n = 12)

^b statistické hodnocení

7.7 Závěr

Příprava vzorku pro stanovení retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce zahrnovala deproteinaci, saponifikaci a extrakci. Optimalizovaný postup byl validován podle požadavků FDA [150]. Kompletní příprava 10 vzorků před chromatografickým stanovením trvá asi 90 minut, vyžaduje pouze minimální laboratorní vybavení.

Validovaná metoda byla použita k extrakci vitamínů ze vzorků mateřského mléka určených k testování hladin vitamínů v průběhu laktace. Ze závěrů statistického hodnocení vyplývá, že koncentrace retinolu v průběhu laktace statisticky významně klesá na hladině významnosti 5% mezi obdobími 1–2 / 5–6 a 1–2 / 9–12 měsíců od porodu.

Extrakční metoda je vhodná pro testování mateřského mléka v mléčné bance, která dodává mléko pro novorozence, kteří nemohou být kojeni. Stanovení vitamínů umožní podávat mléko s optimálními koncentracemi retinolu a α -tokoferolu podle požadavků konkrétního novorozence, případně výživu doplnit vhodnou suplementací.

Validace metody přípravy vzorku a výsledky statistického hodnocení koncentrací retinolu a α -tokoferolu v průběhu laktace byly publikovány v roce 2012 v časopise Talanta [154].

8 Seznam použitých zkratek

AOAC	Association of Analytical Communities International viz web http://www.aoac.org/about/aoac.htm
CLIA	chemiluminescence immunoassay (chemiluminiscenční imunoanalýza)
CMIA	chemiluminescent microparticle immunoassay (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích)
CPBA	competitive protein binding assay (metoda kompetitivní vazby na protein)
CRM	certifikovaný referenční materiál
DBP	vitamin D-binding protein (protein vázající vitamín D)
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay (elektrochemiluminiscenční imunoanalýza)
EHK	externí hodnocení kvality
EQA	External Quality Assessment (Externí hodnocení kvality)
GC	gas chromatography (plynová chromatografie)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
LC	liquid chromatography (kapalinová chromatografie)
LDL	low density lipoprotein (lipoprotein o nízké hustotě)
LLE	liquid-liquid extraction (extrakce z kapaliny do kapaliny)
log P	rozdělovací koeficient
NIST	National Institute of Standards and Technology

PTH	parathormon
RA	retinoic acid (kyselina retinová)
RAR	retinoic acid receptor (receptor pro retinovou kyselinu)
RBP	retinol-binding protein (protein vázající retinol)
RCF	relative centrifugation force (relativní centrifugační síla)
RLU	relative light units (relativní světelné jednotky)
RXR	retinoid „x“ receptor (retinový receptor)
SFC	supercritical-fluid chromatography (superkritická fluidní chromatografie)
SFE	supercritical fluid extraction (superkritická fluidní extrakce)
SPE	solid phase extraction (extrakce na pevnou fázi)
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography (ultra účinná kapalinová chromatografie)
VLDL	very low density lipoprotein (lipoprotein o velmi nízké hustotě)

10 Seznam literatury:

- [1] G.F. Combs, The vitamins : fundamental aspects in nutrition and health, 3rd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston, 2008.
- [2] D.A. Bender, Nutritional biochemistry of the vitamins, 2nd ed. ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2003.
- [3] W.P. Herrmann, R. Obeid, Vitamins in the prevention of human diseases, Walter de Gruyter, Berlin, 2011.
- [4] D.A. Skoog, Fundamentals of analytical chemistry, 8. ed., Brooks/Cole-Thomson Learning, Belmont, 2004.
- [5] H.J. Issaq, A century of separation science, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [6] J.M. Miller, Chromatography : concepts and contrasts, 2nd ed., Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., 2005.
- [7] B. Ravindranath, Principles and practice of chromatography, Ellis Horwood, 1989.
- [8] H. Rotzsche, Stationary phases in gas chromatography, Elsevier, Amsterdam ; Oxford, 1991.
- [9] M. Caban, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, N. Migowska, J. Kumirska, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 8110-8122.
- [10] M.R. Meyer, J. Welter, A.A. Weber, H.H. Maurer, Therapeutic Drug Monitoring, 33 (2011) 649-653.
- [11] F. Bravo, D. Gonzalez, J. Benites, Journal of the Chilean Chemical Society, 56 (2011) 799-802.
- [12] T. Kumazawa, C. Hasegawa, K. Hara, S. Uchigasaki, X.P. Lee, H. Seno, O. Suzuki, K. Sato, J. Sep. Sci., 35 (2012) 726-733.
- [13] J. Martens, Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, 673 (1995) 183-188.
- [14] H. Hattori, S. Yamamoto, M. Iwata, E. Takashima, T. Yamada, O. Suzuki, Journal of Chromatography-Biomedical Applications, 581 (1992) 213-218.
- [15] J.H. Knox, M. Saleem, Journal of Chromatographic Science, 7 (1969) 614-622.
- [16] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Sep. Sci., 29 (2006) 1836-1848.
- [17] A.D. Jerkovich, J.S. Mellors, J.W. Jorgenson, Lc Gc Europe, 16 (2003) 20-23.
- [18] F. Švec, Chem. listy, (2009) 266-270.

- [19] P. Olszowy, M. Szultka, J. Nowaczyk, B. Buszewski, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (2011) 2542-2548.
- [20] R. Fernandez-Torres, M.O. Consentino, M.A.B. Lopez, M.C. Mochon, *Talanta*, 81 (2010) 871-880.
- [21] F. Xuereb, J.B. Gordien, S. Mosnier-Thoumas, R. Legeron, J.M. Bernadou, M.C. Saux, D. Breilh, *International Journal of Clinical Pharmacy*, 33 (2011) 463-464.
- [22] M. Milisci, K. Tantillo, P. Amorusi, S. Tse, A. Int Symp Lab, Robot, Automation of extraction procedures for Zaleplon (a sedative/hypnotic agent) and various metabolites in biological fluids using the ASTED (automated sequential trace enrichment of dialysates sample processor coupled to HPLC, 1997.
- [23] P.A. Baranov, S.A. Appolonova, G.M. Rodchenkov, *Drug Testing and Analysis*, 2 (2010) 475-488.
- [24] A.K. Mallik, K. Shingo, U.G. Gautam, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 623-629.
- [25] C. Shackleton, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121 (2010) 481-490.
- [26] J.E. Celis, R. Bravo, *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins : methods and applications*, Academic Press, New York, 1984.
- [27] P. Jones, *Gel electrophoresis : nucleic acids*, Wiley, Chichester, 1995.
- [28] G.P. Manchenko, *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, 2nd ed. ed., CRC, Boca Raton, Fla. ; London, 2003.
- [29] K. Wilson, J.M. Walker, *Principles and techniques of practical biochemistry*, 5th ed., Cambridge University Press, Cambridge ; New York, 2000.
- [30] N.J.K. Simpson, *Solid-phase extraction : principles, techniques, and applications*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [31] S. Dusilova Sulkova, *Vnitr Lek*, 57 (2011) 620-625.
- [32] D. Sobotova, A. Zharfbin, M. Neobalkova, J. Svojanovsky, M. Soucek, *Vnitr Lek*, 53 (2007) 841-851.
- [33] A.G. Need, H.A. Morris, M. Horowitz, B.E.C. Nordin, *American Journal of Clinical Nutrition*, 58 (1993) 882-885.
- [34] M.F. Holick, *N Engl J Med*, 357 (2007) 266-281.
- [35] A. Levin, Y.C. Li, *Kidney Int*, 68 (2005) 1973-1981.
- [36] H. Dobnig, S. Pilz, H. Scharnagl, W. Renner, U. Seelhorst, B. Wellnitz, J. Kinkeldei, B.O. Boehm, G. Wehrauch, W. Maerz, *Arch Intern Med*, 168 (2008) 1340-1349.

- [37] E. Giovannucci, Y. Liu, B.W. Hollis, E.B. Rimm, *Arch Intern Med*, 168 (2008) 1174-1180.
- [38] C.M. Peregrin, F.L. Rodriguez, M.D.C. Castellano, *Med. Clin.*, 138 (2012) 397-401.
- [39] A. Vaidya, J.P. Forman, *Curr. Hypertens. Rep.*, 14 (2012) 111-119.
- [40] A.G. Pittas, J. Lau, F.B. Hu, B. Dawson-Hughes, *J Clin Endocrinol Metab*, 92 (2007) 2017-2029.
- [41] E. Hypponen, E. Laara, A. Reunanen, M.R. Jarvelin, S.M. Virtanen, *Lancet*, 358 (2001) 1500-1503.
- [42] B.D. Benoist, J. Martines, T. Goodman, *Food Nutr Bull*, 22 (2001) 213–245.
- [43] E. Gitto, S. Pellegrino, P. Gitto, I. Barberi, R.J. Reiter, *J Pineal Res*, 46 (2009) 128-139.
- [44] B.A. Darlow, P.J. Graham, *Cochrane Database Syst Rev*, (2007) CD000501.
- [45] C.B. Stephensen, *Annu Rev Nutr*, 21 (2001) 167-192.
- [46] R.D. Semba, *Clin Infect Dis*, 19 (1994) 489-499.
- [47] S.J. Weinstein, R.Z. Stolzenberg-Solomon, W. Kopp, H. Rager, J. Virtamo, D. Albanes, *Cancer Res.*, 72 (2012) 1190-1198.
- [48] S. Tretli, G.G. Schwartz, P.A. Torjesen, T.E. Røsbjerg, *Cancer Causes & Control*, 23 (2012) 363-370.
- [49] R.K. Murray, H.A. Harper, *Harper's Biochemistry*, 23rd ed ed., Prentice-Hall International, London, 1993.
- [50] H.J. Kayden, M.G. Traber, *Journal of Lipid Research*, 34 (1993) 343-358.
- [51] P. Borel, J. Drai, H. Faure, V. Fayol, C. Galabert, M. Laromiguiere, G. Le Moel, *Ann. Biol. Clin.*, 63 (2005) 165-177.
- [52] D.D. Bikle, E. Gee, B. Halloran, M.A. Kowalski, E. Ryzen, J.G. Haddad, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63 (1986) 954-959.
- [53] P.M. Brannon, E.A. Yetley, R.L. Bailey, M.F. Picciano, *Am J Clin Nutr*, 88 (2008) 587S-592S.
- [54] H.J. van Hoof, L.M. Swinkels, J.J. van Stevenhagen, H. van den Berg, H.A. Ross, T.J. Benraad, *J Chromatogr*, 621 (1993) 33-39.
- [55] A.P. De Leenheer, V.O. De Bevere, A.A. Cruyl, A.E. Claeys, *Clin Chem*, 24 (1978) 585-590.
- [56] D.B. Milne, J. Botnen, *Clin Chem*, 32 (1986) 874-876.

- [57] B.L. Lee, S.C. Chua, H.Y. Ong, C.N. Ong, *J Chromatogr*, 581 (1992) 41-47.
- [58] S. Gueguen, B. Herbeth, G. Siest, P. Leroy, *J Chromatogr Sci*, 40 (2002) 69-76.
- [59] H.J. Nelis, J. De Roose, H. Vandenbaviere, A.P. De Leenheer, *Clin Chem*, 29 (1983) 1431-1434.
- [60] J. Arnaud, I. Fortis, S. Blachier, D. Kia, A. Favier, *J Chromatogr*, 572 (1991) 103-116.
- [61] G. Cavina, B. Gallinella, R. Porra, P. Pecora, C. Suraci, *J Pharm Biomed Anal*, 6 (1988) 259-269.
- [62] F. Risco, M. Babe, M.L. Traba, *Clin Chem*, 33 (1987) 720.
- [63] P.F. Chatzimichalakis, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 805 (2004) 289-296.
- [64] S.P. Yap, T. Julianto, J.W. Wong, K.H. Yuen, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 735 (1999) 279-283.
- [65] A. Sanchez-Perez, M.M. Delgado-Zamarreno, M. Bustamante-Rangel, J. Hernandez-Mendez, *J Chromatogr A*, 881 (2000) 229-241.
- [66] U. Turpeinen, U. Hohenthal, U.H. Stenman, *Clin Chem*, 49 (2003) 1521-1524.
- [67] J.A. Eisman, R.M. Shepard, H.F. Deluca, *Analytical Biochemistry*, 80 (1977) 298-305.
- [68] R. Kand'ar, P. Zakova, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 2953-2957.
- [69] D.P. Jamieson, A. Zhang, J. Mathieu, R. Ray, D.G. Kelling, T.C. Chen, M.F. Holick, *Journal of Bone and Mineral Research*, 20 (2005) S188-S188.
- [70] M. Vogeser, A. Kyriatsoulis, E. Huber, U. Kobold, *Clin Chem*, 50 (2004) 1415-1417.
- [71] Z. Maunsell, D.J. Wright, S.J. Rainbow, *Clin Chem*, 51 (2005) 1683-1690.
- [72] A.K. Saenger, T.J. Laha, D.E. Bremner, S.M.H. Sadrzadeh, *American Journal of Clinical Pathology*, 125 (2006) 914-920.
- [73] H. Chen, L.F. McCoy, R.L. Schleicher, C.M. Pfeiffer, *Clin Chim Acta*, 391 (2008) 6-12.
- [74] S. Knox, J. Harris, L. Calton, A.M. Wallace, *Ann Clin Biochem*, 46 (2009) 226-230.
- [75] J.M. Mata-Granados, J.M.Q. Gomez, M.D.L. de Castro, *Clin. Chim. Acta*, 403 (2009) 126-130.
- [76] J.M. Mata-Granados, J. Vargas-Vasserot, C. Ferreira-Vera, M.D. Luque de Castro, R.G. Pavon, J.M. Quesada Gomez, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 121 (2010) 452-455.
- [77] J.G. Haddad, K.J. Chyu, *J Clin Endocrinol Metab*, 33 (1971) 992-995.

- [78] R. Bouillon, E. Van Herck, I. Jans, B.K. Tan, H. Van Baelen, P. De Moor, Clin Chem, 30 (1984) 1731-1736.
- [79] C. Lind, J.W. Chen, I. Byrjalsen, Clin. Chem., 43 (1997) 943-949.
- [80] W.D. Fraser, B.H. Durham, J.L. Berry, E.B. Mawer, Ann. Clin. Biochem., 34 (1997) 632-637.
- [81] B.W. Hollis, J. Clin. Endocrinol. Metab., 89 (2004) 3149-3151.
- [82] S.J. Ding, I. Schoenmakers, K. Jones, A. Koulman, A. Prentice, D.A. Volmer, Anal. Bioanal. Chem., 398 (2010) 779-789.
- [83] M.R. Brunetto, M.A. Obando, M. Gallignani, O.M. Alarcon, E. Nieto, R. Salinas, J.L. Burguera, M. Burguera, Talanta, 64 (2004) 1364-1370.
- [84] M. Vogeser, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 121 (2010) 565-573.
- [85] MSMS Vitamin D Kit (not available in the USA) | PerkinElmer
- [86] Recipe. Clinical Diagnostics with HPLC and LC-MS/MS [on-line]. Dostupný z: <http://www.recipe.de/en/products.html> [citováno 7. 6. 2013].
- [87] Immunodiagnostic. Kits / Assays (HPLC, LC-MS/MS) [on-line]. Dostupný z: <http://www.immundiagnostik.com/en/home/products/kits-assays/hplc-applications.html> [citováno 7. 6. 2013].
- [88] Chromsystems. Vitamin D3/D2 – Crosslinks [on-line]. Dostupný z: http://chromsystems.com/en/search_results_products?keyword=vitamin+D&mode=0 [citováno 7. 7. 2013].
- [89] D. Wagner, H.E.C. Hanwell, R. Vieth, Clinical Biochemistry, 42 (2009) 1549-1556.
- [90] Roche Diagnostics. Vitamin D total [on-line]. Dostupný z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/05894913p.pdf> [citováno 30. 10. 2012].
- [91] Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Development of the ADVIA Centaur Vitamin D Total Assay [on-line]. Dostupný z: http://www.medical.siemens.com/siemens/en_GLOBAL/gg_diag_FBAs/files/products_diseases_states/bone_metabolism/Development_of_the_ADVIA_Centaur_Vitamin_D_Total_Assay.pdf [citováno 31. 10. 2012].
- [92] Immunodiagnostic. IDS-iSYS 25-hydroxy Vitamin D [on-line]. Dostupný z: <http://www.idsplc.com/en-gb/products/ids-isys-25-hydroxy-vitamin-d-is-2700#details>. [citováno 7.6.2013].
- [93] Immunodiagnostic. IDS-iSYS 1,25-dihydroxy Vitamin D [on-line]. Dostupný z: <http://www.idsplc.com/en-gb/products/ids-isys-125-dihydroxy-vitamin-d-is-2400>. [citováno 7.6.2013].

- [94] E.A. Yetley, C.M. Pfeiffer, R.L. Schleicher, K.W. Phinney, D.A. Lacher, S. Christakos, J.H. Eckfeldt, J.C. Fleet, G. Howard, A.N. Hoofnagle, S.L. Hui, G.L. Lensmeyer, J. Massaro, M. Peacock, B. Rosner, D. Wiebe, R.L. Bailey, P.M. Coates, A.C. Looker, C. Sempos, C.L. Johnson, M.F. Picciano, *J Nutr*, 140 (2010) 2030S-2045S.
- [95] L. Ong, S. Saw, N.B. Sahabdeen, K.T. Tey, C.S. Ho, S.K. Sethi, *Clin. Chim. Acta*, 413 (2012) 1127-1134.
- [96] I. Spiliotis, T. Kelley, C. Barker, K. Achaibar, *QJM-An Int. J. Med.*, 105 (2012) 593-593.
- [97] R.L. Schleicher, S.E. Encisco, M. Chaudhary-Webb, E. Paliakov, L.F. McCoy, C.M. Pfeiffer, *Clin Chim Acta*, 412 (2011) 1594-1599.
- [98] M.F. Holick, N.C. Binkley, H.A. Bischoff-Ferrari, C.M. Gordon, D.A. Hanley, R.P. Heaney, M.H. Murad, C.M. Weaver, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 96 (2011) 3908-3908.
- [99] L.D.W. Arnold, *Human milk in the NICU : policy into practice*, Jones and Bartlett, Boston, Mass., 2010.
- [100] G. Buonocore, S. Perrone, M. Longini, P. Vezzosi, B. Marzocchi, P. Paffetti, R. Bracci, *Pediatr Res*, 52 (2002) 46-49.
- [101] O.M. Pitkänen, M. Hallman, *Seminars in Neonatology*, 3 (1998) 199-205.
- [102] A. Ledo, A. Arduini, M.A. Asensi, J. Sastre, R. Escrig, M. Brugada, M. Aguar, P. Saenz, M. Vento, *Am J Clin Nutr*, 89 (2009) 210-215.
- [103] O.D. Saugstad, *Biol Neonate*, 88 (2005) 228-236.
- [104] S.E. Welty, *J. Nutr.*, 131 (2001) 947S-950S.
- [105] J.K. Friel, S.M. Martin, M. Langdon, G.R. Herzberg, G.R. Buettner, *Pediatr Res*, 51 (2002) 612-618.
- [106] J.M. Davis, R.L. Auten, *Semin Fetal Neonatal Med*, 15 (2010) 191-195.
- [107] R.G. Jensen, *Handbook of milk composition*, Academic Press, San Diego ; London, 1995.
- [108] R.A. Ehrenkranz, B.A. Ackerman, C.M. Nelli, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 3 (1984) 755-758.
- [109] J. Bitman, D.L. Wood, N.R. Mehta, P. Hamosh, M. Hamosh, *Am J Clin Nutr*, 40 (1984) 1103-1119.
- [110] D. Mandel, R. Lubetzky, S. Dollberg, S. Barak, F.B. Mimouni, *Pediatrics*, 116 (2005) e432-435.
- [111] A. Sala-Vila, A.I. Castellote, M. Rodriguez-Palmero, C. Campoy, M.C. Lopez-Sabater, *Nutrition*, 21 (2005) 467-473.

- [112] B. Lonnerdal, *Am J Clin Nutr*, 77 (2003) 1537S-1543S.
- [113] C.L.S. Lopez, A. Hernandez, A.B. Rodriguez, M. Rivero, C. Barriga, J. Cubero, *Nutr. Hosp.*, 26 (2011) 511-514.
- [114] R. Jenness, *Semin Perinatol*, 3 (1979) 225-239.
- [115] A.C. Goedhart, J.G. Bindels, *Nutr Res Rev*, 7 (1994) 1-23.
- [116] J.B. Miller, S. Bull, J. Miller, P. McVeagh, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 19 (1994) 371-376.
- [117] G.V. Coppa, O. Gabrielli, P. Pierani, C. Catassi, A. Carlucci, P.L. Giorgi, *Pediatrics*, 91 (1993) 637-641.
- [118] D.B. Shennan, M. Peaker, *Physiol Rev*, 80 (2000) 925-951.
- [119] J.L. McManaman, M.C. Neville, *Adv Drug Deliv Rev*, 55 (2003) 629-641.
- [120] A. Antonakou, A. Chiou, N.K. Andrikopoulos, C. Bakoula, A.L. Matalas, *Eur. J. Nutr.*, 50 (2011) 195-202.
- [121] I. Sziklai-Laszlo, D. Majchrzak, I. Elmadfa, M.A. Cser, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 279 (2009) 585-590.
- [122] A. Antonakou, A. Chiou, N.K. Andrikopoulos, C. Bakoula, A.L. Matalas, *Eur J Nutr*, 50 (2011) 195-202.
- [123] O. Tokusoglu, N. Tansug, S. Aksit, G. Dinc, E. Kasirga, C. Ozcan, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59 (2008) 166-174.
- [124] A.L. Webb, S. Aboud, J. Furtado, C. Murrin, H. Campos, W.W. Fawzi, E. Villamor, *European Journal of Clinical Nutrition*, 63 (2009) 332-339.
- [125] L. Garcia, K. Ribeiro, K. Araujo, J. Pires, G. Azevedo, R. Dimenstein, *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 23 (2010) 529-534.
- [126] R. Dimenstein, J.C.D. Dantas, A.C.P. Medeiros, L.R.D. Cunha, *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 60 (2010) 235-239.
- [127] L.M. Canfield, M.T. Clandinin, D.P. Davies, M.C. Fernandez, J. Jackson, J. Hawkes, W.J. Goldman, K. Pramuk, H. Reyes, B. Sablan, T. Sonobe, X. Bo, *Eur. J. Nutr.*, 42 (2003) 133-141.
- [128] M.L. Quaife, *Journal of Biological Chemistry*, 169 (1947) 513-514.
- [129] T. Turner, B.J. Burri, *Chromatographia*, 75 (2012) 241-252.
- [130] F.J. Ruperez, D. Martin, E. Herrera, C. Barbas, *J. Chromatogr. A*, 935 (2001) 45-69.

- [131] S. Albala-Hurtado, S. Novella-Rodriguez, M.T. Veciana-Nogues, A. Marine-Font, *J Chromatogr A*, 778 (1997) 243-246.
- [132] G.B. Brubacher, D.A.T. Southgate, W. Müller-Mulot, European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (Organization), *Methods for the determination of vitamins in food, recommended by COST 91*, Elsevier Applied Science Publishers, London ; New York, 1985.
- [133] A. Escriva, M.J. Esteve, R. Farre, A. Frigola, *J Chromatogr A*, 947 (2002) 313-318.
- [134] M. Strobel, F. Heinrich, H.K. Biesalski, *J Chromatogr A*, 898 (2000) 179-183.
- [135] L.B. Thompson, K.J. Schimpf, L.A. Stiner, D.J. Schmitz, *J. AOAC Int.*, 93 (2010) 1523-1529.
- [136] C.J. Blake, *J. AOAC Int.*, 90 (2007) 897-910.
- [137] Y. Liu, M.J. Xu, L.M. Canfield, *J. Nutr. Biochem.*, 9 (1998) 178-183.
- [138] C. Turner, J.W. King, L. Mathiasson, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 553-558.
- [139] M.M. Delgado Zamarreno, A. Sanchez Perez, M.C. Gomez Perez, M.A. Fernandez Moro, J. Hernandez Mendez, *Analyst*, 120 (1995) 2489-2492.
- [140] J.N. Thompson, G. Hatina, W.B. Maxwell, *J Assoc Off Anal Chem*, 63 (1980) 894-898.
- [141] H. Berg, C. Turner, L. Dahlberg, L. Mathiasson, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 43 (2000) 391-401.
- [142] A. Khan, M.I. Khan, Z. Iqbal, Y. Shah, L. Ahmad, D.G. Watson, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878 (2010) 2339-2347.
- [143] B. Chauveau-Duriot, M. Doreau, P. Noziere, B. Graulet, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 777-790.
- [144] D. Siluk, R.V. Oliveira, M. Esther-Rodriguez-Rosas, S. Ling, A. Bos, L. Ferrucci, I.W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44 (2007) 1001-1007.
- [145] M. Kuhn, S. Nakib, J.P. De Bandt, L. Cynober, C. Loi, *J Chromatogr A*, 1205 (2008) 186-190.
- [146] L.B. Thompson, K.J. Schimpf, L.A. Stiner, D.J. Schmitz, *J AOAC Int*, 93 (2010) 1523-1529.
- [147] J.W. DeVries, K.R. Silvera, E. McSherry, D. Dowell, *J AOAC Int*, 95 (2012) 322-328.
- [148] B. Gleize, M. Steib, M. Andre, E. Reboul, *Food Chem*, 134 (2012) 2560-2564.

- [149] L. Gamiz-Gracia, A. Velasco-Arjona, M.D. Luque de Castro, *Analyst*, 124 (1999) 801-804.
- [150] D.M. Bliesner, *Validating chromatographic methods : a practical guide*, Wiley, Hoboken, N.J., 2006.
- [151] World Health Organization Dept. of Medicines Policy and Standards. The international pharmacopoeia [on-line]. Dostupný z: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> [citováno 25. 6. 2013].
- [152] L. Urbanek, L. Krcmova, D. Solichova, B. Melichar, V. Opletalova, P. Solich, *J Sep Sci*, 29 (2006) 2485-2493.
- [153] L. Krcmova, D. Solichova, J. Plisek, M. Kasparova, L. Sobotka, P. Solich, *Intern J Environ Anal Chem*, 90 (2010) 106-114.
- [154] M. Kasparova, J. Plisek, D. Solichova, L. Krcmova, B. Kucerova, M. Hronek, P. Solich, *Talanta*, 93 (2012) 147-152.

11 Přehled publikační činnosti

Uvedené publikace jsou seřazeny sestupně podle data vydání. Uvedena je citovanost podle Web of Science z 1. 7. 2013 a IF časopisu. Seznam publikací je rozdělen na „Publikace s podílem na analytické části“ a „Ostatní publikace“. Rozdělení bylo provedeno na základě výsledků a závěrů, které se vztahují k předkládané disertační práci.

11.1 Publikace s podílem na analytické části

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

M. Kasparova, J. Plisek, D. Solichova, L. Krcmova, B. Kucerova, M. Hronek and P. Solich
Talanta, 93, 147-152, 2012 (Citováno–1, IF₂₀₁₂–3,498)

2. Carotid Intima-media Thickness and Laboratory Parameters of Atherosclerosis Risk in Patients with Breast Cancer

B. Melichar, H. Kalabova, L. Ungermann, L. Krcmova, R. Hyspler, M. Kasparova, M. Pecka, V. Sramek, H. Prochazkova-Studentova, A. Svobodnfk, L. Pecen and D. Solichova
Anticancer Research, 32, 9, 4077-4084, 2012 (Citováno–0, IF₂₀₁₂–1,713)

3. Separation of Vitamins Retinol Acetate, Ergocalciferol, or Cholecalciferol and Tocopherol Acetate Using Sequential Injection Chromatography

H. Sklenarova, P. Koblova, P. Chocholous, D. Satinsky, L. Krcmova, M. Kasparova, D. Solichova and P. Solich
Analytical Letters, 44, 1-3, 446-456, 2011 (Citováno–2, IF₂₀₁₁–1,016)

4. Urinary Neopterin, Serum Retinol, alpha-tocopherol and Homocysteine in Breast Cancer Patients During Treatment with Bevacizumab and Chemotherapy

B. Melichar, H. Kalabova, L. Krcmova, M. Kasparova, J. Plisek, R. Hyspler, H. Studentova, M. Zezulova, P. Holeckova, M. Pecka and D. Solichova
Pteridines, 21, 4, 87-93, 2010 (Citováno–1, IF₂₀₁₀–0,404)

5. Intestinal permeability, vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib

B. Melichar, J. Dvorak, H. Kalabova, R. Hyspler, L. Krcmova, M. Kasparova, L. Urbanek and D. Solichova

Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 70, 3, 180-187, 2010 (Citováno–3, IF2010–1,629)

6. Serum Homocysteine, Cholesterol, Retinol, alpha-Tocopherol, Glycosylated Hemoglobin and Inflammatory Response during Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, 5-Fluorouracil and Leucovorin

B. Melichar, H. Kalabova, L. Krcmova, M. Kasparova, E. Malirova, K. Melicharova, M. Pecka, R. Hyspler and D. Solichova

Anticancer Research, 29, 11, 4813-4820, 2009 (Citováno–4, IF₂₀₀₉–1,428)

7. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy

L. Krcmova, L. Urbanek, D. Solichova, M. Kasparova, H. Vlckova, B. Melichar, L. Sobotka and P. Solich

Journal of Separation Science, 32, 15-16, 2804-2811, 2009 (Citováno–6, IF₂₀₀₉–2,551)

8. Serum Neopterin, Retinol and Alpha-tocopherol in Patients with the Carcinoma of the Esophagus

J. Cincibuch, B. Melichar, H. Studentova, M. Kapustova, E. Malirova, D. Solichova, L. Krcmova, M. Kasparova, P. Schneiderka, J. Juranova, V. Sramek and K. Cwiertka

Pteridines, 20, 2, 49-53, 2009 (Citováno–1, IF₂₀₀₉–0,379)

9. The importance of rheological parameters in the therapy of microcirculatory disorders

M. Blaha, E. Rencova, V. Blaha, R. Maly, M. Blazek, J. Studnicka, C. Andrys, I. Fatorova, S. Filip, M. Kasparova, R. Prochazkova, J. Maly, R. Zimova and H. Langrova

Clinical Hemorheology and Microcirculation, 42, 1, 37-46, 2009, (Citováno–14, IF₂₀₀₉–1,780)

11.2 Ostatní publikace

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

J. Plisek, M. Kasparova, D. Solichova, L. Krcmova, B. Kucerova, L. Sobotka and P. Solich
Talanta, 107, 382-388, 2013 (Citováno=0, IF₂₀₁₂=3,498)

2. Prognostic Significance of Serum Retinol, Serum Alpha-Tocopherol, and Urinary Neopterin in Patients with Head and Neck Carcinoma Treated with External Beam Radiation

P. Holeckova, L. Krcmova, H. Kalabova, M. Kasparova, J. Plisek, M. Pala, P. Vitek, D. Solichova, M. Zedulova, H. Studentova and B. Melichar
International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 82, 2, 77-84, 2012 (Citováno=0, IF₂₀₁₂=1,271)

3. Intima-media thickness, myocardial perfusion and laboratory risk factors of atherosclerosis in patients with breast cancer treated with anthracycline-based chemotherapy

H. Kalabova, B. Melichar, L. Ungermann, J. Dolezal, L. Krcmova, M. Kasparova, J. Plisek, R. Hyspler, M. Pecka and D. Solichova
Medical Oncology, 28, 4, 1281-1287, 2011 (Citováno=3, IF₂₀₁₁=2,140)

4. Correlation of Peripheral Blood CD14(+)CD16(+)Monocytes, Urinary Neopterin and the Risk Factors of Atherosclerosis in Patients with Breast Carcinoma

P. Kralickova, H. Kalabova, L. Krcmova, M. Kasparova, J. Plisek, L. Ungermann, D. Vokurkova, R. Hyspler, M. Pecka, V. Sramek, H. Studentova, M. Zedulova, D. Solichova and B. Melichar
Pteridines, 22, 3, 66-72, 2011 (Citováno=3, IF₂₀₁₁=0,444)

5. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC

L. Krcmova, D. Solichova, B. Melichar, M. Kasparova, J. Plisek, L. Sobotka and P. Solich
Talanta, 85, 3, 1466-1471, 2011 (Citováno=3, IF₂₀₁₁=3,794)

6. Urinary Neopterin in Patients with Metastatic Colon Cancer Treated with Patupilone

B. Melichar, H. Kalabova, L. Krcmova, M. Kasparova, J. Plisek, J. Cerman, P. Holeckova and D. Solichova

Pteridines, 22, 3, 61-65, 2011 (Citováno–3, IF₂₀₁₁–0,444)

7. Intestinal permeability, vitamin A absorption, alpha-tocopherol, and neopterin in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation

J. Dvorak, B. Melichar, R. Hyspler, L. Krcmova, L. Urbanek, H. Kalabova, M. Kasparova and D. Solichova

Medical Oncology, 27, 3, 690-696, 2010 (Citováno–1, IF₂₀₁₀–2,210)

11.3 Přehled odborných sdělení

Uvedená jsou pouze odborná sdělení s aktivní účastí na prezentaci a s hlavním autorstvím. Uspořádány jsou sestupně podle data prezentace.

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

Kasparova M., Plisek J., Kucerova B., Krcmova L., Matysova L., Havlikova L., Solichova D., The Nordic Separation Science Society 6th Conference (NoSSS 2011), Riga, Latvia, 24. – 27. 8. 2011 (poster)

2. Using of separation method for clinical research

Kasparova M., Plisek J., Solich P., Solichova D.

1. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové, Česká republika, 1. - 2. 2. 2011 (prezentace)

3. Rapid Vitamin A and E sample preparation and liquid chromatography quantification procedure for human breast milk investigation

Marketa Kasparova, Jiri Plisek, Lenka Krcmova, Miroslav Hronek, Zdenek Zadak, Dagmar Solichova

28th International Symposium on Chromatography 2010, Valencia, Spain, 12.9. – 16.9.2010 (poster)

4. Combination of solid phase extraction, monolithic technology and miniaturisation advantages for fast determination of serum vitamins D2, D3, 25(OH)D3, retinol and α -tocopherol.

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

The 6th International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Athens, Greece, 4.10.-8.10.2009 (poster)

5. Sequential injection procedure for determination of organic mercury compounds by using gene modified bacteria.

Kašparová M., Ek P., Virta M., Solich P., Ivaska A.

Flow Analysis XI.; Pollensa, Spain, 14. - 18. 9. 2009 (poster)

6. Advantageous coupling of sequential injection analysis and bacterial sensor in mercury determination procedure.

Kašparová M., Ek P., Virta M., Solich P., Ivaska A.

Åbo Akademi Process Chemistry Centre Annual Meeting 2009; Turku, Finland, 20. 8. 2009 (poster, ústní prezentace – „Oral poster introduction“)

7. 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.

6th Aegean analytical chemistry days; Denizli, Turkey, 9. - 12. 10. 2008 (poster)

8. 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.

8th International conference VITAMINS 2008: Nutrition and Diagnostics; Zlín, 9. - 11. 9. 2008 (poster)

9. 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.

International conference "Oxidative stress in diseases"; Bratislava, 23. - 25. 4. 2008 (poster, ústní prezentace v sekci "Oral poster presentations by young scientists")

12 Řešené granty

Člen řešitelského kolektivu výzkumného záměru MZO 00179906 (dílčí úkol 9810): Nové diagnostické indikátory a léčebné postupy v závislosti na různých obdobích života s důrazem na stáří. - odborný pracovník v laboratorních metodách

Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NS/9743-4 (2009–2011): Patogeneze malnutrice při renálním selhání a vliv léčebné intervence - odborný pracovník v laboratorních metodách

Řešitel grantu FRVŠ - projekt 575/2009 Porovnání vnitřní a vnější standardizace při HPLC stanovení vitamínů A, E v biologickém materiálu-jako úloha pro praktická cvičení.

Spoluřešitel grantu GAUK 88407/2009 (2007–2009) Aplikace nových technologií v kapalinové chromatografii (HPLC) pro využití v klinickém výzkumu a praxi.

Člen řešitelského kolektivu grantu IGA MZ ČR NR/9096-4 (2005–2009): Rizikové faktory aterosklerózy u nemocných s nádorovým onemocněním - odborný pracovník v laboratorních metodách

13 Přílohy – publikace s podílem na analytické části

Přílohy 13.1 až 13.9 obsahují publikace „s podílem na analytické části“ Jejich seznam je uveden v kapitole 11.1., řazeny jsou sestupně podle data vydání.

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

M. Kasparova, J. Plisek, D. Solichova, L. Krcmova, B. Kucerova, M. Hronek and P. Solich

Talanta, 93, 147-152, 2012 (Citováno–1, IF–3,498)



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2011

Received in revised form 27 January 2012

Accepted 31 January 2012

Available online 7 February 2012

Keywords:

Human breast milk

Retinol

α -Tocopherol

LLE

Sample preparation

Monolithic column

ABSTRACT

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

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

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

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

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

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

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

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

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

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

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

2.2. Instrumentation

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

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

2.3. Sample pretreatment

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

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

2.4. HPLC determination

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

Table 1
Selection of the optimal deproteinization reagent.

Deproteinization reagent	Retinol $c \pm SD^a$ ($\mu\text{mol/L}$)	α -Tocopherol $c \pm SD^a$ ($\mu\text{mol/L}$)
Acetonitrile	0.9 ± 0.2	12 ± 0.5
Methanol	1.8 ± 0.1	23 ± 1.0
Ethanol	2.3 ± 0.1	22 ± 0.4

^a Measured concentration of vitamins \pm standard deviation ($n = 3$).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of sample preparation procedure

Presented sample preparation procedure refers to human breast milk contents and was designed to reflect wide range of individual concentration differences. The preparation procedure consists of deproteinization, saponification and liquid–liquid extraction steps. All procedure steps were carried out in one screw top glass tube to minimized losses in extraction process and maximized recovery of determined vitamins.

3.1.1. Selection of deproteinization reagent

Concentrations of α -tocopherol were not significantly influenced by alcoholic deproteinization reagents (methanol and ethanol) while measured levels of retinol were significantly variant. According to these results (Table 1) acetonitrile was assessed as unsuitable contrary to the ethanol, which was selected as the appropriate deproteinization reagent.

3.1.2. Optimization of saponification conditions

Potassium hydroxide solution (KOH) was chosen to remove lipids from the sample. Influence of increasing concentration (5, 10 or 15 mol/L) was tested. The addition of an antioxidant (ascorbic acid, 0.1 mol/L, 1 mL) was employed to protect vitamins against oxidation during the saponification, 1 mL of ethanol was used for deproteinization. Samples were saponified by different concentrations of KOH (1 mL), the mixtures were heated for 30 min at 80 °C. The extraction preceded the same manner as already mentioned.

The optimal concentration of KOH was selected in agreement with results of repeatability expressed by % RSD (Table 2). Repeatability of extraction after saponification by 5 and 15 mol/L KOH showed higher % RSD for retinol than results obtained after saponification by 10 mol/L KOH as contrasted to results for α -tocopherol. 10 mol/L solution was chosen owing to relative standard deviation (RSD) of measured concentration, for retinol 0.50–0.58 $\mu\text{mol/L}$, RSD 7.94% and for α -tocopherol (6.11–7.16 $\mu\text{mol/L}$, RSD 7.93%).

The optimal volume (1.0, 1.5 and 2.0 mL) of potassium hydroxide (10 mol/L) was tested. The 0.5 mL of breast milk was mixed with 2 mL of ethanol, 1 mL of ascorbic acid (0.1 mol/L) and different volumes of potassium hydroxide. Higher volumes did not resulted in higher concentrations of measured analytes. Therefore 1 mL of potassium hydroxide was selected as sufficient.

Also the prolongation of saponification time (30, 40 and 50 min) was investigated. Previously selected conditions were used. Prolongation did not bring statistical significant differences. Three

Table 2
Selection of the optimal concentration of potassium hydroxide.

	KOH (mol/L)	5	10	15
Retinol	c^a ($\mu\text{mol/L}$)	0.40	0.54	0.41
	% RSD	10.5	7.9	18.1
α -Tocopherol	c^a ($\mu\text{mol/L}$)	7.3	6.6	6.9
	% RSD	1.4	7.9	4.8

^a Measured concentration of vitamin ($n = 6$).

Table 3
Influence of water addition to the sample on the determined concentration.

water (mL)	0	1
Retinol $c \pm SD^a$ (% RSD)	1.6 ± 0.2 (14.8)	2.3 ± 0.2 (6.8)
α -Tocopherol $c \pm SD$ (% RSD) ^a	2.5 ± 0.1 (4.9)	3.5 ± 0.04 (1.2)

^a Measured concentration of vitamins \pm standard deviation, $n = 3$.

different possibilities of warming up system were compared (thermo block, thermostat and water bath). The best results for both determined vitamins were obtained when using thermostat, the samples were protected from light.

3.1.3. Extraction

Retinol and α -tocopherol were extracted with 2 mL of n-hexane by vigorous shaking. The organic and water layers were separated by centrifugation ($3220 \times g$, 10 min, 4 °C). Than 1.5 mL of organic layer phase was evaporated and the residue was dissolved in 375 μL of methanol.

Prolongation of shaking time from 5 min to 10 or 15 min was tested. Longer time of extraction did not resulted in significantly better extraction effect. Therefore time of 5 min was chosen as sufficient and moreover total time of sample preparation was not made than necessary.

Efficiency of extraction was supported by addition of 1 mL of distilled water (Table 3). Measured concentration of both vitamins significantly increased and repeatability of the extraction procedure was eminently improved.

Influence of pH of added water was tested (Table 4). Different water pH (6.2, 5.2, 4.2 and 3.2) was added into the extraction tube together with n-hexane. Water at pH 5.2 was chosen as optimal since concentration of retinol measured at others pH were almost 20% lower, for α -tocopherol losses were about 10%.

3.2. Validation of the extraction procedure

The developed sample preparation procedure was validated for recovery, repeatability and precision according to FDA guidelines [45].

3.2.1. Analyte recovery

Spiked human breast milk samples were used for accuracy (recovery) of validation test. Determinated vitamins were already present in the unspiked sample matrix therefore concentrations of spiked vitamins were corrected by subtracting the blank. The human breast milk samples were spiked by assistance of deproteinization reagent at the concentrations matching calibration range. FDA [45] recommended criteria for recovery are from 75% to 125%.

Samples of human breast milk were spiked by retinol at the concentrations 1.0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{mol/L}$ and by α -tocopherol at the concentrations 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$. For each concentration level six individual samples were prepared. The results are summarized in Table 5 showing all recovery values in the range 82–110% thus having satisfied the FDA requirements.

Recovery of both vitamins fulfills FDA recommended criteria therefore the tested extraction procedure is suitable for analysis of human breast milk.

3.2.2. Repeatability

The method precision characteristic (repeatability) was validated with six samples of breast milk. The precision was expressed by % relative standard deviation (% RSD). FDA [45] recommended criteria are % RSD not greater than 15%.

The intra-day repeatability of extraction procedure was tested. Average concentration of retinol was $1.24 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ (3% RSD).

Table 4
Influence of pH on the extraction.

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

^a Measured concentration of vitamins \pm standard deviation, $n = 4$.^b Percentage decrease of concentration.**Table 5**
Validation of the extraction process.

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

^a Concentration of vitamins which were used for milk samples spiking ($n = 6$).^b Average concentration of vitamins \pm standard deviation ($n = 6$).^c Average concentration of vitamins \pm standard deviation ($n = 30$).^d Decrease of concentration ($\mu\text{mol/L}$) correlated to value of day 1.^e Percentage decrease of concentration.^f Average values and standard deviation calculated from 6 samples.^g Average values calculated from 12 samples.^h Average values calculated from 18 samples.ⁱ Average values calculated from 24 samples.

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

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

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

Table 6
Changing of retinol concentration during lactating stages.

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

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

3.2.3. Precision

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

3.3. Method application

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

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

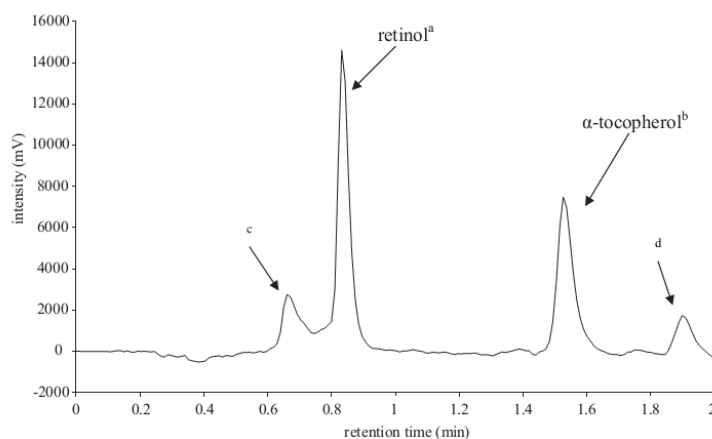


Fig. 1. Chromatogram of real sample human breast milk (lactating stage: 4 months). ^aRetinol ($t_R = 0.83$ min, $c = 1.17$ $\mu\text{mol/L}$, detected at 325 nm), ^b α -Tocopherol ($t_R = 1.52$ min, $c = 21.22$ $\mu\text{mol/L}$ detected at 295 nm). ^{c,d}Peaks of impurity. Void time (t_0) was measured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

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

4. Conclusion

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

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

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

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

Acknowledgment

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13.2 Carotid Intima-media Thickness and Laboratory Parameters of Atherosclerosis Risk in Patients with Breast Cancer

B. Melichar, H. Kalabova, L. Ungermann, L. Krcmova, R. Hyspler, M. Kasparova, M. Pecka, V. Sramek, H. Prochazkova-Studentova, A. Svobodnfk, L. Pecen and D. Solichova

Anticancer Research, 32, 9, 4077-4084, 2012 (Citováno–0, IF₂₀₁₂–1,713)

No: 14862-M

Please mark the appropriate section for this paper

Experimental

Clinical

Epidemiological

Carotid *Intima-media* Thickness and Laboratory Parameters of Atherosclerosis Risk in Patients with Breast Cancer

BOHUSLAV MELICHAR^{1,2}, HANA KALÁBOVÁ¹, LEOŠ UNGERMANN³, LENKA KRČMOVÁ^{4,6},
RADOMÍR HYŠPLER⁴, MARKÉTA KAŠPAROVÁ^{4,6}, MIROSLAV PECKA⁵,
VLASTISLAV ŠRÁMEK¹, HANA PROCHÁZKOVÁ-ŠTUDENTOVÁ¹,
ADAM SVOBODNÍK⁷, LADISLAV PECEN⁷ and DAGMAR SOLICHOVÁ⁴

¹Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic; Departments of ²Medicine, ³Radiology, ⁴Gerontology and Metabolic Care, and

⁵Hematology, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic;

⁶Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic;

⁷International Clinical Research Center, Department of Clinical Development and Technology Transfer, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

Abstract. Aim: To investigate the relation between intima-media thickness (IMT) and laboratory parameters of atherosclerosis risk in patients with breast carcinoma. Patients and Methods: IMT and a panel of laboratory parameters associated with the risk of atherosclerosis were studied in 192 patients with histologically verified breast carcinoma. Results: Patients with metastatic disease had significantly higher fibrinogen, C-reactive protein (CRP), urinary neopterin and mean IMT, and significantly lower serum albumin and hemoglobin concentrations. Significant correlations were observed between CRP, urinary neopterin, mean IMT and other parameters of cardiovascular risk. Age was an independent predictor of the presence of sonographic signs of atherosclerosis using logistic regression, and age, glucose, time from start of chemotherapy, high-density lipoprotein cholesterol, D-dimers were independently associated with IMT in stepwise regression models. Conclusion: In addition to the associations between IMT and laboratory or clinical parameters of the risk of atherosclerosis, IMT may also be associated with the time from chemotherapy.

Recent decades have witnessed major progress in cancer therapy that has translated into improved survival of patients

Correspondence to: Bohuslav Melichar, MD, Ph.D., Professor and Head, Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic. Tel: +420 588444288, Fax: +420 588442522, e-mail: bohuslav.melichar@fnol.cz

Key Words: Atherosclerosis, breast cancer, intima-media thickness, cardiovascular risk.

with different types of primary tumor. With this improved survival, and even cure of patients with some forms of metastatic cancer, hitherto unknown and unexpected long-term complications have emerged, including atherosclerosis and associated disorders (1-3). Comorbid conditions are now an important issue in medical oncology, and, in many patients, comorbid disorders rather than cancer remain the ultimate cause of death (4). Atherosclerosis, with its complications, is by far the most important cause of morbidity and mortality due to comorbid conditions in patients with cancer. Age, smoking, obesity and oxidative stress are associated with increased risk of atherosclerosis, as well as many forms of cancer (5). Several retrospective series demonstrated increased risk of cardiovascular events, e.g. myocardial infarction, in long-term survivors of testicular cancer or pediatric tumors treated with chemotherapy (1-3). The toxicity of anticancer therapy may result in the progression of atherosclerosis (6). The information on the prevalence of complications of atherosclerosis is limited for most of the common types of cancer (5, 7-9). In patients with breast carcinoma both increased and decreased incidence of complications of atherosclerosis have been reported (10, 11).

More pronounced adverse effects fostering the progression of atherosclerosis could be expected from the use of targeted agents, e.g. drugs targeting the vascular endothelial growth factor or its receptors, but these drugs were introduced only recently and are now used almost exclusively for patients with incurable metastatic tumors. For some targeted agents, hypertension, hyperlipidemia, or hypomagnesemia represent the most important side-effects. Hypertension or proteinuria accompanying administration of drugs targeting vascular endothelial growth factor is associated with endothelial

dysfunction (12). With the introduction of targeted agents into the standard therapy of common tumor types, *e.g.* breast carcinoma or colorectal carcinoma, the effect of treatment on long-term risk of atherosclerosis may become an important consideration.

Considerable efforts have been devoted in the past several decades to identifying risk factors for the development or early signs of the presence of atherosclerosis. A number of laboratory parameters, including cholesterol, homocysteine, and C-reactive protein (CRP) (13), have been shown to predict cardiovascular events associated with atherosclerosis. In addition to the search for laboratory parameters of increased risk, strategies have been developed for early diagnosis of asymptomatic cardiovascular disease. Identification of risk or early diagnosis of asymptomatic disease opens the possibility of intervention that could prevent a cardiovascular event. Stress/rest myocardial perfusion scan, and measurement of carotid *intima-media* thickness (IMT) have been the most widely used diagnostic tests in asymptomatic individuals. Stress/rest myocardial perfusion has been shown to predict cardiovascular events in asymptomatic patients with different risks of coronary artery disease (14, 15). Measurement of carotid IMT has been established as an indirect non-invasive test for the detection of coronary atherosclerosis (16).

The aim of the present study was to investigate relation between IMT and laboratory parameters of atherosclerosis risk in patients with breast carcinoma.

Patients and Methods

One-hundred and ninety-two female patients with histologically verified breast carcinoma, aged (mean±standard deviation) 54±10 (range 28-76) years, were included in the present study. The investigations were approved by Institutional Ethical Committee and the patients signed an informed consent.

Body-mass index (BMI) was calculated using the formula: weight (in kg)/[height (in m)]². The menopausal status; history of breast cancer, including the time from diagnosis, time from chemotherapy start or the presence of distant metastases; history of smoking, cardiac disorder, hypertension, diabetes, disorders of lipid metabolism and thyroid disorders were recorded. Blood samples were drawn from a peripheral vein after an overnight fast. The samples were transferred immediately to the laboratory, centrifuged (1600 × g, 10 minutes at 16°C), then the serum was separated and either processed immediately (for most parameters) or frozen at -20°C until analysis (for alpha-tocopherol and retinol). Peripheral blood cell count was performed as described elsewhere (17). Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate; leukocytes and platelets were determined by impedance method using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). Fibrinogen was determined by Clauss clotting time method using commercial reagents (Grifols, Barcelona, Spain). Antithrombin functional activity was measured by spectrophotometric method using chromogenic substrates (STA Compact; Diagnostica Stago, Paris, France), and D-dimers in

plasma were determined by immunoturbidimetric method (Diagnostica Stago).

CRP was determined using particle-enhanced immunoturbidimetric assay; lipoprotein (a), serum cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglycerides were determined using immunoturbidimetric and enzyme-based assays accordingly, as commercially available on a MODULAR analyzer (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Homocysteine concentration was determined immunochemically (Immulite 2000; Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). Glycosylated hemoglobin was determined by high-performance liquid chromatography using a Variant II Turbo System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the instructions of the manufacturer and expressed according the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) reference system (18). Serum glucose, creatinine, magnesium, uric acid and albumin were determined using commercially available kits on a MODULAR analyzer (Hoffmann-La Roche).

Serum alpha-tocopherol and retinol were determined by high-performance liquid chromatography as described elsewhere (19). In a liquid-liquid extraction procedure, 500 µl of serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5% methanol (500 µl, 5 minutes at 4°C). Subsequently, 2.5 ml of *n*-hexane was added to this mixture and extraction for 5 minutes was carried out by a vortex apparatus. After centrifugation (1 600 × g, 10 minutes at 0°C), the aliquot (2 ml) of the extract was separated and reduced to dryness (45°C) in a vacuum concentrator (AD 5301; Eppendorf, Hamburg, Germany). The residue was dissolved in 400 µl of methanol and analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography using external standard calibration. The analyses were performed using a Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) high-performance liquid chromatography set comprising an LC 200 pump, an LC 200 autosampler, LC column oven 101 thermostat and LC 235C diode array detector attached to a Perkin-Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of alpha-tocopherol and retinol was performed using Chromolith Performance RP-18e, 100×4.6 mm monolithic columns (Merck, Darmstadt, Germany). As the mobile phase, 100 % methanol was used at a flow rate of 2.5 ml/min and column pressure of 3.3 MPa. The block heater LC Oven 101 (Perkin-Elmer) was utilized to maintain the analytical column temperature at 25°C. The sample injection volume was 50 µl. The detection of alpha-tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and at 325 nm, respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of alpha-tocopherol were 0.1 µmol/l and 0.3 µmol/l, respectively. LOD and LOQ of retinol were 0.02 µmol/l and 0.07 µmol/l, respectively.

Early morning urine samples were collected and stored at -20°C until analysis. Urinary neopterin was determined using a modification of a method described earlier (20). After centrifugation (45 s, 12000 × g), 100 µl of urine specimen was diluted with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter; the samples were then filtered using a Microtiter, AcroPrep 96 Filter Plate 0.2 µm/350 µl vacuum manifold (Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA). Neopterin was determined using a Prominence LC20 high-performance liquid chromatography system (Shimadzu, Kyoto, Japan) composed of Rack changer/C autosampler for micro-titration plates, DGU-20A5 degasser, 2 LC-20 AB liquid chromatograph pumps, auto sampler SIL-20 AC, column oven CTO - 20 AC thermostat, RF-10 AXL fluorescence detector, SPD - M20A diode array detector and CBM-20A communications bus module. Phosphate buffer 15 mmol/l, pH 6.4, with flow rate of 0.8

ml/min was used as mobile phase. Separation was performed using a Gemini Twin 5 μ , C18, 150 \times 3 mm (Phenomenex, Torrance, USA) hybrid analytical column at 25°C, with an injection volume of 1 μ l. Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission wavelength). Creatinine was monitored simultaneously in the same urine specimen with diode array detector at 235 nm. Time of analysis for urine neopterin and creatinine was 6 minutes and the analytes were quantified by external standard calibration. LOD and LOQ of urinary neopterin were 5.89 nmol/l and 11.79 nmol/l, respectively. LOD and LOQ of urinary creatinine were 6 μ mol/l and 12 μ mol/l, respectively. Neopterin concentrations are expressed as neopterin/creatinine ratio (μ mol/mol creatinine).

Urinary albumin concentration was measured immunochemically using COBAS-MIRA (Hoffmann-La Roche), and expressed as the albumin/creatinine ratio (g/mol creatinine). LOQ of urinary albumin was 3.6 mg/l. The activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in urine was determined using a method published previously (21), with minor modifications. LOQ of urinary NAG was 1 nkat/l. NAG activity is expressed as NAG/creatinine ratio (μ kat/mol creatinine).

The carotid arteries were evaluated with two-dimensional imaging using an ultrasound scanner (Aplio, Toshiba, Tokyo, Japan) with an 8-14 MHz transducer (22). IMT, defined as the distance between the echogenic line representing blood-intima interface and the echogenic line representing *media-adventitia* interface, was measured on the posterior wall of the carotid artery in the longitudinal plane. IMT was evaluated bilaterally at two levels, in the supraclavicular segment of the common carotid artery and 2 cm below the bifurcation of the common carotid artery (23). Three measurements were performed at each level and the mean of these three measurements was calculated. The presence of carotid plaque was noted. The measurements were performed by the same observer. The mean IMT and maximal IMT from the measurements performed bilaterally at the two segments were determined. Sonographic signs of atherosclerosis were considered present if the IMT was \geq 1 mm or if presence of plaques or calcifications was observed.

Differences between groups of patients were analyzed by the Mann-Whitney *U*-test. Correlations were analyzed using Spearman's rank correlation coefficient. These analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA). Multivariate analysis was performed using multiple logistic regression and multiple regression. These analyses were performed using SAS software (Version 9.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). The decision on statistical significance was based on $p=0.05$ level.

Results

Fifteen patients had metastatic disease and 177 patients had no evidence of distant metastases. Patients with metastatic disease had significantly higher fibrinogen, CRP, urinary neopterin and mean IMT, and significantly lower serum albumin and hemoglobin (Table I).

Correlations between CRP, urinary neopterin, mean IMT and other parameters of cardiovascular risk are shown in Table II. Significant positive correlations were observed between IMT and age, BMI, D-dimers, fibrinogen, glucose, uric acid, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, homocysteine, glycosylated hemoglobin, retinol, CRP,

urinary NAG and albumin, and negative correlations were observed between IMT and HDL cholesterol and albumin (Table II). Significant negative correlations were observed between urinary neopterin and hemoglobin, platelet count, creatinine, HDL cholesterol, albumin, retinol and alpha-tocopherol. Significant positive correlations were observed between CRP and age, BMI, leukocyte count, D-dimers, fibrinogen, glucose, uric acid, triglycerides, urinary albumin and both mean and maximal IMT. CRP correlated negatively with HDL cholesterol and albumin.

Thirty-five patients (18%) had sonographic signs of atherosclerosis as defined in the Patients and Methods, while no signs of atherosclerosis were evident in 157 patients. The patients with sonographic signs of atherosclerosis had significantly higher age, BMI, fibrinogen, glucose, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides and glycosylated hemoglobin, and significantly lower HDL cholesterol (Table III).

The continuous clinical and laboratory parameters were then dichotomized based on the upper limit of normal values (D-dimers, fibrinogen, glucose, uric acid, total cholesterol, LDL cholesterol, lipoprotein (a) and CRP), lower limit of normal values (serum albumin), or, in the case of parameters with fewer than 10% of values above (or below) the normal range or for which the normal range was difficult to define, above the third quartile (age, BMI, leukocyte and platelet count, antithrombin, creatinine, triglycerides, homocysteine, glycosylated hemoglobin, retinol and alpha-tocopherol, urinary NAG, albumin and neopterin) or below the first quartile (hemoglobin, magnesium and HDL cholesterol).

A multiple logistic regression using a stepwise selection model was subsequently performed for data from 149 patients who had complete dichotomized data for all variables. Only age was an independent predictor of the presence of sonographic signs of atherosclerosis ($p<0.0001$), and the probability (P) of atherosclerosis was defined by the formula:

$$P = 1 / [1 + \exp(-12.8297 + 0.1952 \times \text{age})]$$

Using continuous variables, multiple regression analyses were then performed using log mean IMT or log maximum IMT as dependent variables. Using a stepwise selection model, increasing age ($p<0.0001$), glucose ($p=0.0238$) and time from chemotherapy start (TFCS; $p=0.0205$) were independently associated with increased mean IMT, while higher HDL was associated with decreased IMT ($p=0.0458$). The mean IMT was defined by the formula: $\ln(\text{mean IMT}) = -1.35740 + 0.01469 \times \text{age} + 0.02933 \times \text{glucose} + 0.001054 \times \text{TFCS} - 0.05715 \times \text{HDL}$.

Using the same stepwise selection procedure, increasing age ($p<0.0001$), and glucose ($p=0.0324$) were independently associated with increased maximum IMT, while D-dimers (DD; $p=0.0297$) and HDL ($p=0.0291$) were independently associated with decreased maximum IMT. Maximum IMT was defined by the formula: $\ln(\text{maximum IMT}) =$

Table I. The investigated parameters in patients with and those without distant metastases.

Parameter (unit)	No metastases (n=177)	Metastatic disease (n=15)	p-Value
Age (years)	53±10	57±7	0.102
Time from diagnosis (months)	26±28	42±44	0.207
Time from chemotherapy start (months)	22±27	34±33	0.138
BMI (kg/m ²)	26.8±5.2	28.3±6.4	0.353
Leukocytes (10 ⁹ /l)	5.9±1.7	5.4±1.8	0.108
Hemoglobin (g/l)	140±9	130±11	0.001
Platelets (10 ⁹ /l)	240±50	222±91	0.705
D-Dimers (mg/l)	0.66±1.65	0.89±0.71	0.053
Antithrombin (%)	107±13	102±12	0.093
Fibrinogen (g/l)	3.58±0.75	4.45±0.72	0.00008
Glucose (mmol/l)	5.1±1.1	5.7±2.2	0.376
Magnesium (mmol/l)	0.86±0.06	0.88±0.10	0.073
Creatinine (µmol/l)	68±12	68±9	0.815
Uric acid (µmol/l)	279±77	282±60	0.581
Total cholesterol (mmol/l)	5.54±0.97	5.68±1.21	0.247
HDL cholesterol (mmol/l)	1.71±0.45	1.48±0.31	0.069
LDL cholesterol (mmol/l)	3.39±0.91	3.75±1.03	0.111
Triglycerides (mmol/l)	1.30±0.73	1.18±0.37	0.897
Lipoprotein (a) (g/l)	0.28±0.37	0.39±0.60	0.643
Albumin (g/l)	45.8±3.0	44.1±2.3	0.024
CRP (mg/l)	3.5±6.4	9.1±7.0	0.00002
Homocysteine (µmol/l)	11.3±3.9	13.6±6.9	0.226
Glycosylated hemoglobin (%)	3.5±0.9	3.7±0.9	0.162
Retinol (µmol/l)	1.83±0.54	1.61±0.60	0.067
Alpha-tocopherol (µmol/l)	24.59±5.21	25.44±4.69	0.182
Urinary neopterin (µmol/mol creatinine)	142±68	190±98	0.028
Urinary NAG (µkat/mol creatinine)	14.4±11.0	14.9±7.3	0.371
Urinary albumin (g/mol creatinine)	1.02±2.94	0.54±0.37	0.502
Mean IMT (mm)	0.61±0.13	0.73±0.24	0.038
Maximal IMT (mm)	0.68±0.16	0.84±0.45	0.072

Data are the mean±standard deviation of the respective parameters. p-Values less than 0.05 are highlighted with bold type. BMI body-mass index; HDL high-density lipoprotein; LDL low-density lipoprotein; CRP C-reactive protein; NAG N-acetyl-β-D-glucosaminidase; IMT intima-media thickness.

$$-1.28323+0.01611 \times \text{age} - 0.01871 \times \text{DD} + 0.03261 \times \text{glucose} - 0.07342 \times \text{HDL}.$$

Discussion

In a breast cancer patient population IMT, an indicator of the presence of atherosclerosis, was associated with risk factors of atherosclerosis that are well known from the general population, including age, BMI, glucose, uric acid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, albumin and homocysteine (24). An association was also evident with the systemic inflammatory response. CRP, a key indicator of systemic inflammatory response, was correlated with IMT, as well as with risk factors of atherosclerosis, including BMI, uric acid or HDL cholesterol. In multivariate analysis using logistic regression, only age predicted the probability of atherosclerosis. When applying the stepwise multiple regression model, age, glucose, HDL, time from the chemotherapy start and D-dimers were independent predictors

of mean or maximum IMT, while age, glucose, and time from the start of chemotherapy were associated with increased IMT; HDL and D-dimers had a protective effect. Interestingly, a positive correlation was also observed between IMT and D-dimers, indicating that the role of fibrinolysis may be more complex in this patient population. The association between IMT and the time from chemotherapy start is of specific interest. In many patients this time was zero as they were not treated with chemotherapy. The association with IMT indicating that the risk of atherosclerosis increases with the time elapsed from the chemotherapy start corresponds to the hypothesis that cytotoxic chemotherapy plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with cancer (1-3, 6).

Interestingly, IMT was increased in patients with distant metastases. Other parameters that were different in patients with metastatic disease included parameters associated with systemic inflammatory response, urinary neopterin, CRP, fibrinogen and hemoglobin. The observed association of

13.3 Separation of Vitamins Retinol Acetate, Ergocalciferol, or Cholecalciferol and Tocopherol Acetate Using Sequential Injection Chromatography

H. Sklenarova, P. Koblouva, P. Chocholous, D. Satinsky, L. Krcmova, M. Kasparova, D. Solichova and P. Solich

Analytical Letters, 44, 1-3, 446-456, 2011 (Citováno–2, IF₂₀₁₁–1,016)

Flow and Sequential Injection—General Approaches

SEPARATION OF VITAMINS RETINOL ACETATE, ERGOCALCIFEROL, OR CHOLECALCIFEROL AND TOCOPHEROL ACETATE USING SEQUENTIAL INJECTION CHROMATOGRAPHY

Hana Sklenářová,¹ Petra Koblová,¹ Petr Chocholouš,¹
Dalibor Šatínský,¹ Lenka Krčmová,^{1,2} Markéta Kašparová,^{1,2}
Dagmar Solichová,² and Petr Solich¹

¹Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry,
Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

²Faculty of Medicine and Teaching Hospital, Department of Metabolic Care
and Gerontology, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

A novel simple method for separation of vitamins A-acetate (all-trans retinol acetate), D₂ (ergocalciferol), or D₃ (cholecalciferol) and E-acetate (tocopherol acetate) using short monolithic column in the sequential injection chromatography system is described. Separation was carried out using FIAlab[®] 3000 system under following conditions: Onyx[™] Monolithic C18 column (25 × 4.6 mm), mobile phase acetonitrile:methanol:H₂O 20:20:1 (v/v/v), flow rate 0.9 mL min⁻¹, detection at 265 nm (D), 290 nm (E), and 325 nm (A). The method was validated with respect to peak asymmetry, resolution, number of theoretical plates, repeatability, linearity, precision, and accuracy. Analysis time was 5.5 min.

Keywords: Cholecalciferol; Monolithic column; Retinol-acetate; Sequential injection chromatography; Tocopherol-acetate

INTRODUCTION

Development of monolithic materials and application of their advantageous features such as low flow resistance (thanks to the high porosity of monolithic material) and high separation efficiency that could be obtained even with relatively

Received 22 February 2010; accepted 18 March 2010.

This paper was submitted as part of a Special Issue on Flow Injection Analysis.

The authors gratefully acknowledge the following financial support: H. S., P. K., P. Ch., D. Š., L. K., M. K., and P. S., the support of the Ministry of Education of the Czech Republic, MSM 0021620822. L. K., M. K., and D. S., the support of Ministry of Health, MZO 00179906. P. K., the support of the Grant Agency of the Charles University, No. 34609/2009. M. K. and P. K., the support of the SVV/2011/263 002.

Address correspondence to Hana Sklenářová, Ph.D., Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic. E-mail: Hana.Sklenarova@faf.cuni.cz

short columns with monolithic rods, compared to common chromatographic columns based on particle sorbents, enables their usage in the low pressure flow systems. The Sequential Injection Chromatography (SIC) bringing together advantages of both Sequential Injection Analysis (SIA) and monolithic technology thus represents a modern mode of flow methods that are established for easy automation of simple analytical methods (Růžička and Marshall 1990; Šatínský et al. 2003; Chocholouš, Solich, and Šatínský 2007).

Vitamins are a group of compounds extensively analyzed by many analytical methods. Vitamins A, D₂, D₃, E, and K₁, retinyl acetate, retinyl palmitate, tocopherol acetate, ergosterol, and 7-dehydrocholesterol in milk were separated on a packed reversed-phase fused-silica micro-column (150 × 0.3 mm, 3 μm) and determined with UV detection (Gomis, Fernández, and Gutiérrez Alvarez 2000). Another work presents determination of tocopherols, β-carotene, all-trans-retinol, and in the case of fish, cholecalciferol as well (Salo-Vaananen et al. 2000). Normal-phase chromatography with UV (β-carotene and all-trans-retinol) and fluorescence detections (tocopherols) were used.

Determination of lipo-soluble vitamins in cooked meals, milk, and milk products using ODS 2 C-18 column with UV detection (Escrivá et al. 2002) was published. Quantitation of vitamins A, D₃, and E in fortified infant formulae by LC-MS (Heudi, Trisconi, and Blake 2004) was carried out. Stability of vitamins A and E was tested in open infant milk based formulae (Chavéz-Servín, Castellote, and López-Sabater 2008) using silica short-narrow-bore column (50 × 2.1 mm, 3 μm). This work was later extended to determination of vitamin C, iron and selenium (Chavéz-Servín, Castellote, Rivero et al. 2008). Green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement (Kienen et al. 2008) using microsorb C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm particles) with UV detection was developed. Simultaneous measurement of retinol, α-tocopherol and six carotenoids in human plasma using an isocratic reversed-phase HPLC method (Karppi et al. 2008) was described.

Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D, and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds was carried out using conventional C-18 column (150 × 3.9 mm) and mobile phase was pure methanol (Qian and Sheng 1998). Other separation method determined vitamins A, E, D₃, and 25-hydroxyderivates of vitamins D₂ was described (Alvarez and De Mazancourt 2001). In this case, vitamins were observed in samples of human plasma. Reversed phase C-18 column (250 × 4.0 mm, 5 μm) was used for gradient elution. Derivatives of vitamins D were observed and determined by LC-MS and compared with radioimmunoassay method (Chen et al. 2008). Serum levels of retinol, α-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D₃ and 24, 25 dihydroxyvitamin D₃ levels (Mata-Granados, Luque de Castro, and Quesada 2008) using a previously published method (Quesada, Mata-Granados, and Luque de Castro 2004). Amperometric detection of fat-soluble vitamins and antioxidants (Cheng and Jandik 2008) were carried out using new type of micro fabricated carbon electrodes for HPLC analysis.

Separation of vitamins A and E in biological material by HPLC with monolithic column (100 × 4.6 mm) was recently described using pure methanol as a mobile phase (Urbánek et al. 2006). The next work of this group (Krčmová et al. 2009) was based on the separation of all-*trans*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, retinol, alpha-, and gamma-tocopherol. The same length of the monolithic column was used and the mobile phase composed of acetonitrile and 1% ammonium acetate in water at pH 7.0

in gradient started from the ratio 98:2 (v/v) and the flow rate 2.0 mL min^{-1} was finished by the ratio 95:5 and the flow rate 3.2 mL min^{-1} was employed. The total analysis time was 7.2 minutes and separation was applied for determination of the cited substances in human blood serum for monitoring anticancer therapy.

The aim of this study was to develop and validate a new low-pressure method using SIC for the determination of vitamins (A-acetate, D, E-acetate). The novel SIC method with the monolithic column and UV spectrophotometric detection was then applied for the determinations of vitamin D₃ in the pharmaceutical formulation Vigantol[®] (Merck KGaA, Germany) and vitamins A and D₂ in the formulation Vitamin AD Slovakofarma[®] capsules (Zentiva a.s., Slovak Republic) using tocopherol-acetate as an internal standard.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

Retinol acetate (all-trans vitamin A), ergocalciferol (D₂), cholecalciferol crystalline (D₃), and vitamin E acetate (alpha-tocopherol acetate) were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Stock and standard solution of vitamins A-acetate, D₂, and D₃ were prepared in methanol; vitamin E-acetate was dissolved in *n*-hexane and then standard solutions were prepared using methanol. Concentrations of stock and standard solutions were as follows: 1 mM vitamin A-acetate, D₂, D₃ stock solutions and 100 μM standard solutions; 20 mM vitamin E-acetate stock solution and 2 mM standard solution. The mixture of standards for separation experiments contained 100 μM of vitamin A-acetate, D₂ and D₃ and 2 mM of vitamin E-acetate. All stock and standard solutions were stored at 4°C. In the case of vitamin A-acetate, fresh solutions were prepared weekly. Other vitamin solutions were stored for 4 months.

The HPLC-grade methanol, *n*-hexane, acetone, and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). All other chemicals were of analytical grade quality. The deionized water was purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Apparatus and Columns

Commercial FIALab[®] 3000 system (FIALab[®] Inc., Bellevue, USA) comprised of 5 mL syringe pump, 6 port selection valves and 10 mm optical Z-flow through cell was used. Deep UV light source D-2000 CE and USB 2000 UV-VIS fiber optic CCD detector (OceanOptics, USA) were connected to the flow system via 600 μm I.D. optical fibers with SMA connectors (FIALab[®] Inc., Bellevue, USA). Detection was carried out at 265 (D), 290 (E), and 325 (A) nm, 700 nm was used for correction of baseline drifts. Flow system was made of PTFE tubing with 0.50 mm I.D. The whole SIA system was controlled by FIALab for Windows 5.0 program. Manifold set-up is depicted in Fig. 1.

Separation was carried out using 50 mm long Chromolith Speed Rod RP-18e column (4.6 mm I.D., Merck, Darmstadt, Germany) and 25 mm long Onyx[™] Monolithic C18 column, (4.6 mm I.D., Phenomenex[®], Torrance, USA). Pre-column Chromolith[®] RP-18e (10 × 4.6 mm) was used to protect both monolithic columns.

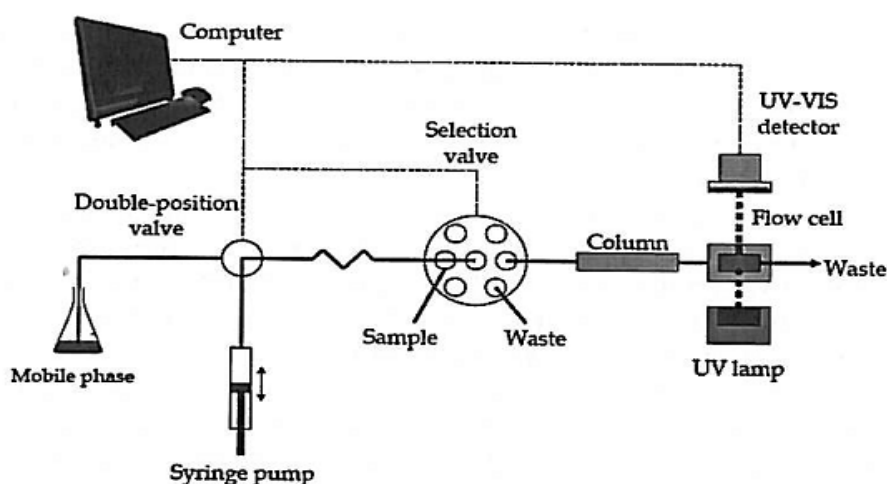


Figure 1. SIA system for simultaneous determination of vitamins A acetate, D₃ and E acetate.

The monolithic column was placed between 6-port selection valve and 10 mm Z-flow detection cell. The mobile phase was degassed by means of helium (Helium 4.6, Linde, Prague, Czech Republic) and aspirated to the system through 10 µm filter (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

Preparation of Sample Solutions

The tested formulation Vigantol[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) contained 0.5 mg mL⁻¹ of D₃ (1.3 mM) in drops solution (oil medium with triacylglycerols). The 400 µL of tested solution and 500 µL of internal standard working solution were transferred to 5 mL volumetric flask and diluted with methanol. The solution was filtered through the 0.45 µm filter and aspirated directly into the SIC system.

The formulation Vitamin AD Slovakofarma[®] (Zentiva, Hlohovec, Slovak Republic) contained 8.6 mg of A-acetate and 0.125 mg of D₂ in one capsule. Auxiliary compounds were glycerol, methylparaben, plant oil, gelatin, and lemon yellow pigment. For determination of A-acetate one crushed capsule was placed into the 10 mL volumetric flask filled up with hexane, the content was shaken for 1 min and sonicated for 10 min in ultrasound bath. The 50 µL of obtained solution was evaporated and solved in 500 µL of internal standard solution, shaken for 1 min, and sonicated for 10 min.

For determination of D₂ that is in lower concentration modified sample preparation was needed. One crashed capsule was placed into 5 mL of acetone, shaken for 1 min, and sonicated for 15 min. The 500 µL of obtained solution was evaporated and solved in 500 µL of internal standard solution, shaken for 1 min, and sonicated for 10 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Development and Optimization

Different separation conditions (column length, composition of mobile phase, flow rate, and sample volume aspirated) were tested to develop the sequential

injection chromatographic method for determination of the aforementioned vitamins. Optimized values of these parameters are marked in dark in the Table 1. Quality of separation was observed in respect to retention times; resolution of individual peaks, including resolution of the dead volume; and the first peak and peak shapes (asymmetry).

From the UV spectra of all analyzed compounds, the optimal detection wavelengths were chosen. This commercial SIA system enables measurement of four different wavelengths simultaneously. Thus, detector signal was observed at three wavelengths 265 nm (D), 290 nm (E), and 325 nm (A), the fourth wavelength (700 nm) was used for correction of baseline drifts.

The optimization of the flow rate was carried out in the range 10–40 $\mu\text{L s}^{-1}$. Using a 50 mm monolithic column and flow rate more than 15 $\mu\text{L s}^{-1}$, problems with high pressure in the system were observed. A 25 mm monolithic column enabled higher flow rates (40 $\mu\text{L s}^{-1}$) without problems (using mentioned mobile phase compositions with high content of organic solvents). A value of flow rate has affected retention times and, thus, peak resolution of all separated compounds. Lower resolution of all mentioned vitamins and short time of analysis were found using higher flow rates (20–40 $\mu\text{L s}^{-1}$). On the other hand, higher resolution and longer time of analysis were obtained with lower flow rates (5–10 $\mu\text{L s}^{-1}$). Compromise between these two parameters should be found to obtain complete separation of vitamins in reasonably short analysis time. In all experiments concerning mobile phase composition, different flow rates were tested; the range of tested values was affected by monolithic column length.

The sample volume was tested in the range 10–40 μL using both monolithic column lengths. With respect to application of optimized separation conditions for determination of vitamin D in pharmaceutical formulation (mainly vitamin D level); 20 μL was chosen for keeping precise detection of vitamin D in the detection part of the SIC system.

The optimization of mobile phase composition was started with 100% methanol. In this case, poor resolutions of the dead volume, the first peak (vitamin

Table 1. Retention time and peak resolution values

MP composition (ACN:MeOH:H ₂ O)	Substance	t _R (s)	Peak resolution
50:50:0	A	54	
	D	115	4.80 (A-D)
	E	146	2.03 (D-E)
25:25:1	A	71	
	D	165	6.52 (A-D)
	E	226	3.13 (D-E)
20:20:1	A	73	
	D	165	6.79 (A-D)
	E	228	3.38 (D-E)
15:15:1	A	77	
	D	194	7.27 (A-D)
	E	293	4.33 (D-E)

Note: A = retinol-acetate; D = cholecalciferol; E = tocopherol-acetate; MP = mobile phase; t_R = retention time; ACN = acetonitrile; MeOH = methanol.

A-acetate) and vitamin D-vitamin E-acetate, were acquired at all flow rates of the mobile phase. The same results were obtained when 100% acetonitrile was used as a mobile phase.

The mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and methanol (50:50, v/v) has shown better separation of all peaks. Peak asymmetry and peak resolution values were found to be lower (asymmetry) and higher (resolution) than in the previous tests; mainly resolution between the dead volume and the first peak was improved. These experiments were carried out on both types of monolithic columns but during testing of a longer (50 mm) monolithic column, flow rates were limited by higher values of back pressure (discussed before) and analysis time was extremely prolonged while separation quality was not improved.

Finally, mobile phases containing mixtures of acetonitrile, methanol, and water in various ratios were tested using the shorter (25 mm) monolithic column and flow rates in the range $10\text{--}30\ \mu\text{L s}^{-1}$. The obtained results of these separations using flow rate $15\ \mu\text{L s}^{-1}$ are shown in Table 1 and Fig. 2. Values of resolution parameter for all tested vitamins were sufficiently high ($R > 1.5$), but analysis time was slightly prolonged. In the case of mixtures ratios 25:25:1 and 20:20:1, there were found only small changes in separation efficiency (retention times for individual vitamins were found to be similar). Thus, separation robustness was proved: changes in ratios of mobile phase composition in the mentioned range did not affect observed parameters of evaluation of separation process.

Analytical Parameters and Validation

All compounds were completely separated using the proposed procedure ($20\ \mu\text{L}$ sample volume, OnyxTM Monolithic C18 column, $25 \times 4.6\ \text{mm}$ with $10\ \text{mm}$ precolumn, mobile phase acetonitrile:methanol:H₂O 20:20:1 (v/v/v), flow rate $0.9\ \text{mL min}^{-1}$ corresponds to $15\ \mu\text{L s}^{-1}$, ambient temperature) and several chromatographic parameters such as peak asymmetry, peak resolution, number of theoretical plates, and height equivalent to a theoretical plate, were calculated from the experimental data (see

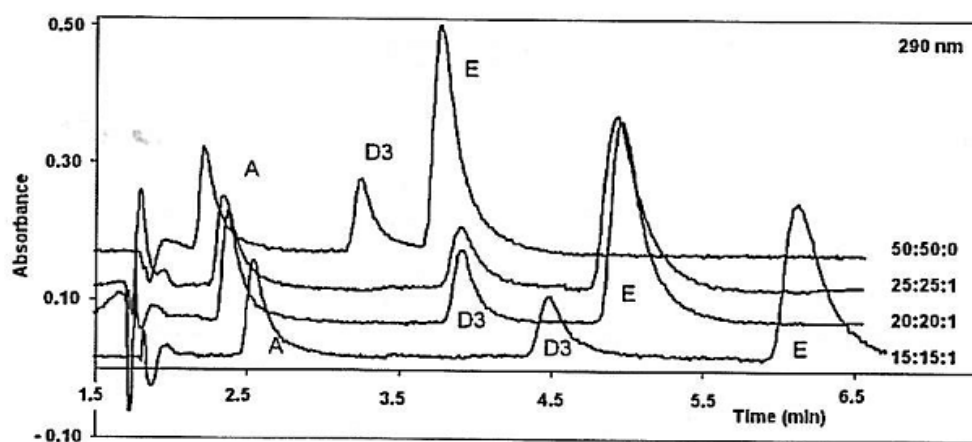


Figure 2. SIC chromatograms of separation of standard solution using OnyxTM Monolithic C18 column ($25 \times 4.6\ \text{mm}$), various ratios of mobile phase acetonitrile:methanol:H₂O (50:50:0, 25:25:1, 20:20:1, 15:15:1, v/v/v), flow rate $0.9\ \text{mL min}^{-1}$, detection wavelength 290 nm.

Table 2). All results were in good agreement with limits set by validation authorities (ICH 1997; Council of Europe 2007); individual values of validation parameters limits are mentioned in Table 2.

Lower value of number of theoretical plates for vitamin A-acetate corresponds to the monolithic column length (25 mm). Limit for this validation parameter was not strictly set by validation authorities and in common HPLC separation applications values ≥ 900 are accepted. In the presented separation, a lower value (622) for vitamin A-acetate was found, but calculation of height equivalence of the theoretical plate that is related to the column length was used for evaluation of separation process. The HETP parameter accepted values are $< 100 \mu\text{m}$, even in HPLC applications using particle columns (HETP value for vitamin A-acetate was $40.93 \mu\text{m}$).

The chromatogram in Fig. 3 was obtained using the SIC method for separation of mentioned substances in the standard solution. Figure 4 shows separation of vitamin D₃ and internal standard vitamin E-acetate in sample of Vigantol[®] drops.

The developed method was validated in order to evaluate repeatability (of retention times, peak height, and peak area), linearity, precision, and accuracy. All results of validation parameters are described in Table 3 including limits set by validation authorities (ICH 1997; Council of Europe 2007). Values of mentioned parameters were, in all cases, calculated as a ratio of the respective value for individual vitamin, and the value for internal standard obtained in one analysis. Obtained results were in good agreement with the set limits.

The repeatability (Table 2) of the method was determined preparing the standards of all vitamins while retention time, peak height, and peak area for each compound were evaluated after processing each standard six times. Obtained values were in good agreement with the set limit, but there was a need to use values related to the internal standard.

Linearity (Table 2) was established with a series of working solutions prepared by dilution of the stock solution in mobile phase to the final concentrations. Each concentration was injected in triplicate and the mean value of peak area was taken for the calibration curve. The calibration graphs involved six experimental points for

Table 2. Evaluation of separation process

Parameter	Criteria	A-acetate	D3	E-acetate
Retention time (s)		76.75	166.93	226.47
Peak resolution	$R > 1.5$	6.88	3.33	
Peak asymmetry	$0.8 < T < 2$	1.44	1.24	1.20
Number of theoretical plates		622	2279	1710
HETP (μm)		40.93	11.11	14.62
Repeatability of t_R (%) ^a	$RSD < 1$	0.52	0.73	
Repeatability of area (%) ^a	$RSD < 1$	0.82	0.93	
Inter-day precision (%) ^b	$RSD < 5$	1.62	3.30	
Calibration range (μM)		50–150	50–150	
Correlation coefficient	$R > 0.9900$	0.9988	0.9970	

Note: HETP = height equivalent of the theoretical plate.

^a6 repeated injections of standard solution.

^bInter-day R.S.D. values were calculated for 6 repeated standard injections; three consecutive days.

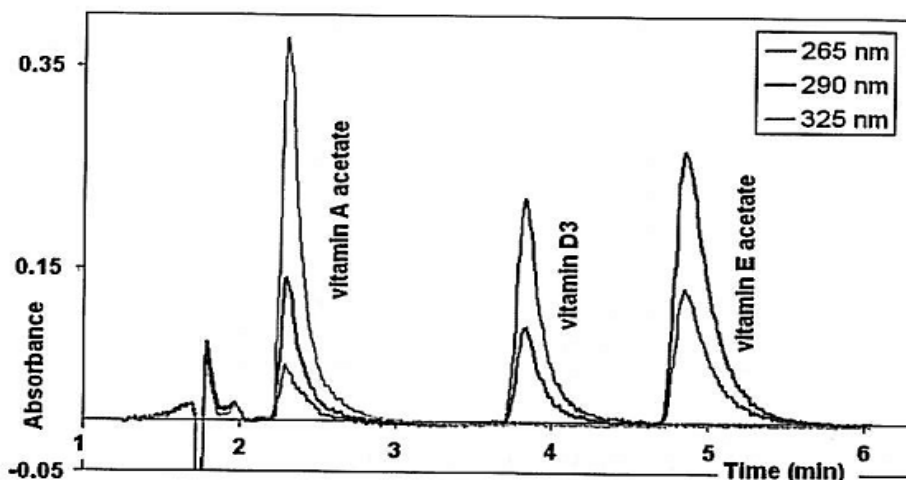


Figure 3. SIC chromatogram of separation of the standard solution using OnyxTM Monolithic C18 column (25 × 4.6 mm), mobile phase acetonitrile:methanol:H₂O 20:20:1 (v/v/v), flow rate 0.9 mL min⁻¹.

each compound (concentration range 50, 60, 80, 100, 120, and 150 μM). The correlation coefficient was 0.9988 for vitamin A-acetate and 0.9970 for vitamin D₃.

To validate the precision (Table 3) of the method a number of six sample solutions prepared from the same pharmaceutical formulation were analyzed consecutively; three injections of each preparation were used for evaluation. The results are summarized in the form of R.S.D values (Vigantol[®] D₃ 2.52%; Vitamin AD Slovakofarma[®] A-acetate 3.17%, D₂ 1.37%). Day-to-day precision (R.S.D.) values were calculated for repeated standard injections (n = 6) and three consecutive days, results (1.62 and 3.30% for vitamins A and D, respectively) agreed well with the limit. Accuracy (Table 3) was evaluated by addition of known quantity of the analyte to the drug product, calculated as a recovery of the known quantity expressed as a percentage (Vigantol[®] D₃ 104.40%; Vitamin AD Slovakofarma[®] A-acetate

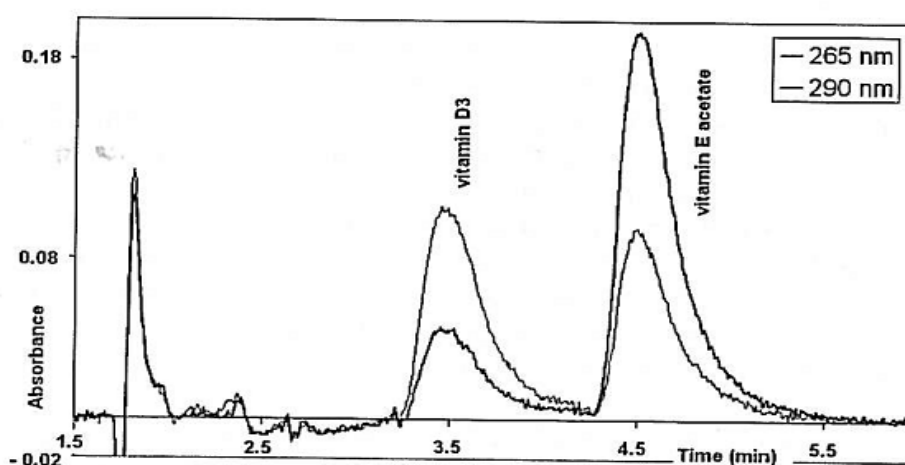


Figure 4. SIC chromatogram of separation of the sample of Vigantol drops using OnyxTM Monolithic C18 column (25 × 4.6 mm), mobile phase acetonitrile:methanol:H₂O 20:20:1 (v/v/v), flow rate 0.9 mL min⁻¹.

Table 3. Method validation results

Pharmaceutical formulation	Parameter	Criteria	A-acetate	D
Vigantol ^a	Method precision (%) ^c	RSD < 5		2.52
	Accuracy (%) ^c	RSD < 5		2.55
	Accuracy (% recovery)	100 ± 5		104.40
Vitamin AD ^b	Method precision (%) ^d	RSD < 5	3.17	1.37
	Accuracy (%) ^d	RSD < 5	4.25	2.51
	Accuracy (% recovery)	100 ± 5	96.40	103.60

^aVitamin D₃.

^bVitamin D₂ and A-acetate.

^c6 sample preparations, three injections of each preparation.

^d3 sample preparations, three injection of each preparation.

96.40%, D₂ 103.60%) and value of R.S.D (Vigantol[®] D₃ 2.55%; Vitamin AD Slova-
kofarma[®] A-acetate 4.25%, D₂ 2.51%).

Practical Aspects of the SIC Separations

Easy transfer of separation of simple mixtures consisting of considerably different chemical substances from HPLC to the SIC systems could be pointed out, while monolithic columns with low resistance in reasonable range of flow rates (otherwise problems of leaking appeared) are used. On the other hand, low flow rates in separation on monolithic columns could cause decreasing separation quality. Compromise should be found to keep validation parameters in set limits and acceptable analysis time using flow rates not generating high back pressure in the flow system (mainly in the case of higher content of aqueous component in the mobile phase).

CONCLUSIONS

A novel low-pressure SIC method for the determination of vitamins (A-acetate, D₂ or D₃, and E-acetate) was developed and validated. Vitamins D₂ and D₃ were not separated simultaneously, but it was proved that the developed method is applicable for analysis of formulations containing one of these two forms of vitamin D without the need to use different separation conditions. In child drops, combinations of vitamins A and D₃ could be found; in ointment and capsules, combinations of vitamins A and D₂ are used. The SIC optimized separation with the monolithic column and UV spectrophotometric detection was applied for the determinations of vitamin D₃ in the pharmaceutical formulation Vigantol[®] and vitamins A and D₂ in the formulation Vitamin AD Slova-
kofarma[®] capsules using vitamin E-acetate as an internal standard.

The described method was validated using several validation parameters: peak asymmetry, resolution, and number of theoretical plates and HETP, repeatability, linearity, precision, and accuracy. All results were in good agreement with values set by validation authorities.

The SIC system compared to the HPLC shows higher versatility, lower price of the whole analytical equipment, easier optimization, and can provide sufficient separation of simple multi-component mixtures. Advantages of sequential injection chromatography, which enable the decrease of volume of mobile phase and waste generation, have also been pointed out.

REFERENCES

- Alvarez, J. C., and P. De Mazancourt. 2001. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of retinol, [alpha]-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human plasma with photodiode-array ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 755: 129–135.
- Chavéz-Servín, J. L., A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater. 2008. Vitamins A and E content in infant milk-based powdered formulae after opening the packet. *Food Chem.* 106: 299–309.
- Chavéz-Servín, J. L., A. I. Castellote, M. Rivero, and M. C. López-Sabater. 2008. Analysis of vitamins A, E and C, iron and selenium contents in infant milk-based powdered formula during full shelf-life. *Food Chem.* 107: 1187–1197.
- Chen, H., L. F. McCoy, R. L. Schleicher, and C. M. Pfeiffer. 2008. Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) and 25-hydroxyvitamin D₂ (25OHD₂) in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method. *Clin. Chim. Acta* 391: 6–12.
- Cheng, J., and P. Jandik. 2008. New type of microfabricated carbon electrodes for high-performance liquid chromatography-Amperometric detection of fat-soluble vitamins and antioxidants. *J. Chromatogr. A* 1198–1199: 148–153.
- Chocholouš, P., P. Solich, and D. Šatinský. 2007. An overview of sequential injection chromatography. *Anal. Chim. Acta* 600: 129–135.
- Council of Europe (EDQM). 2007. *European pharmacopoeia*. 6th ed. Strassbourg, France, 72.
- Escrivá, A., M. J. Esteve, R. Farré, and A. Frigola. 2002. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 947: 313–318.
- Gomis, D. B., M. P. Fernández, and M. D. Gutiérrez Alvarez. 2000. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 891: 109–114.
- Heudi, O., M. J. Trisconi, and C. J. Blake. 2004. Simultaneous quantification of Vitamins A, D₃ and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1022: 115–23.
- International Conference on Harmonization (ICH), Q2 (R1): *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 1997. US FDA Federal Register 62(96): 27463–27467.
- Karppi, J., T. Nurmi, B. Olmedilla-Alonso, F. Granado-Lorencio, and K. Nyssonen. 2008. Simultaneous measurement of retinol, [alpha]-tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *J. Chromatogr. B* 867: 226–232.
- Kienen, V., W. F. Costa, J. V. Visentainer, N. E. Souza, and C. C. Oliveira. 2008. Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement. *Talanta* 75: 141–146.
- Krčmová, L., L. Urbánek, D. Solichová, M. Kašparová, H. Vlčková, B. Melichar, L. Sobotka, and P. Solich. 2009. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *J. Sep. Sci.* 32: 2804–2811.
- Mata-Granados, J. M., M. D. Luque de Castro, and J. M. Quesada. 2008. Inappropriate serum levels of retinol, [alpha]-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D₃ and 24,25 dihydroxyvitamin D₃

- levels in healthy Spanish adults: Simultaneous assessment by HPLC. *Clin. Biochem.* 41: 676–680.
- Qian, H., and M. Sheng. 1998. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *J. Chromatogr. A* 825: 127–133.
- Quesada, J. M., J. M. Mata-Granados, and M. D. Luque de Castro. 2004. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 89–90: 473–477.
- Růžička, J., and G. D. Marshall. 1990. Sequential injection: A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta* 237: 329–343.
- Salo-Vaananen, P., V. Ollilainen, P. Mattila, K. Lehtikainen, E. Salmela-Molsa, and V. Piironen. 2000. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food Chem.* 71: 535–543.
- Šatinský, D., P. Solich, P. Chocholouš, and R. Karlíček. 2003. Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Anal. Chim. Acta* 499: 205–214.
- Urbánek, L., D. Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, I. Svobodová, and P. Solich. 2006. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal. Chim. Acta* 573–574: 267–272.

13.4 Urinary Neopterin, Serum Retinol, alpha-tocopherol and Homocysteine in Breast Cancer Patients During Treatment with Bevacizumab and Chemotherapy

B. Melichar, H. Kalabova, L. Krcmova, M. Kasparova, J. Plisek, R. Hyspler, H. Studentova,
M. Zezulova, P. Holeckova, M. Pecka and D. Solichova

Pteridines, 21, 4, 87-93, 2010 (Citováno–1, IF₂₀₁₀–0,404)

Pteridines

Vol. 21, 2010, pp. 87 - 93

Urinary Neopterin, Serum Retinol, α -tocopherol and Homocysteine in Breast Cancer Patients During Treatment with Bevacizumab and Chemotherapy

Bohuslav Melichar^{1,5}, Hana Kalábová², Lenka Krcmová^{3,6}, Markéta Kašparová^{3,6}, Jirí Plíšek^{3,6}, Radomír Hyšpler¹, Hana Študentová¹, Michaela Zezulová¹, Petra Holecková⁵, Miroslav Pecka⁴, Dagmar Solichová¹

¹Department of Oncology, Palacký University Medical School Teaching Hospital, Olomouc, and Departments of ²Oncology & Radiotherapy, ³Gerontology & Metabolic Care, ⁴Hematology and ⁵Institute of Experimental Neurosurgery, Charles University Medical School Teaching Hospital, Hradec Králové, ⁶Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Czech Republic

Date received: 2010/10/23

Abstract

Bevacizumab, monoclonal antibody targeting vascular endothelial growth factor, is effective in different tumors, including colorectal carcinoma, non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma and breast cancer. Increased serum or urinary concentrations of neopterin, an indicator of systemic immune response, have been described in patients with tumors of different primary locations, and further increase has been observed during anticancer therapy. An increase of urinary neopterin has been described after administration of cytokines, cytotoxic chemotherapy, or external beam radiation, but less is known about the effects of targeted agents on systemic immune response. We have studied serum homocysteine, C-reactive protein, α -tocopherol and retinol, and urinary neopterin in patients with metastatic breast cancer treated with bevacizumab, taxane and carboplatin. Homocysteine and C-reactive protein were determined immunochemically. α -tocopherol, retinol and urinary neopterin were determined by high performance liquid chromatography. Homocysteine, C-reactive protein and urinary neopterin decreased, while retinol and α -tocopherol increased during the therapy. In conclusion, the treatment of patients with metastatic breast cancer with bevacizumab, taxane and carboplatin resulted in the suppression of systemic inflammatory and immune response. The suppression of systemic inflammatory and immune response was associated with an increase in serum vitamin concentrations.

Key words: α -tocopherol; bevacizumab; C-reactive protein; homocysteine; neopterin; retinol

Introduction

The advent of targeted agents has changed the landscape of medical oncology, resulting in significant improvement of survival of patients with a wide range of malignant disorders, including the most common cancers, e.g. breast carcinoma. Targeted agents exert antitumor activity through the inhibition of a defined pathway(s) involved in cancer progression or metastasis, and most agents inhibit tumor growth through more than one mechanism, acting on multiple molecular targets. In general, targeted agents are less toxic and better tolerated than conventional cytotoxic agents. On the other hand, a new spectrum of side effects has emerged. Many of these side effects have only limited

immediate impact on the patients, but may lead to significant chronic toxicity. Prominent among these side effects are changes in parameters determining cardiovascular risk, including hypertension, hyperlipidemia, impaired glucose tolerance and hypercholesterolemia.

Administration of anticancer agents is associated with oxidative stress. Oxidative stress plays an important role in atherosclerosis as atherogenic potential of serum lipids is dependent on oxidation (1) and is affected by liposoluble antioxidants (2). Moreover, antioxidant administration may retard atherosclerosis (3). With the remarkable improvement of long-term prognosis of patients with metastatic breast carcinoma, chronic effects of treatment on cardiovascular system may become an important consideration. Risk factors

Correspondence to: Bohuslav Melichar M.D., Ph.D., Professor and Head, Department of Oncology, Palacký University Medical School & Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic, phone: +420-588444288; fax: +420-588442522; e-mail: bohuslav.melichar@fnol.cz

Pteridines/Vol. 21/No. 4

of atherosclerosis are complex, and along with hypertension or hypercholesterolemia include high serum concentrations of homocysteine, C-reactive protein (CRP), neopterin or parameters of oxidative stress (4). The effect of anticancer therapy on laboratory parameters associated with the risk of atherosclerosis, e.g. serum lipids, has been best defined for hormonal agents (5, 6), and less is known about the effect of targeted agents or chemotherapy on serum cholesterol or other parameters of cardiovascular risk.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a cytokine that plays fundamental role in angiogenesis and tumor progression. VEGF also represents an important therapeutic target, and the monoclonal antibody against VEGF, bevacizumab, is currently component of standard combination therapy in different tumors, including metastatic colorectal carcinoma, non-small cell lung carcinoma, renal cell carcinoma and breast carcinoma (7-9). With regard to risk factors of atherosclerosis, VEGF inhibition causes hypertension (10) and proteinuria (11). Less is known about the effects of VEGF inhibition or combination therapy on serum parameters indicative of the risk of atherosclerosis. Recently, we have described a decrease of serum cholesterol, homocysteine and CRP concentrations and increased serum retinol in patients with metastatic colorectal carcinoma treated with bevacizumab combined with oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (12). In patients treated with combination therapy, it is difficult to discern the effect of targeted agent and cytotoxic chemotherapy. Evaluation of the combination of targeted agent with different cytotoxic drugs could be helpful to understand the effects of both therapeutic components.

In the present study, we have evaluated urinary neopterin, serum CRP, α -tocopherol, retinol and homocysteine during therapy with bevacizumab combined with taxanes and carboplatin in patients with metastatic breast carcinoma.

Material and Methods

Ten patients with metastatic breast carcinoma, aged 48 ± 14 (range 30 - 72) years, were included in the study. The patients were treated with combination of bevacizumab (10 mg/kg) every two weeks, and paclitaxel (90 mg/m²) and carboplatin (area under the curve 2) every week. In one patient allergic to paclitaxel, weekly docetaxel (40 mg/m²) was used. In all patients, neopterin determination was performed in urine samples after the patient consent before and during therapy.

Blood samples were taken before the start of therapy and on weekly visits during the treatment.

Hemoglobin was measured by a photometric method with sodium lauryl sulfate using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). Homocysteine concentration was determined immunochemically (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). CRP and uric acid were determined using particle-enhanced immunoturbidimetric assay and uricase method, respectively, as commercially available on MODULAR analyzer (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland).

Serum α -tocopherol and retinol were determined before and during the therapy using high performance liquid chromatography as described (13). Blood samples were drawn from a peripheral vein after an overnight fast. The samples were transferred immediately to the laboratory, centrifuged (2000 x g, 10 minutes, 4°C), the serum was separated and frozen at -20°C until analysis. In the liquid-liquid extraction procedure, 500 μ L of serum was de-proteinized by cool ethanol denatured with 5 % methanol (500 μ L, 5 minutes, 4°C). Subsequently, 2 500 μ L of n-hexane was added to this mixture and extracted for 5 minutes by a vortex apparatus. After centrifugation (2000 x g, 10 minutes, 0°C), the aliquot (2 000 μ L) of the clean extract was separated and evaporated in an AD 5301 concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany; 45°C). The residue was dissolved in 400 μ L methanol and analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography using the external standard calibration. The analyses were performed using the Perkin Elmer high performance liquid chromatography set (Norwalk, CT, USA) comprising a LC 200 pump, a LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of α -tocopherol and retinol was performed using the Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm monolithic columns (Merck, Darmstadt, Germany). As the mobile phase 100 % methanol was used at the flow rate of 2.5 mL.min⁻¹ and column pressure 3.3 MPa. The block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume was 50 μ L. The detection of α -tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and at 325 nm, respectively.

Early urine samples were collected and stored at -20°C until analysis. Urinary neopterin was determined using modification of the method described earlier (14). After centrifugation (45 seconds, 12000 x g) and diluting 100 μ L of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium-EDTA per liter, the samples were filtered using Microtiter, AcroPrep 96 Filter Plate 0.2 μ m/ 350 μ l, Pall Life Science (Ann Arbor, MI, USA) and Vacuum manifold

(Pall Life Science), and then injected onto a column. Neopterin was determined using high performance liquid chromatography system Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) composed from Rack changer/C - special autosampler for micro titration plates, Degasser DGU-20A5, 2 Liquid chromatograph

Results

At baseline, mean CRP and neopterin concentrations were above, hemoglobin, retinol and α -tocopherol were below, and homocysteine and uric acid were within (Table 1) the normal range observed in

Table 1.: Homocysteine, C-reactive protein, uric acid, retinol, alpha-tocopherol and urinary neopterin during the therapy

visit	time (days)	n	hemoglobin (g/L)	homocysteine (μ mol/L)	CRP (mg/L)	uric acid (μ mol/L)	retinol (μ mol/L)	alpha-tocopherol (μ mol/L)	neopterin (μ mol/mol creatinine)
1	0 \pm 0	10	127 \pm 17	12.7 \pm 4.1	38 \pm 56	234 \pm 80	1.05 \pm 0.45	20.7 \pm 5.2	223 \pm 89
2	7 \pm 0	10	125 \pm 19	10.8 \pm 2.5	27 \pm 47	218 \pm 74	1.30 \pm 0.42*	22.6 \pm 4.8	182 \pm 70*
3	14 \pm 1	10	123 \pm 17*	10.6 \pm 2.7	10 \pm 13*	204 \pm 48	1.44 \pm 0.39*	21.8 \pm 4.9	250 \pm 77
4	23 \pm 3	8	120 \pm 22	10.9 \pm 3.0	5 \pm 4*	240 \pm 56	1.58 \pm 0.42*	25.6 \pm 2.3	146 \pm 55*
5	31 \pm 4	8	117 \pm 13*	12.2 \pm 3.2	9 \pm 9	219 \pm 36	1.34 \pm 0.46	23.8 \pm 4.4	191 \pm 65
6	38 \pm 4	6	114 \pm 14*	10.2 \pm 1.9	8 \pm 10	199 \pm 37	1.16 \pm 0.27	19.8 \pm 3.8	201 \pm 78
7	47 \pm 4	8	114 \pm 15	9.3 \pm 2.5*	11 \pm 17	208 \pm 39	1.24 \pm 0.33	23.1 \pm 3.1	259 \pm 95
8	54 \pm 3	7	110 \pm 12*	10.2 \pm 3.5	7 \pm 9*	245 \pm 53	1.20 \pm 0.50	22.0 \pm 2.2	167 \pm 49
9	63 \pm 7	8	112 \pm 14	9.8 \pm 3.7	8 \pm 6*	204 \pm 30	1.35 \pm 0.55	23.4 \pm 4.7*	256 \pm 70
10	70 \pm 7	7	112 \pm 15*	9.5 \pm 2.7*	5 \pm 5	220 \pm 70	1.36 \pm 0.51	22.0 \pm 3.5	202 \pm 25
11	82 \pm 11	8	112 \pm 10	10.0 \pm 2.9	7 \pm 11*	232 \pm 34	1.31 \pm 0.64	22.1 \pm 4.3	193 \pm 45
12	94 \pm 15	8	114 \pm 6*	9.7 \pm 3.0	7 \pm 6	229 \pm 44	1.51 \pm 0.47	24.5 \pm 2.9	210 \pm 110
13	102 \pm 16	6	110 \pm 9*	9.7 \pm 2.8	6 \pm 5	258 \pm 70	1.30 \pm 0.50	23.0 \pm 4.0	274 \pm 146
14	109 \pm 18	8	110 \pm 12*	9.5 \pm 3.9	12 \pm 18	241 \pm 57	1.22 \pm 0.30	22.8 \pm 2.9	233 \pm 73
15	116 \pm 18	5	118 \pm 7	9.3 \pm 3.0	7 \pm 6	212 \pm 33	1.31 \pm 0.33	24.2 \pm 4.8	256 \pm 97

Shown are the mean \pm standard deviation.* $p < 0.05$.

Pumps LC-20 AB, Auto sampler SIL-20 AC, Column Oven CTO-20AC Thermostat, Fluorescence detector RF-10AXL, Diode array detector SPD-M20A and communications bus module CBM-20A. Phosphate buffer 15 mmol/L, pH 6.4, with flow rate 0.8 ml/min was used as mobile phase. Separation was performed using hybrid analytical column Gemini Twin 5 μ , C18, 150 \times 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA USA) at 25°C, injection volume was 1 μ L. Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission wavelengths). Creatinine was monitored simultaneously in the same urine specimen with diode array detector at 235 nm. Time of analysis for urine neopterin and creatinine was 10 minutes and the analytes were quantified by external standard calibration. The neopterin concentrations were expressed as neopterin to creatinine ratio (μ mol/mol creatinine).

Differences during therapy were evaluated using the Wilcoxon paired test. Correlations were examined using Spearman's rank correlation coefficient. The survival of patients was analyzed by the Kaplan-Meier method, and survival of patients with laboratory parameters below or above median was compared by the log-rank test. The decision on statistical significance was based on $p = 0.05$ level. The analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

healthy subjects or patients with early breast carcinoma (15).

Compared to pre-treatment (baseline) concentrations, homocysteine, CRP and urinary neopterin decreased, while retinol and α -tocopherol increased during the therapy. A gradual decrease of hemoglobin concentrations was also observed. Serum uric acid concentrations remained constant. Statistically significant ($p < 0.05$) decrease was observed for serum homocysteine at visits 7 and 10, for CRP at visits 3, 4, 8, 9 and 11, and for urinary neopterin concentrations at visits 2 and 4 (Table 1). Retinol concentrations were significantly increased at visits 2 through 4 and α -tocopherol was significantly increased at visit 9. After 4 months, only 5 patients were still on treatment and evaluable.

Significant correlations between the parameters investigated were observed. At visit 1, a significant negative correlation was observed between CRP and hemoglobin ($r_s = -0.72$; $p < 0.05$; Figure 1), at visit 2 significant negative correlation were observed between CRP and retinol ($r_s = -0.76$; $p < 0.05$), CRP and α -tocopherol ($r_s = -0.67$; $p < 0.05$), and a significant correlation was observed between retinol and α -tocopherol ($r_s = 0.72$; $p < 0.05$). A significant negative correlation between retinol and CRP ($r_s = -0.75$; $p < 0.05$) and a positive correlation between α -tocopherol and hemoglobin ($r_s = 0.81$; $p < 0.05$) were also observed at visit 3. No other significant correlations

cysteine may behave as a tumor marker, and a decrease in homocysteine concentrations observed in cancer patients may reflect tumor control by the therapy.

Present data demonstrating a decrease of CRP and neopterin indicate suppression of systemic inflammatory and immune response during therapy with bevacizumab and cytotoxic agents. Patients with advanced cancer have laboratory evidence of activation of acute phase response. CRP is the parameter most widely used to assess acute phase response. CRP concentrations are also increased in the serum of patients with atherosclerosis, and elevated serum CRP levels predict the risk of future cardiovascular events (23-25). Increased urinary neopterin concentrations in cancer patients are also well documented (26, 27). An increase of serum or urinary neopterin has been described after systemic administration of different cytokines (26) or after chemotherapy (28, 29), but there is so far only limited information about neopterin in patients treated with targeted agents. Similarly to CRP, urinary neopterin is increased in atherosclerosis and predicts the risk of cardiac events (30). In patients with tumors of different primary locations, increased serum or urinary neopterin concentrations were associated with poor prognosis (16, 26, 27). In earlier studies, correlations were observed between lower numbers or impaired function of lymphocytes or dendritic cells and neopterin concentrations (31-34). Thus, increased neopterin concentrations are thought to reflect immune dysregulation (26), similar to CRP, and both these laboratory parameters reflect disease activity. As in the case of homocysteine, decreased concentrations of neopterin or CRP may be the result of tumor control and, in addition, could reflect an environment more favorable for host immune response against the tumor.

The decrease of inflammatory response reflected in lower CRP and neopterin concentrations was in the present cohort of patients associated with increased concentrations of retinol and α -tocopherol. Vitamin E represents major antioxidant in the serum (35). The term vitamin E denotes several naturally occurring tocopherols and tocotrienols, but α -tocopherol is responsible for most of vitamin E activity in animal tissues. Disorders of antioxidant balance involving vitamin E may also be thought to be involved in the toxicity associated with radiotherapy (36), or chemotherapy (37). In general, a decrease in serum α -tocopherol has been reported during systemic chemotherapy (38-41). Retinol is a major circulating form of vitamin A that has also antioxidant activity and plays an essential role in many physiological functions, including vision, growth, development and differentiation, and immune response (35). Serum concentrations of α -tocopherol and retinol are significantly decreased in patients with

advanced cancer (42, 43), and it has been demonstrated earlier that this decrease correlates with the systemic inflammatory response (42, 44). It has been demonstrated earlier that an effective anti-tumor therapy could result in increased serum retinol and α -tocopherol concentrations (12, 45), and the suppression of inflammatory response has been invoked as a possible explanation of this phenomenon. Significant negative correlation was observed in the present cohort between CRP and retinol concentrations. In an earlier study, negative correlation was also observed between neopterin and α -tocopherol (46). The absence of such correlation in the present cohort may be explained by the low number of patients examined. An increase of dietary vitamin intake could also result in higher retinol or α -tocopherol concentrations. However, the rise of serum retinol was observed already one week after the start of treatment that is emetogenic and would acutely result in a decrease of food intake. Because of the timing of the increase and the consistent presence of negative correlation between CRP and retinol, the suppression of systemic inflammatory response resulting from tumor control appears as a likely cause of the increased serum retinol concentrations observed in the present study.

In conclusion, serum homocysteine, CRP and urinary neopterin decreased while retinol and α -tocopherol increased in metastatic breast cancer patients during treatment with bevacizumab and chemotherapy. Present data demonstrate that the treatment may have also favorable effects on the risk of atherosclerosis.

Acknowledgements

Supported by the grants of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR9096-4, NS10286-3, Research Projects MZO 00179906 and MSM 6198959216.

References

- 1 Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997;95:1062-1071.
- 2 Keaney JF, Guo Y, Cunningham D, Swaery GT, Xu A, Vita JA. Vascular incorporation of alpha -tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *J Clin Invest* 1996;98:386-394.
- 3 Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, et al. Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of

- carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2000;248:377-386.
- 4 Ridker PM. Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med* 2000;45:391-419.
 - 5 Nabholz JM, Gligorov J. Cardiovascular safety profiles of aromatase inhibitors. A comparative review. *Drug Safety* 2006;29:785-801.
 - 6 Esteva FJ, Hortobagyi GN. Comparative assessment of lipid effects of endocrine therapy for breast cancer: implications for cardiovascular disease prevention in postmenopausal women. *Breast* 2006;15:301-312.
 - 7 Hurwitz H, Febrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
 - 8 Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007;370:2103-2111.
 - 9 Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666-2676.
 - 10 Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H, Levy BI. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann Oncol* 2008;19:927-934.
 - 11 Hillege HL, Fidler V, Diercks GFH, et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and non-cardiovascular mortality in general population. *Circulation* 2002;106:1777-1782.
 - 12 Melichar B, Kalabova H, Kromova L, et al. Serum homocysteine, cholesterol, retinol, alpha-tocopherol, glycosylated hemoglobin and inflammatory response during therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin. *Anticancer Res* 2009;29:4813-4820.
 - 13 Urbanek L, Solichova D, Melichar B, Dvorak J, Svobodova I, Solich P. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* 2006;573-574:267-272.
 - 14 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M, Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 2006;21:190-198.
 - 15 Melichar B, Kalabová H, Křemová L, et al. Effect of aromatase inhibitors on lipid metabolism, inflammatory response and antioxidant balance in patients with breast carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29:3337-3346.
 - 16 Murr C, Berant A, Widschwendter M, Heim K, Schröcksnadel H, Fuchs D. Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clin Chem* 1999;45:1998-2004.
 - 17 Sarwar AB, Sarwar A, Rosen BD, Nasir K. Measuring subclinical atherosclerosis: is homocysteine relevant? *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1667-1677.
 - 18 Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: A review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4:143-149.
 - 19 Schroecksnadel K, Frick B, Fiegl M, Winkler C, Denz HA, Fuchs D. Hyperhomocysteinemia and immune activation in patients with cancer. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:47-53.
 - 20 Sun CF, Haven TR, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and declines upon cell death: a potential new tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002;321:55-62.
 - 21 Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002;322:21-28.
 - 22 Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, Schennach H, Fuchs D. Homocysteine accumulates in supernatants of stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2003;134:53-56.
 - 23 Zacho J, Tybjaerg-Tanssen A, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Nordestgaard BG. Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. *N Engl J Med* 2008;359:1897-1908.
 - 24 Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-843.
 - 25 Pai JK, Pischon T, Ma J, et al. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 2004;351:2599-2610.
 - 26 Melichar B, Solichová D, Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:240-252.
 - 27 Reibnegger G, Fuchs D, Fuith LC, et al. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev* 1991;15:483-490.
 - 28 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Cermanova M, Urmínska H, Ryska A. Systemic immune activation, anemia and thrombocytosis in breast cancer patients treated by doxorubicin and paclitaxel. *Pteridines* 2006;17:107-114.
 - 29 Melichar B, Urbanek L, Křemova L, et al. Urinary

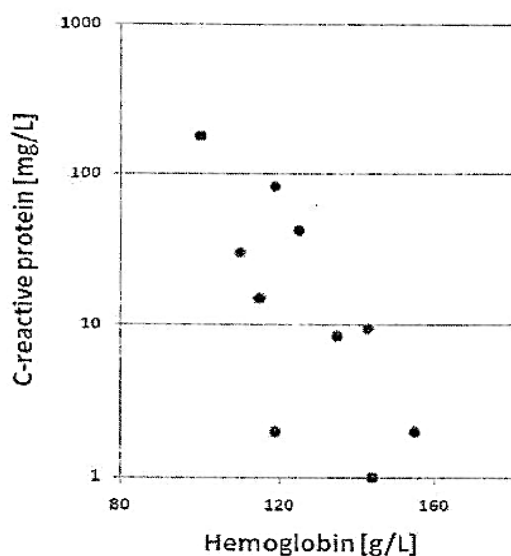


Figure 1: Correlation between baseline C-reactive protein (CRP) and hemoglobin concentrations ($r_s = -0.72$; $p < 0.05$; note log-scale of CRP concentrations!)

between the parameters investigated were observed.

Two patients were alive at the time of the analysis, more than two years after the start of treatment. The survival of these patients was censored at 930 days. Days of survival calculated from the sample date significantly correlated at visit 1 with hemoglobin ($r_s = 0.74$; $p < 0.05$), α -tocopherol ($r_s = 0.84$; $p < 0.005$) and inversely with CRP ($r_s = -0.73$; $p < 0.05$). Survival calculated from visit 2 correlated with hemoglobin ($r_s = 0.67$; $p < 0.05$), α -tocopherol ($r_s = 0.75$; $p < 0.05$) and negatively with CRP ($r_s = -0.88$; $p < 0.001$). The survival (calculated from the sample date) of patients with serum α -tocopherol above median at visit 1 (19.4 $\mu\text{mol/L}$) was significantly longer compared to patients with serum α -tocopherol below the median (median 910 vs. 293 days, $p < 0.05$). The survival of patients with serum α -tocopherol above median at visit 2 (23 $\mu\text{mol/L}$) was also longer (median 903 vs. 286 days, $p < 0.05$) as was the survival of patients with CRP below median (5 mg/L) at this visit (median 903 vs. 309 days, $p < 0.05$).

Discussion

As expected, patients with metastatic breast cancer had CRP and neopterin concentrations above as well as hemoglobin, retinol and α -tocopherol concentrations below the values observed in healthy subjects or

patients with early breast carcinoma (15). The finding of higher urinary neopterin concentrations is in line with earlier studies reporting increased urinary neopterin in patients with metastatic breast cancer (16). Increased urinary neopterin concentrations were also reported to represent an independent prognostic indicator for overall survival in patients with breast cancer (16).

In the present study, we have observed a decrease of serum homocysteine, CRP and urinary neopterin as well as an increase of serum retinol and α -tocopherol in patients with metastatic breast carcinoma treated with the combination of bevacizumab, taxane and platinum. The number of patients was limited and so was the power to detect significant differences during the treatment. Nevertheless, statistically significant differences demonstrating a decrease in systemic inflammatory and immune response and serum homocysteine were evident even in a cohort of limited size. From a point of view of risk factors of atherosclerosis, the present analysis indicates that besides unfavorable effects on hypertension or proteinuria, combined treatment with bevacizumab also has favorable effects on laboratory parameters associated with the risk of atherosclerosis. However, because of limited number of patients included in the present investigation the results have to be regarded as only exploratory. In future studies, the effect of bevacizumab in combination with chemotherapy on systemic immune activation should be assessed on a larger patient cohort.

Spearman's rank correlation is usually not used to study association between laboratory parameters and survival, and the present analysis with 2 patients being still alive at the time of analysis must also be regarded as exploratory. Prognostic significance of α -tocopherol was also indicated by the results of the standard log-rank test. These results indicate possible prognostic significance of hemoglobin, CRP and α -tocopherol in this group of patients that should be confirmed using standard statistical methods in a larger cohort.

Only a slight decrease of serum homocysteine was observed in the present cohort. A decrease of serum homocysteine and CRP has been recently reported in patients with metastatic colorectal carcinoma treated with the combination of bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and folinic acid (12). Homocysteine is an intermediate in the metabolism of methionine. Increased serum concentration of homocysteine may be caused by a deficiency of folate or vitamin B12. Increased homocysteine concentrations are a well established risk factor of atherosclerosis and thrombosis (17, 18). Hyperhomocysteinemia has also been documented in cancer patients (19-21). Homocysteine may be produced by both tumor cells as well as activated leukocytes (22). In cancer patients, serum homo-

13.5 Intestinal permeability, vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib

B. Melichar, J. Dvorak, H. Kalabova, R. Hyspler, L. Krcmova, M. Kasparova, L. Urbanek and D. Solichova

Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 70, 3, 180-187, 2010
(Citováno–3, IF2010–1,629)

ORIGINAL ARTICLE

Intestinal permeability, vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib

BOHUSLAV MELICHAR^{1,4}, JOSEF DVOŘÁK¹, HANA KALÁBOVÁ¹,
RADOMÍR HYŠPLER², LENKA KRČMOVÁ^{2,3}, MARKĚTA KAŠPAROVÁ^{2,3},
LUBOR URBÁNEK^{2,3} & DAGMAR SOLICHOVÁ²

Departments of ¹Oncology & Radiotherapy and ²Gerontology & Metabolic Care, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic, ³Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic and ⁴Department of Oncology, Palacký University Medical School & Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic

Abstract

Measurement of intestinal permeability represents one of the potential methods of noninvasive laboratory assessment of gastrointestinal toxicity of anticancer therapy. We have assessed intestinal permeability (by measuring absorption of lactulose, mannitol, and xylose), vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol in patients with non-small cell lung carcinoma or head and neck carcinomas treated with gefitinib. Lactulose, mannitol and xylose were determined by capillary gas chromatography, and retinol, alpha-tocopherol, retinyl stearate and retinyl palmitate were determined by high-performance liquid chromatography. Compared to healthy controls, patients had significantly increased lactulose/mannitol ratio and lower postprandial retinyl palmitate and retinyl stearate concentrations. Compared with pre-treatment values, xylose absorption was decreased and lactulose/mannitol and lactulose/xylose ratios were increased during the therapy. A significant decrease of serum alpha-tocopherol was evident throughout the course of therapy. In contrast, only minor alterations of vitamin A absorption were observed. In conclusion, an alteration in intestinal permeability reflected in increased lactulose/mannitol and lactulose/xylose ratios was observed during gefitinib therapy. Potential association between decreased serum alpha-tocopherol concentrations and the toxicity of gefitinib therapy should be further investigated.

Key Words: Lactulose, retinol, vitamin E, xylose

Introduction

Inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGFR), including low molecular weight inhibitors erlotinib and gefitinib, have significant activity in a wide range of malignant tumors [1]. Encouraging data have been reported for gefitinib in the therapy of non-small cell lung carcinoma [2-4] and head and neck carcinomas [5]. The therapy with EGFR inhibitors is generally well tolerated, but, similarly to other biological agents, EGFR inhibitors have a peculiar toxicity profile that reflects multiple physiological roles of the receptor and its endogenous ligands. Skin toxicity is the most important side effect of EGFR blockade [6,7], but gastrointestinal toxicity is also very common in patients treated with anti-EGFR agents, including gefitinib [4,8].

Gastrointestinal toxicity is, in general, one of the most common side effects of anticancer therapy. The symptoms of gastrointestinal toxicity result from the damage to the gastrointestinal mucosa induced by anticancer agents, and depending on the part of the gastrointestinal tract affected, gastrointestinal toxicity manifests as sore mouth, dysphagia, dyspepsia, diarrhea, abdominal cramping, or rectal bleeding. In contrast to the toxicity affecting other organ systems that can be usually strictly defined by changes of laboratory parameters, the diagnosis and evaluation of the gastrointestinal toxicity is still mostly dependent on the assessment of symptoms reported by the patient.

Intestinal permeability describes the barrier function of bowel mucosa separating the internal milieu from the outside environment [9], and measurement

Correspondence: Bohuslav Melichar, MD, PhD, Professor and Head, Department of Oncology, Palacký University Medical School & Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic. Tel: +420 588444288. Fax: +420 588442522. E-mail: bohuslav.melichar@fnol.cz

(Received 23 June 2009; accepted 16 January 2010)

Table I. Characteristics of the patients.

Patient	Sex	Age (years)	Diagnosis	Previous antitumor therapy	Duration of gefitinib treatment (months)
1	M	67	NSCLC	pacl+carbo+VP+clodr	15
2	F	54	NSCLC	pacl+carbo	19
3	M	60	NSCLC	gem+DDP	35
4	M	62	NSCLC	EBR; pacl+carbo	12
5	F	49	NSCLC	EBR; gem+DDP; doc	4
6	M	66	NSCLC	EBR; gem+carbo	2
7	F	54	NSCLC	pacl+DDP+MMC+ifo	4
8	M	42	NSCLC	vin+ifo+DDP+clodr	1
9	M	50	NSCLC	EBR; gem+DDP	1
10	M	71	NSCLC	gem+DDP; vin+DDP	21
11	F	60	NSCLC	doc+DDP; gem+DDP	1
12	M	61	NSCLC	pacl+carbo	5
13	M	47	NSCLC	EBR; gem+DDP; doc	3
14	M	57	NSCLC	EBR; gem+carbo	7
15	M	48	HNC	EBR; pacl+carbo	5
16	M	50	HNC	EBR; pacl+carbo	10
17	M	63	HNC	EBR; pacl+carbo	1
18	M	51	HNC	EBR; doc	10
19	M	67	HNC	EBR; pacl+carbo	3
20	M	51	HNC	EBR; pacl+carbo	7
21	M	39	HNC	EBR; pacl+carbo	2

Carbo, carboplatin; clodr, clodronate; DDP, cisplatin; doc, docetaxel; EBR, external beam radiation; F, female; gem, gemcitabine; HNC, head and neck cancer; ifo, ifosfamide; M, male; MMC, mitomycin C; NSCL, non-small cell lung cancer; pacl, paclitaxel; vin, vinorelbine; VP, etoposide.

The results obtained in patients and controls were compared by Mann-Whitney U test, measurements before and during the treatment was compared by Wilcoxon signed rank test. The decisions regarding statistical significance was based on $p=0.05$ level. The analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Results

Compared to controls, patients had significantly higher xylose and lactulose absorption and significantly increased lactulose/mannitol ratio (Table II). No difference in the parameters of intestinal permeability was observed between patients with non-small

cell lung carcinoma or head and neck carcinomas (data not shown). Significant changes in the parameters of intestinal permeability were observed during gefitinib therapy. The number of patients studied obviously decreased with the course of time. After 5 months of therapy, only 9 patients remained on medication, precluding further statistical evaluation. When evaluated at intervals of 14–28 days, a significant decrease in xylose absorption was evident compared to baseline throughout the course of therapy with the exception of the last visit. A decrease in mannitol absorption was evident only at visits 2 and 3 approximately 3 and 5 weeks after the start of therapy. Mannitol excretion was sometimes not evaluable during the course of therapy because of high background mannitol concentrations. Lactulose

Table II. Intestinal permeability in controls, patients and during therapy with gefitinib.

Visit	Controls	p (controls vs. patients)	Patients						
			1 (baseline)	2	3	4	5	6	7
Time from the start of therapy (days)	NA		0	18±2	34±2	60±4	90±7	107±6	134±6
n	10		20	19	17	15	13	12	11
Xylose (%)	13.8±1.7	0.005	24.3±2.7	15.8±1.6*	11.7±1.9*	14.7±2.6*	13.4±1.8*	13.8±2.4*	16.7±2.4
Mannitol (%)	18.2±1.3	0.08	16.0±2.2	10.2±1.3*	8.5±2.0*	11.4±2.7	9.2±1.7	10.5±1.8	9.7±1.4
Lactulose (%)	0.32±0.02	0.02	0.73±0.17	0.67±0.12	0.64±0.12	0.88±0.20	0.67±0.15	0.93±0.17*	0.93±0.20*
LAMA ratio	0.02±0.003	0.003	0.06±0.01	0.15±0.07*	0.18±0.06*	0.10±0.02*	0.10±0.03	0.10±0.02*	0.22±0.15*
LAXY ratio	0.02±0.003	0.85	0.03±0.01	0.05±0.01*	0.17±0.08*§	0.07±0.02*	0.06±0.02*	0.08±0.02*	0.08±0.03*

Shown is the mean ± standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared to baseline; § $p < 0.05$ compared to visit 2. NA, not applicable.

excretion was increased only late during the course of treatment at visits 6 and 7, but lactulose/mannitol ratio was increased throughout the course of therapy with the exception of visit 5, and lactulose/xylose ratio was increased at every visit after the start of therapy. Lactulose/xylose ratio was also significantly higher at visit 3 compared to visit 2, but apart from the initial increase, no clear trend was evident in lactulose/mannitol or lactulose/xylose ratios during the observation period. Six patients were followed for more than 6 months, and no incremental trend of lactulose/mannitol and lactulose/xylose was observed in these patients beyond the initial rise. In one patient, the intestinal permeability could not be determined at the first visit because of insufficient urine collection of the patient, and this patient did not report for subsequent visits. In two patients, high background mannitol concentrations precluded baseline determination of mannitol absorption.

Serum alpha-tocopherol was not significantly different in patients compared to controls. No difference in serum alpha-tocopherol was observed between patients with non-small cell lung carcinoma or head and neck carcinomas (data not shown). On the other hand, a significant decrease in serum alpha-tocopherol was evident at the first visit after the start of therapy and continued throughout the course of treatment (Table III).

A marked and statistically significant difference was observed in postprandial retinyl palmitate and retinyl stearate concentration and in the postprandial increase of these esters between patients and controls (Table IV). In contrast, no significant changes were observed in the fasting or postprandial retinol concentrations, with the exception of decreased retinyl palmitate and retinyl stearate concentration observed at visit 2. No difference in vitamin A absorption was observed between patients with non-small cell lung carcinoma or head and neck carcinomas (data not shown).

Discussion

To the best of our knowledge, the present data are the first to suggest an effect of EGFR blockade on intestinal permeability and serum alpha-tocopherol. A marked decrease of xylose absorption and an

increase of lactulose/mannitol and lactulose/xylose ratio were observed during gefitinib treatment. No clear association was observed between the increase of intestinal permeability parameters and duration of gefitinib therapy. However, the absence of an association between duration of treatment and intestinal permeability may be obscured by the possible negative selection resulting from patient drop-out. A significant decrease of alpha-tocopherol was observed throughout the course of treatment, but significant changes in the parameters of vitamin A absorption were observed only at the visit approximately 3 weeks after the start of therapy.

The results of this study indicate the presence of alterations of gut function reflected in perturbations of both intestinal permeability and absorptive function in patients with non-small cell lung cancer or head and neck cancer even before the start of therapy with gefitinib. An increase of intestinal permeability (e.g. an increase of disaccharide/monosaccharide ratio) or a decrease in xylose absorption in cancer patients before the start of chemotherapy has been reported by other investigators [12,24]. The differences in baseline parameters of gut function in patients compared to controls could be explained partly by an association of increased intestinal permeability with malnutrition [25] that is frequent in patients with advanced tumors, specifically in patients with head and neck carcinomas or non-small cell lung carcinoma. Moreover, all patients had received earlier chemotherapy and some other therapies, e.g. bisphosphonates, known to affect intestinal permeability. The significance of increased xylose absorption in cancer patients compared to controls is uncertain as the evaluation of single-sugar absorption may be unreliable because of the possible effect of pre- and post-absorptive factors.

The principle of differential urinary excretion that represents the theoretical basis of the methods of intestinal permeability evaluation using a monosaccharide/disaccharide ratio presumes that pre- and post-absorptive factors have an equal effect on both the disaccharide (in our case lactulose) and monosaccharide (in our case mannitol or xylose) excretion [26], but there are experimental [27] as well as clinical [28] data indicating limitations of this concept. While

Table III. Serum alpha-tocopherol in controls, patients and during therapy with gefitinib.

Visit	Controls	<i>p</i> (controls vs. patients)	Patients						
			1 (baseline)	2	3	4	5	6	7
Time from the start of therapy (days)	NA		0	18±2	34±2	60±4	90±7	107±6	134±6
<i>n</i>			21	19	18	15	12	11	12
Alpha-tocopherol (µmol/l)	26.4±1.5	0.53	25.6±2.0	21.8±1.1*	19.2±1.1*	20.4±2.1*	19.5±2.4*	18.5±2.8*	17.8±1.7*

Shown is the mean ± standard error of the mean. **p* < 0.05 compared to baseline. NA, not applicable.

Table IV. Vitamin A absorption in controls, patients and during therapy with gefitinib.

Visit	Controls	<i>p</i> (controls vs. patients)	Patients						
			1	2	3	4	5	6	7
Time from the start of therapy (days)	NA		0	18±2	34±2	60±4	90±7	107±6	134±6
<i>n</i>			20	19	17	15	11	11	11
Retinol pretest (µmol/l)	2.00±0.14	0.32	1.95±0.22	2.07±0.22	1.71±0.21	1.62±0.23	1.68±0.21	1.89±0.32	1.73±0.33
Retinol posttest (µmol/l)	2.42±0.17	0.30	2.22±0.25	2.25±0.22	2.01±0.22	1.74±0.22	1.95±0.24	1.94±0.30	2.00±0.42
Retinol increase (µmol/l)	0.42±0.13	0.16	0.26±0.09	0.16±0.13	0.30±0.08	0.12±0.06	0.27±0.09	0.06±0.07	0.19±0.07
Retinyl palmitate pretest (µmol/l)	0.21±0.08	0.37	1.19±0.75	0.23±0.07*	0.39±0.09	0.15±0.07	0.34±0.14	0.50±0.20	0.37±0.16
Retinyl stearate pretest (µmol/l)	0.33±0.07	0.85	0.69±0.34	0.38±0.06	0.29±0.07	0.24±0.05	0.23±0.10	0.30±0.12	0.30±0.11
Retinyl palmitate posttest (µmol/l)	25.09±6.68	0.01	9.97±3.95	5.78±2.11*	7.14±3.54	6.51±2.47	8.27±3.50	6.68±3.82	8.64±3.40
Retinyl stearate posttest (µmol/l)	10.97±2.80	0.01	3.89±1.32	2.17±0.75*	3.21±1.58	2.41±0.97	3.34±1.44	2.96±1.68	3.31±1.27
Retinyl palmitate increase (µmol/l)	22.39±6.49	0.03	8.77±3.62	5.55±2.07	6.75±3.60	6.35±2.50	7.93±3.57	3.33±0.20	6.50±3.87
Retinyl stearate increase (µmol/l)	9.57±2.72	0.04	3.21±1.13	1.79±0.75*	2.92±1.61	2.17±0.97	3.11±1.47	6.18±3.82	2.49±1.43

Shown is the mean ± standard error of the mean. **p* < 0.05 compared to baseline. NA not applicable.

pre-absorptive factors, e.g. intestinal transit time, probably have no effect on monosaccharide/disaccharide ratio [27], important differences could be observed in renal handling resulting in the alteration of monosaccharide/disaccharide ratio [27,28]. None of the patients in the present cohort had overt renal disorder, but subclinical renal dysfunction could partly explain the differences observed between patients and controls. On the other hand, serum creatinine was stable during the observation period in all patients studied, and changes in renal function could therefore not explain the marked alterations of intestinal permeability parameters observed. Mannitol excretion was sometimes not evaluable because of high background mannitol concentrations, and lactulose/xylose ratio may thus be more reliable to assess the changes of intestinal permeability because it circumvents this problem by using xylose as reference monosaccharide.

Gastrointestinal toxicity has been reported after the administration of most cytotoxic or targeted biologic agents, including gefitinib. In a randomized study, diarrhea, the most prominent gastrointestinal side effect, was observed in 35% of patients treated with gefitinib (250 mg/day) compared with 25% of patients treated with docetaxel [4]. In a randomized trial in patients with head and neck carcinomas the rate of diarrhea in patients treated with gefitinib at the dose of 500 mg/day was 39% compared to 12% in patients treated with methotrexate [26]. In a cohort of patients with non-small cell lung cancer and poor performance status treated with gefitinib the incidence of diarrhea was 44% [8]. An increase of intestinal permeability has been described after administration of different cytotoxic drug or combination regimens [11–14]. An association has been observed between increased intestinal permeability and gastrointestinal side effects of chemotherapy,

e.g. diarrhea [14], but in most patients an increase of intestinal permeability indicates only subclinical damage to the gut mucosa. The data on the effect of targeted agents on intestinal function are limited. The significant increase of lactulose/mannitol and lactulose/xylose ratios observed in the present study indicates that intestinal damage is prevalent during the treatment with gefitinib, in agreement with clinical data demonstrating relatively high rates of gastrointestinal toxicity [4,8,29]. In an earlier study, gastrointestinal transit has been demonstrated to influence the pharmacokinetics of gefitinib [30]. Gefitinib absorption was not assessed in the present study, but future investigations should address whether changes in intestinal permeability resulting from chronic drug administration could have an effect on gefitinib absorption and pharmacokinetics, with possible implications for activity of the drug.

Compared to intestinal permeability, a predominantly passive process, vitamin A absorption assesses a different aspect of gut function, active uptake of nutrients. As a single parameter test, vitamin A absorption is more affected by pre- and post-absorptive factors. Only a few studies have evaluated vitamin A absorption and intestinal permeability in the same cohort of patients in patients with chemotherapy-induced diarrhea [15]. In an earlier report, increased lactulose/mannitol ratio was associated with decreased postprandial retinyl ester concentrations [15]. Vitamin A absorption is a complex multi-step process that encompasses the hydrolysis of ingested retinyl esters by pancreatic and intestinal brush border lipases, uptake and re-esterification of free retinol by enterocytes, incorporation of retinyl esters into chylomicrons and release into circulation [31]. In the present study, vitamin A absorption was not significantly affected by gefitinib therapy, but, given the wide range of values of postprandial retinyl ester concentrations, the number of patients examined was probably too small to exclude an effect of therapy on absorptive function. The processing in the gastrointestinal tract of vitamins A and E is very similar, but the absorption of vitamin E is less efficient compared to vitamin A [32]. Because of this less efficient absorption, vitamin E absorption may be more sensitive to disturbances of gut function, and a decrease of alpha-tocopherol could manifest even if vitamin A absorption is within the normal range. Moreover, in an experimental study, epidermal growth factor has been shown to affect the expression of alpha-tocopherol transfer protein [33], but the exact mechanism of the decrease of alpha-tocopherol in patients treated with gefitinib remains to be determined.

The finding of decreased serum alpha-tocopherol concentrations during gefitinib treatment is another observation of potential interest with regard to the toxicity of this targeted drug. It has been demonstrated

that serum concentrations of alpha-tocopherol are decreased in patients with advanced cancer [34–36], and both a decrease [37–40] as well as an increase [41] were described during cytotoxic chemotherapy. Low vitamin E intake or serum concentrations have been associated with toxicity of chemotherapy [41,42], and vitamin E administration has been shown to alleviate side effects of radiation or chemotherapy [18,20]. The decrease of vitamin E has also been linked to skin disorders [43]. Alpha-tocopherol is a major skin antioxidant [43], and lipid peroxidation is thought to play an important role in the pathogenesis of acne [44]. Alpha-tocopherol is secreted through sebaceous glands, and high concentrations are observed in the outer skin layers [45]. It is possible that the decrease of serum alpha-tocopherol observed during gefitinib therapy may play a role in the skin toxicity induced by this drug that may manifest as acneiform rash, xerosis, paronychia, hair changes or telangiectasia [6,7]. Further studies on a larger cohort of patients treated with anti-EGFR agents should investigate the association between skin toxicity and changes in vitamin E levels as well as the possibility of intervention by systemic or topical administration of this vitamin.

In conclusion, an alteration of intestinal permeability reflected in an increased lactulose/mannitol ratio was observed in patients treated with gefitinib. Serum alpha-tocopherol concentrations decreased during gefitinib therapy. The relation of the decrease of alpha-tocopherol to the toxicity of EGFR inhibitors should be further investigated.

Acknowledgements

Supported by a grant from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR9096-4 and Research Project MZO 00179906.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160–74.
- [2] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Mcleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2237–46.
- [3] Park J, Park BB, Kim JY, Lee SH, Lee SI, Kim HY, Kim JH, Park SH, Lee KE, Park JO, Kim K, Jung CW, Park YS, Im YH, Kang WK, Lee MH, Park K. Gefitinib (ZD1839) monotherapy as salvage regimen for previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4383–8.

- [4] Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, Wu YL, Li LY, Watkins CL, Sellers MV, Lowe ES, Sun Y, Liao ML, Osterlind K, Reck M, Armour AA, Shepherd FA, Lippman SM, Douillard JY. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372:1809–18.
- [5] Cohen EEW. Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24:2659–65.
- [6] Segært S, Van Cutsem E. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol* 2005;16:1425–33.
- [7] Segært S, Taberner J, Chosidow O, Dirschka T, Elsner J, Mancini L, Maughan T, Morere JF, Santoro A, Sobrero A, Van Cutsem E, Layton A. Management of skin reaction in cancer patients receiving epidermal growth factor receptor targeted therapies. *J Dtsch Dermatol Ges* 2005;3:599–606.
- [8] Wei Z, Mengzhao W, Li Z, Longyun L, Xiaoton Z. Evaluation of efficacy and safety of gefitinib as monotherapy in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer and very poor performance status. *BMC Res Notes* 2008;1:102.
- [9] DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:385–96.
- [10] Melichar B, Dvorak J, Hyspler R, Zadak Z. Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents. *Chemotherapy* 2005;51:336–8.
- [11] Parrilli G, Iaffaioli RV, Capuano G, Budillon G, Bianco AR. Changes in intestinal permeability to lactulose by cytotoxic chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 1982;66:1435–6.
- [12] Parrilli G, Iaffaioli RV, Martorano M, Cuomo R, Tafuto S, Zampino MG, Budillon G, Bianco AR. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:3689–91.
- [13] Kohout P, Cerman J, Bratova M, Zadak Z. Small bowel permeability in patients with cytostatic therapy. *Nutrition* 1999;15:546–9.
- [14] Daniele B, Secondulfo M, De Vivo R, Pignata S, De Magistris L, Delrio P, Palaia R, Barletta E, Tambaro R, Carratu R. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:228–30.
- [15] Melichar B, Dvorak J, Krcmova L, Hyspler R, Urbánek L, Solichova D. Intestinal permeability and vitamin A absorption in patients with chemotherapy-induced diarrhea. *Am J Clin Oncol* 2008;31:580–4.
- [16] Basu TK, Donaldson D. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:957–79.
- [17] Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr* 2005;93:153–74.
- [18] Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S, Lefaix JL. Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 2003;21:2545–50.
- [19] Erhola M, Nieminen MM, Ojala A. Human plasma antioxidant capacity during radiotherapy for lung cancer: a clinical study. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:325–30.
- [20] Pace A, Savarese A, Picardo M, Maresca V, Pacetti U, Del Monte G, Biroccio A, Leonetti C, Jandolo B, Cognetti F, Bove L. Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003;21:927–31.
- [21] Urbanek L, Solichova D, Melichar B, Dvorak J, Svobodova I, Solich P. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* 2006;573–574:267–72.
- [22] 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 alphatocopherol, retinol and retinyl esters in human serum using a monolithic column for the monitoring of anticancer therapy side effects. *J Sep Sci* 2006;29:2485–93.
- [23] 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* 2006;17:145–53.
- [24] Sundstrom GM, Wahlin A, Nordin-Anderson I, Suhr OB. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 1998;61:250–4.
- [25] van der Hulst RRWJ, von Meyenfeldt MF, van Kreel BK, Thunnissen FBJM, Brummer RJM, Arends JW, Soeters PB. Gut permeability, intestinal morphology, and nutritional depletion. *Nutrition* 1998;14:1–6.
- [26] Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995;108:1566–81.
- [27] van Nieuwenhoven MA, de Swart EAM, van Eijk HM, Deutz NEP, Brouns F, Brummer RJM. Effect of pre- and post-absorptive factors on the lactulose/rhamnose gut permeability test. *Clin Sci (Lond)* 2000;98:349–53.
- [28] Oudemans-van Straaten HM, van der Voort PHJ, Hoek FJ, Bosman RJ, van der Spoel JI, Zandstra DF. Pitfalls in gastrointestinal permeability measurement in ICU patients with multiple organ failure using differential sugar absorption. *Intensive Care Med* 2002;28:130–8.
- [29] Stewart JSW, Cohen EEW, Licitra L, Van Herpen CML, Khorprasert C, Soulieres D, Vodvarka P, Rischin D, Garin AM, Hirsch FR, Varela-Garcia M, Ghiorghiu S, Hargreaves L, Armour A, Speake G, Swaisland A, Vokes EE. Phase III study of gefitinib 250 compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27:1864–71.
- [30] Wilson CG, O'Mahony BO, Connolly SM, Cantarini MV, Farmer MR, Dickinson PA, Smith RP, Swaisland HC. Do gastrointestinal transit parameters influence the pharmacokinetics? *Int J Pharm* 2009;376:7–12.
- [31] Harrison EH, Hussain MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 2001;131:1405–8.
- [32] Borel P, Pasquier B, Armand M, Tyssandier V, Grolier P, Alexandre-Gouabau MC, Andre M, Senft M, Peyrot J, Jaussan V, Lairon D, Azais-Braesco V. Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2001;280:G95–G103.
- [33] Kim HS, Arai H, Arita M, Sato Y, Ogihara T, Tamai H, Inoue K, Mino M. Age-related changes of alpha-tocopherol transfer protein expression in rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol* 1996;42:11–8.
- [34] McMillan DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DSJ, McArdle C. The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clin Nutr* 2002;21:161–4.
- [35] Mayland C, Allen KR, Degg TJ, Bennet M. Micronutrient concentrations in patients with malignant disease: effect of the inflammatory response. *Ann Clin Biochem* 2004;41:138–41.
- [36] McMillan DC, Sattar N, Talwar D, O'Reilly J, McArdle CS. Changes in micronutrient concentrations following anti-inflammatory treatment in patients with gastrointestinal cancer. *Nutrition* 2000;16:425–8.
- [37] Faure H, Coudray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F, Cadet J, Favier A. 5-hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in

- adriamycin-treated patients. *Free Rad Biol Med* 1996;20:979–83.
- [38] Jonas RC, Puckett AB, Jones DP, Griffith DP, Szeszycki EE, Bergman GF, Furr CE, Tyre C, Carlson JL, Galloway JR, Blumberg JB, Ziegler TR. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Am J Clin Nutr* 2000;72:181–9.
- [39] High KP, Legault C, Sinclair JA, Cruz J, Hill K, Hurd DD. Low plasma concentrations of retinol and alfa-tocopherol in hematopoietic stem cell transplant recipients: the effect of mucositis and the risk of infection. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1358–66.
- [40] Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M, Favier A. Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res* 1995;47:117–23.
- [41] Melichar B, Kalabova H, Krcmova L, Urbánek L, Hyspler R, Malirova E, Solichova D. Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/carboplatin chemotherapy. *Anticancer Res* 2007;27:4397–401.
- [42] Kennedy DD, Tucker KL, Ladas ED, Reingold SR, Blumberg J, Kelly M. Low antioxidant vitamin intakes are associated with increases in adverse effects of chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1029–36.
- [43] Packer L, Valacchi G. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;15:282–90.
- [44] Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What is new. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17:663–9.
- [45] Thiele JJ, Weber SU, Packer L. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol* 1999;113:1006–10.

13.6 Serum Homocysteine, Cholesterol, Retinol, alpha-Tocopherol, Glycosylated Hemoglobin and Inflammatory Response during Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, 5-Fluorouracil and Leucovorin

B. Melichar, H. Kalabova, L. Krcmova, M. Kasparova, E. Malirova, K. Melicharova, M. Pecka, R. Hyspler and D. Solichova

Anticancer Research, 29, 11, 4813-4820, 2009 (Citováno—4, IF₂₀₀₉—1,428)

Serum Homocysteine, Cholesterol, Retinol, α -Tocopherol, Glycosylated Hemoglobin and Inflammatory Response during Therapy with Bevacizumab, Oxaliplatin, 5-Fluorouracil and Leucovorin

BOHUSLAV MELICHAR^{1,6}, HANA KALÁBOVÁ¹, LENKA KRČMOVÁ^{2,5},
MARKÉTA KAŠPAROVÁ^{2,5}, EVA MALÍŘOVÁ³, KAROLINA MELICHAROVÁ²,
MIROSLAV PECKA⁴, RADOMÍR HYŠPLER² and DAGMAR SOLICHOVÁ²

Departments of ¹Oncology and Radiotherapy, ²Gerontology and Metabolic Care, ³Nuclear Medicine, and
⁴Hematology, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Hradec Králové;

⁵Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Hradec Králové;

⁶Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic

Abstract. *Background:* Targeted agents present with a new spectrum of side-effects, including toxicities that negatively impact the risk of atherosclerosis. The aim of the present study was to evaluate the effect of the combination of targeted therapy and chemotherapy on serum homocysteine and other laboratory parameters of cardiovascular risk in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Patients and Methods:* Thirty-one patients with metastatic colorectal carcinoma treated with the combination of bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin were studied before and during the therapy. *Results:* Serum homocysteine decreased significantly throughout the course of treatment. Total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol also decreased significantly during the first month of therapy. In contrast, serum retinol significantly increased during the second and third months of treatment. A significant increase in glycosylated hemoglobin was also observed. After an initial rise, serum C-reactive protein (CRP) and carcinoembryonic antigen (CEA) were significantly lower compared to baseline throughout the course of treatment. Serum ferritin increased throughout most of the course of treatment. A significant correlation was observed between CRP and high-density lipoprotein cholesterol, retinol, ferritin,

and CEA. CEA correlated with hemoglobin, retinol, and ferritin. Retinol correlated significantly with hemoglobin. *Conclusion:* Tumor control, reflected in lower CEA, resulted in suppression of the acute phase response and generally in favorable effects on laboratory parameters indicative of risk factors of atherosclerosis, including lower homocysteine concentrations, and lower total and LDL cholesterol.

The prognosis of metastatic colorectal carcinoma has improved substantially during the last decade as a result of the introduction of new effective cytotoxic agents (1), and, more recently, targeted agents, the monoclonal antibodies cetuximab and bevacizumab (2, 3). It has been demonstrated that combination of 5-fluorouracil with either irinotecan or oxaliplatin is, in terms of efficacy, superior to 5-fluorouracil alone (4, 5). The addition of bevacizumab, monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF), to combination chemotherapy has been shown to increase survival both in the first-line as well as in the second-line setting (2, 6). Although therapy with bevacizumab is, in general, well tolerated, the drug has a peculiar toxicity profile, with the principal side-effects including proteinuria, hypertension and thrombosis. The spectrum of these toxicities is linked to the fact that VEGF is an endothelial growth factor, and VEGF blockade leads to endothelial cell dysfunction (7). These toxicities are usually mild and of little clinical significance in most patients because of their limited life expectancy, but could be of concern in long-term survivors because they are associated with increased risk of atherosclerosis and its complications.

Thus, with the remarkable improvement of long-term prognosis in patients with inoperable metastatic colorectal carcinoma treated with the combination of targeted agents

Correspondence to: Bohuslav Melichar, MD, Ph.D., Professor and Head, Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic. Tel: +420 588444288, Fax: +420 588442522, e-mail: bohuslav.melichar@fnol.cz

Key Words: Bevacizumab, homocysteine, metastatic colorectal carcinoma.

comprising an LC 200 pump, LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of alpha-tocopherol and retinol was performed using Chromolith Performance RP-18e, 100×4.6 mm monolithic columns (Merck, Darmstadt, Germany). As the mobile phase 100% methanol was used at a flow rate of 2.5 ml min⁻¹ and column pressure of 3.3 MPa. The block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume was 50 µl. The detection of alpha-tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and at 325 nm, respectively.

Determination of hemoglobin, glycosylated hemoglobin, ferritin and carcinoembryonic antigen. Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate using a Sysmex XE-2100 blood analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). Glycosylated hemoglobin was determined by high-performance liquid chromatography using a Variant II Turbo System (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) according to the instructions of the manufacturer and expressed according to the IFCC reference system (34). Serum ferritin concentrations were determined by an immunoassay using commercial kits (AxSYM; Abbott, Chicago, IL, USA). The assays were performed according to the manufacturer's instructions. Serum carcinoembryonic antigen (CEA) was determined by radioimmunoassay using a commercial kit (Immunotech; Marseille, France) as described elsewhere (35).

Statistical analysis. The parameters during the therapy were compared with baseline values using the Wilcoxon paired test. Correlations were examined using Spearman's rank correlation coefficient. The decision on statistical significance was based on $p=0.05$ level. The analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

Results

As shown in Table I, serum homocysteine decreased significantly throughout the course of treatment. Serum total cholesterol also decreased significantly during the first month of therapy. This decrease affected LDL cholesterol. After an initial mild decrease, HDL cholesterol significantly increased late during the course of treatment. The decrease of total cholesterol during the first month of therapy was accompanied by a reduction in alpha-tocopherol. In contrast, serum retinol significantly increased during the second and third months of treatment. A significant increase in glycosylated hemoglobin was also observed at several visits. After an initial significant increase, CRP significantly decreased compared to baseline throughout the course of treatment. Hemoglobin concentration remained relatively stable, but serum ferritin increased throughout most of the course of treatment. The course of CEA mirrored concentrations of CRP. After an initial rise, that was, however, not significant, a significant decrease of serum CEA was observed starting from the second month of therapy.

Significant negative correlations were observed between CRP and HDL cholesterol ($r_s=-0.37$, $p<0.05$), retinol ($r_s=-0.70$, $p<0.0001$; Figure 1) and positive correlations

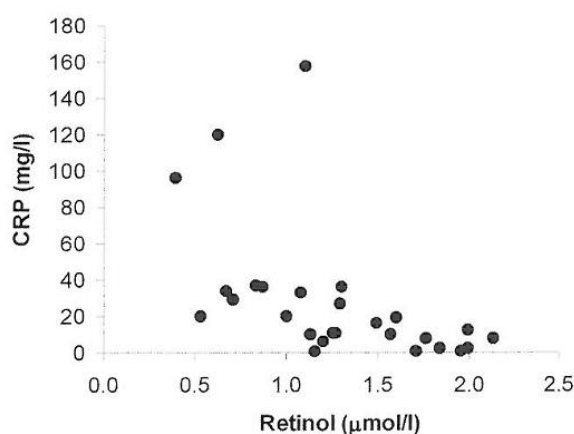


Figure 1. Correlation between C-reactive protein and retinol ($r_s=-0.70$, $p<0.0001$).

were noted between CRP and ferritin ($r_s=0.52$, $p<0.01$), and CEA ($r_s=0.60$, $p<0.001$). CEA correlated inversely with hemoglobin ($r_s=-0.36$, $p<0.05$), and with retinol ($r_s=-0.60$, $p<0.001$), and positively with ferritin ($r_s=0.42$, $p<0.05$). Retinol correlated significantly with hemoglobin ($r_s=0.77$, $p<0.00001$). Alpha-tocopherol correlated significantly with total cholesterol ($r_s=0.48$, $p<0.01$) and LDL cholesterol ($r_s=0.42$, $p<0.05$), and total cholesterol correlated significantly with LDL cholesterol ($r_s=0.95$, $p<0.00001$).

Discussion

The present data demonstrate that bevacizumab administered with combination chemotherapy has a complex short-term effect on laboratory measured risk factors of atherosclerosis that includes changes both favorable and unfavorable for the long-term risk of atherosclerosis. Some of these changes are probably due to the effect of combined therapy on metastatic tumor. Reduced tumor burden results in lower serum CEA and CRP concentrations. Suppression of the systemic inflammatory response also results in high retinol and, possibly, lower homocysteine concentrations.

The serum concentrations of cholesterol and LDL cholesterol decreased markedly during the first cycle of therapy. Non-fasting samples were used for lipid analyses in the present study, similarly to some earlier reports that examined the effect of anticancer agents (36). In cancer patients receiving emetogenic chemotherapy, it is difficult to require an overnight fast before chemotherapy repeatedly. The decrease of serum total and LDL cholesterol was evident mostly during the first month of therapy. Later in the course of treatment, an increase of HDL cholesterol was observed that could also have a favorable impact on the progression of atherosclerosis.

- Blumberg JB and Ziegler TR: Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Am J Clin Nutr* 72: 181-189, 2000.
- 28 High KP, Legault C, Sinclair JA, Cruz J, Hill K and Hurd DD: Low plasma concentrations of retinol and alpha-tocopherol in hematopoietic stem cell transplant recipients: the effect of mucositis and the risk of infection. *Am J Clin Nutr* 76: 1358-1366, 2002.
- 29 Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M and Favier A: Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res* 47: 117-123, 1995.
- 30 Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R and Salonen R: High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in Eastern Finnish men. *Circulation* 86: 803-811, 1992.
- 31 Tuomainen TP, Punnonen K, Nyyssonen K and Salonen JT: Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* 97: 1461-1466, 1998.
- 32 Melichar B, Urbanek L, Krcmova L, Kalabova H, Melicharova K, Malirova E, Hornychova H, Ryska A, Hyspler R and Solichova D: Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy. *Anticancer Res* 28: 2389-2396, 2008.
- 33 Urbanek L, Solichova D, Melichar B, Dvorak J, Svobodova I and Solich P: Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* 573-574: 267-272, 2006.
- 34 Hoelzel W, Weykamp C, Jeppesson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John WG, Kobold U, Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M and Weidmeyer HM: IFCC reference system for measurement of hemoglobin A_{1c} in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 50: 166-174, 2004.
- 35 Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M and Zadak Z: Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 21: 190-198, 2006.
- 36 Banerjee S, Smith IE, Folkard L, Iqbal J, Barker P and Dowset M: Comparative effects of anastrozole, tamoxifen alone and in combination on plasma lipids and bone-derived resorption during neoadjuvant therapy in the impact trial. *Ann Oncol* 16: 1632-1638, 2005.
- 37 Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C and Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 39: 718-727, 2003.
- 38 Sorbye H and Dahl O: Transient CEA increase at start of oxaliplatin combination therapy for metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol* 43: 495-498, 2004.
- 39 Ailawadhi S, Sunga A, Rajput A, Yang GY, Smith J and Fakhri M: Chemotherapy-induced carcinoembryonic antigen surge in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncology* 70: 49-53, 2006.
- 40 Melichar B, Jandik P, Tichy M, Malir F, Mergancova J and Voboril Z: Urinary zinc excretion and acute phase response in cancer patients. *Clin Investig* 72: 1012-1014, 1994.
- 41 Gori AM, Sofi F, Marcucci R, Giusti B, Franco Gensini G and Abbate R: Association between homocysteine, vitamin B6 concentrations and inflammation. *Clin Chem Lab Med* 45: 1728-1736, 2007.
- 42 Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE and Cook NR: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347: 1557-1565, 2002.
- 43 Sartori S, Nielsen I, Masotti M and Malacarne P: Early and late hyperferremia during cisplatin chemotherapy. *J Chemother* 3: 45-50, 1991.
- 44 Pollera CF, Ameglio F, Nardi M, Marolla P, Carlini P and Frasca AM: Dose and schedule effects of cisplatin on the related acute iron changes. *Oncology* 47: 133-138, 1990.
- 45 Pollera CF, Ameglio F, Reina S, Nardi M, Abbolito MR and Parracino C: Changes in serum iron levels following very high dose cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 19: 257-260, 1987.
- 46 Lauterburg BH, Nguyen T, Hartmann B, Junker E, Kupfer A and Cerny T: Depletion of total cysteine, glutathione, and homocysteine in plasma by ifosfamide/mesna therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 35: 132-136, 1994.
- 47 Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund JT, Pui CH and Relling MV: Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J Clin Oncol* 21: 3084-3091, 2003.
- 48 Geisler J, Geisler SB, Lonning PE, Smaaland R, Tveit KM, Refsum H and Ueland PM: Changes in folate status as determined by reduction in total plasma homocysteine levels during leucovorin modulation of 5-fluorouracil therapy in cancer patients. *Clin Cancer Res* 4: 2089-2093, 1998.
- 49 Slater GH, Ren CJ, Siegel N, Williams T, Barr D, Wolfe B, Dolan K and Fielding GA: Serum fat-soluble vitamin deficiency and abnormal calcium metabolism after malabsorptive bariatric surgery. *J Gastrointest Surg* 8: 48-55, 2004.
- 50 Johnson EJ, Krasinski SD, Howard LJ, Alger SA, Dutta SK and Russell RM: Evaluation of vitamin A absorption by using oil-soluble and water-miscible vitamin A preparations in normal adults and in patients with gastrointestinal disease. *Am J Clin Nutr* 55: 857-864, 1992.
- 51 Melichar B, Dvorak J, Krcmova L, Hyspler R, Urbánek L and Solichova D: Intestinal permeability and vitamin A absorption in patients with chemotherapy-induced diarrhea. *Am J Clin Oncol* 31: 580-584, 2008.
- 52 Melichar B, Kalabova H, Krcmova L, Urbánek L, Hyspler R, Malirova E and Solichova D: Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/carboplatin chemotherapy. *Anticancer Res* 27: 4397-4401, 2007.
- 53 McMillan DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DSJ and McArdle C: The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clin Nutr* 21: 161-164, 2002.
- 54 McMillan DC, Sattar N, Talwar D, O'Reilly J and McArdle CS: Changes in micronutrient concentrations following anti-inflammatory treatment in patients with gastrointestinal cancer. *Nutrition* 16: 425-428, 2000.
- 55 Mayland C, Allen KR, Degg TJ and Bennet M: Micronutrient concentrations in patients with malignant disease: effect of the inflammatory response. *Ann Clin Biochem* 41: 138-141, 2004.

concentrations observed in the present study was similar to the decrease observed in an earlier study in patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin (48). With the exception of the initial surge, serum homocysteine concentrations followed CEA levels. Homocysteine may have different dynamics from other tumor markers as its concentrations reflect tumor cell proliferation and the number of live cells (15).

Administration of chemotherapy is associated with oxidative stress that results in lower concentrations of circulating antioxidants. Moreover, administration of chemotherapy is associated with small bowel dysfunction, and disturbances of the small bowel function are accompanied by a low serum concentration of retinol (49-51). The present observation of a decrease in alpha-tocopherol is in agreement with earlier reports of decreased alpha-tocopherol concentrations during systemic chemotherapy that were associated with oxidative stress induced by the therapy (26-29). However, in a recent study we observed increased alpha-tocopherol and retinol concentrations during paclitaxel/carboplatin combination chemotherapy (52) and hypothesized that these increases are probably linked to the suppression of the systemic inflammatory response by chemotherapy. Serum concentrations of alpha-tocopherol and retinol are significantly decreased in patients with advanced cancer (53, 54), and this decrease correlates with the systemic inflammatory response (53, 55). In the present cohort of patients, we did not demonstrate an increase in serum alpha-tocopherol, but an increase in serum retinol was evident. Significant negative correlation was observed between CRP and retinol concentrations. The suppression of the systemic inflammatory response associated with tumor control could thus explain the increase of serum retinol observed later during the course of treatment in the present study.

In earlier studies, low vitamin E intake was associated with toxicity of chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia (56). The administration of vitamin E has been shown to alleviate some side-effects of radiotherapy (24), and chemotherapy (25). Although serial monitoring of vitamin E levels may be a necessary prerequisite for any therapeutic use of this antioxidant vitamin, serum vitamin E is not being routinely measured in cancer patients, and, in most reports published so far, alpha-tocopherol has been investigated in epidemiological studies in relation to cancer risk. In the present study, low serum alpha-tocopherol was associated with a decreased cholesterol concentration and could be linked to the toxicity of chemotherapy and resulting lower dietary intake. Lower alpha-tocopherol concentration may have unfavorable long-term effects on the progression of atherosclerosis. In contrast to cholesterol or homocysteine, glycosylated hemoglobin increased significantly during the treatment. An increase in circulating VEGF has been described in patients with diabetes mellitus that has been associated with the presence of complications (57-59). The moderate increase of

glycosylated hemoglobin may be caused by the administration of dexamethasone as part of premedication or the effect of chemotherapy rather than bevacizumab.

Thus, the administration of bevacizumab and combined chemotherapy has effects on laboratory parameters that both increase and decrease the risk of atherosclerosis. Along with hypertension (7), VEGF inhibition causes proteinuria, another risk factor of cardiovascular mortality (60). Data from the present cohort also indicate that the administration of combined treatment may be associated with impaired glucose tolerance. The concentrations of alpha-tocopherol, the major liposoluble antioxidant, decreased during the treatment, but retinol concentrations increased. Alterations in iron metabolism, reflected in increased ferritin concentrations, and associated oxidative stress may also accelerate the progression of atherosclerosis. On the other hand, therapy led to lower cholesterol and homocysteine concentration and a decrease in systemic inflammation reflected in lower CRP levels. The suppression of the systemic inflammatory response could have also resulted in increased HDL-cholesterol levels. Most of these unfavorable changes were moderate in magnitude and of limited duration, so it cannot be expected that these changes would have a dramatic effect on the progression of atherosclerosis.

In the past, the long-term risk of atherosclerosis was of little concern in patients with metastatic cancer. In the last decade, data have emerged indicating a significant rise of the incidence of complications of atherosclerosis in survivors of metastatic cancer curable with chemotherapy, *e.g.* germ cell tumors (61-63). Although the cure rate of metastatic colorectal carcinoma is much lower compared, for example, to metastatic testicular carcinoma, the survival of patients with metastatic colorectal carcinoma has improved dramatically over the past two decades (1), with median survival currently being close to 2 years (64). In addition, a significant proportion of patients with initially unresectable tumors become candidates for secondary resection. In a recently published report, the 5- and 10-year survival of patients undergoing secondary resection was 33% and 27%, respectively (8). Thus, a significant proportion of metastatic colorectal carcinoma patients survive, under therapy, more than 5 years, and the question of how chronic therapy affects the long-term risk of cardiovascular disorders is of legitimate concern. Thus, the observation that the combination of VEGF-targeted therapy and chemotherapy has, besides unfavorable effects on hypertension and proteinuria, also favorable effects on laboratory risk factors of atherosclerosis is reassuring from the point of view of clinical practice.

In conclusion, combination therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin is an effective therapy that results in marked decrease of serum CEA. Tumor control also resulted in suppression of the acute phase response, reflected in CRP concentrations. CRP correlated negatively with retinol and HDL-cholesterol, and positively with CEA and

13.7 HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy

L. Krcmova, L. Urbanek, D. Solichova, M. Kasparova, H. Vlckova, B. Melichar, L. Sobotka and P. Solich

Journal of Separation Science, 32, 15-16, 2804-2811, 2009 (Citováno–6, IF₂₀₀₉–2,551)

Lenka Krčmová^{1,2}
Lubor Urbánek^{1,2}
Dagmar Solichová²
Markéta Kašparová^{1,2}
Hana Vičková¹
Bohuslav Melichar³
Luboš Sobotka²
Petr Solich¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

²Department of Metabolic Care and Gerontology, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

³Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic

Original Paper

HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy

A simple and rapid HPLC method requiring small volumes (250 μ L) of human serum after C18 SPE sample preparation was developed using monolithic technology for simultaneous determination of all-*trans*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, retinol, gamma- and alpha-tocopherol. The monolithic column, Chromolith Performance RP-18e (100 \times 4.6 mm), was operated at ambient temperature. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile (ACN) and 1% ammonium acetate in water (AMC) at pH 7.0. The mobile phase started at 98:2 (v/v) ACN/AMC (column pre-treatment) at a flow rate of 2 mL/min, then changed to 95:5 (v/v) ACN/AMC for 4 min at a flow rate of 1.5 mL/min and a further 3 min at a flow rate of 3.2 mL/min. Detection and identification were performed using a photodiode array detector. Retinol, 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid were monitored at 325 nm. Both alpha- and gamma-tocopherol were detected at 295 nm. The total analysis time was 7.2 min. Tocol (synthesized tocopherol, not occurring in humans) was used as internal standard. The method was linear in the range of 0.125–10.00 μ mol/L for all-*trans*-retinoic acid, 0.125–5.00 μ mol/L for 13-*cis*-retinoic acid, 0.25–10.00 μ mol/L for retinol, 0.5–50.00 μ mol/L for gamma-tocopherol, and 0.5–50.00 μ mol/L for alpha-tocopherol. The present method may be useful for monitoring of retinoids and tocopherols in clinical studies.

Keywords: Anticancer therapy / Monolithic column / Retinoic acid / Retinol / Tocopherol

Received: April 3, 2009; revised: May 5, 2009; accepted: May 5, 2009

DOI 10.1002/jssc.200900239

1 Introduction

All-*trans*-retinoic acid (ATRA) and 13-*cis*-retinoic acid (Fig. 1) are naturally occurring retinoids produced from retinol. Retinoic acids (RAs) have multiple roles in reproduction, embryogenesis, cellular differentiation, vision, and immune response. ATRA is used therapeutically in acute promyelocytic leukemia (APL) [1], and encouraging data have been reported on the activity ATRA in other tumors [2, 3]. After oral administration, RAs have variable pharmacokinetic profiles. Administration of ATRA induces accelerated metabolism, resulting in the lowering of the serum ATRA concentration and development of resistance [4, 5]. Despite these facts, all-*trans*-retinoic acid is not routinely determined in APL patients treated with this drug. 13-*cis*-Retinoic acid has also been used in

clinical studies of chemoprevention, or in combination with other anticancer agents, mostly in patients with malignant or premalignant tumors of the head and neck region [6–8].

Tocopherols (both alpha-tocopherol and gamma-tocopherol) (Fig. 1) are the major antioxidants found in serum and are commonly referred to as vitamin E. Alpha-tocopherol is responsible for most of the antioxidant activity in animal tissues [9]. Disorders of antioxidant balance involving tocopherols may be involved in the pathogenesis of some of the toxic effects of radiotherapy [10, 11] or chemotherapy [12]. Alpha-tocopherol may have chemopreventive activity and may also alleviate toxicity of retinoic acid administration.

Retinoic acid and tocopherols have been determined so far in different clinical samples using a variety of techniques [13]. In most studies, the method of determination of these compounds was based on HPLC (both normal and reversed phase) [14, 15]. HPLC technology provides rapid, sensitive, and accurate methods for vitamin determination and has the advantages of solvent economy and easy coupling with other techniques. Coupling

Correspondence: Dr. Dagmar Solichová, Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: solich@fhk.cuni.cz
Fax: +420 49 5834841

Abbreviations: AMC, ammonium acetate in water

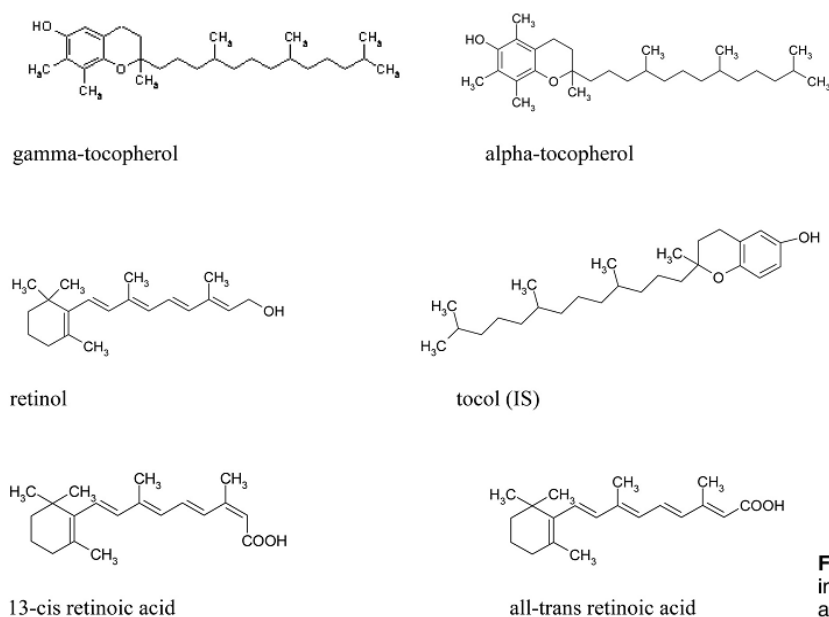


Figure 1. Chemical structures of examined fat-soluble vitamins, internal standard, all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid.

the HPLC method with MS detection allows for low detection limits and small sample consumption [16, 17]. Determination of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid and tocopherols in one analysis may be beneficial especially in patients treated with retinoic acid derivatives because of the need to monitor retinoid concentrations as well as the concentrations of tocopherols that represent a major antioxidant system in the serum. Correlations between retinoic acids and tocopherols in human blood have been amply documented [18–21]. Moreover, combinations of retinoic acids with alpha-tocopherol have been studied in clinical trials [6, 8], but there is only one method for determination of retinoic acids and tocopherols in human serum in a single step. In 30 min 14 compounds are separated [22]. The long analysis time is due to the different polarities of the compounds. For analysis of samples from cancer patients it is not necessary to determine all these compounds and 30 min analysis is unsuitable for routine clinical practice. Use of simple gradient mobile phase and monoliths allows determination of different polarity samples in a short time.

The recently introduced monolithic technology is based on a unique sorbent material allowing good quality of separations in a minimal time. This special porous character allows relatively high mobile phase flow rates (1–9 mL/min) while keeping the back pressure low. Due to the favorable properties of monolithic materials, the risk of destruction and damage of the column by movement of the sorbent inside the column is eliminated and reliability as well as reproducibility of the analysis is improved [23].

Many examples can be found of increased separation speed at a high flow rate [23]. However, an increase in flow rate means consumption of a larger amount of solvents, unless smaller sized columns are used [24]. The main advantages of monoliths, apart from short analysis times, are long lifetime and immense robustness: All monolithic columns display very high mechanical stability and long operative lifetimes, in most cases far exceeding those of particulate columns. The next advantage is an improvement in HPLC system security because using monolithic columns also reduces maintenance work on HPLC pump and injector seals as well as the need for sample preparation because monolithic columns are very resistant to blocking even with biological samples [23, 24].

The aim of this study was to develop a simple and practical HPLC method using monoliths for the quantification of retinoic acid in pharmacokinetic studies that would also allow simultaneous determination of tocopherols. No method has yet been published for determination of retinoic acids and tocopherols in one step using monolithic technology.

2 Experimental

2.1 Instrumentation and chemicals

The analyses were performed using a Perkin Elmer HPLC set-up (Norwalk, USA) comprising an LC 200 pump, an LC 200 autosampler, an LC Column Oven 101 thermostat, and an LC 235C diode-array detector attached to the Per-

kin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. All solvents were of HPLC grade. Both the methanol and the *n*-hexane used for the preparation of standard solutions were obtained from Scharlau (Sentmenat, Spain) and the ethanol for the deproteinization procedure from Lachema (Brno, Czech Republic). Acetonitrile was supplied by Scharlau (Sentmenat, Spain), ammonium acetate by Fluka–Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic), distilled water by Goro (Prague, Czech Republic). Spe-ed SPE cartridges C18 500 mg/3 mL for sample extraction were obtained from Applied Separations (Allentown, USA). Retinol, alpha-tocopherol, and gamma-tocopherol were supplied by Fluka–Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic), tocol by Matreya (Pleasant Gap, USA). ATRA and 13-*cis*-retinoic acid were purchased from Sigma – Aldrich (Prague, Czech Republic). A lyophilized human serum kit for HPLC analysis of vitamins A and E from Chromsystems (Munich, Germany) was used for the validation process.

2.2 Chromatographic conditions

Separation of vitamins and retinoic acids was performed using a Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm monolithic column, Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile (ACN): 1% ammonium acetate in water at the pH 7.0 (AMC) in the ratio 95:5 (v/v) was used as the mobile phase. The column was pre-treated with ACN/AMC 98:2 (v/v) for 1 min at a flow rate of 2.0 mL/min. During separation ACN/AMC 95:5 (v/v) was used as the mobile phase for 4 min at a flow rate of 1.5 mL/min, then for 3 min at a flow rate of 3.2 mL/min. The column pressure was 3.32 MPa (1300 psi). The block heater LC Oven 101 Perkin Elmer (Norwalk, USA) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume of sample was 20 µL. Diode array detection of retinol and all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid was at 325 nm and for alpha- and gamma-tocopherol and tocol it was at 295 nm. The total analysis time was 7.2 min.

2.3 Preparation of standard solutions

Stock solutions of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid, retinol, tocol, alpha- and gamma-tocopherol standards were prepared by the following methods. All-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid solutions were prepared by dissolution in 1000 µmol/L methanol. Tocol, alpha- and gamma-tocopherol standards were first dissolved in *n*-hexane (1000 µmol/L) and then diluted with methanol to give 500 µmol/L stock solutions. These standard solutions were stored at –25°C (retinol, all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid) and at 4°C (tocol, alpha- and gamma-tocopherol). For calibration, working solutions of all standards were diluted with methanol in volumetric flasks in the concentration range: 0.25–10.00 µmol/L for retinol, 0.125–

5.00 µmol/L for 13-*cis*-retinoic acid, 0.125–10.00 µmol/L for all-*trans*-retinoic acid, 0.5–50.00 µmol/L for gamma-tocopherol, 0.5–50.00 µmol/L for alpha-tocopherol. Calibration was accomplished at six concentration levels. The stability of stock and working solutions was 6 months for retinol, tocol, alpha- and gamma-tocopherol, 22 days for all-*trans*-retinoic acid and 16 days for 13-*cis*-retinoic acid.

2.4 Sample preparation – solid phase extraction procedure

The protocol was approved by the institutional ethical committee, and all patients gave their consent. Blood samples were drawn from the peripheral vein after twelve hours of overnight fasting. The samples were then centrifuged (1600 × *g*, 10 min, 4°C) and serum was separated. Before solid phase extraction (SPE), an internal standard (20 µmol/L of tocol) was added and evaporated in the tube. Then 250 µL of serum was added and deproteinized by cooled ethanol (650 µL, 8 min, 4°C). After centrifugation (2000 × *g*, 15 min, 4°C), the supernatant was separated and applied to the SPE column. Before application of the sample the SPE column was activated by 1000 µL of methanol and then washed with 1000 µL of water. Hexane (2000 µL) was used as elution solvent. After evaporation of the hexane at 35°C, the residue was diluted in 250 µL of methanol and applied to the analytical column.

3 Results

3.1 Method validation

Method validation was performed according to the European Pharmacopoeia [25] and the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines Q2A and Q2B [26, 27] consisting of two parts: System Suitability Test (SST) and Validation Parameters.

3.1.1 System Suitability Test (SST)

Within the System Suitability Test some chosen parameters describing the separation properties and precision of the chromatographic system were determined. Table 1 summarizes the calculated values of number of theoretical plates (*N*), height equivalent of theoretical plate (HETP), asymmetry (*T*), and peak resolution (*R*).

Column performance was determined as number of theoretical plates by the equations $N = 5.545 (t_R/W_{0.05})^2$ ($W_{0.05}$ is width at 5% of peak height, t_R is retention time) and $HETP = L/N$ (N is column performance, L is length of the column). Asymmetry (tailing factor) was calculated by the equation $= W_{0.01}/2f$ ($W_{0.01}$ is width at 5% of peak height, f is distance between maximum and the leading edge of the peak). Peak resolution was calculated by the

Table 1. System Suitability Test: number of theoretical plates (N), height equivalent of theoretical plate (HETP), asymmetry (T), and peak resolution (R).

Compound	$W_{0.05}$ (min)	t_R (min)	N	HETP (μm)	$W_{0.01}$ (min)	f (min)	T	W (min)	t_R (min)	R
Retinol	0.0658	1.77	3744.9	26.7	0.1667	0.0688	1.21	0.2000	1.77	1.68
13- <i>cis</i> -Retinoic acid	0.0606	2.13	4312.5	23.2	0.1563	0.0625	1.25	0.2286	2.13	2.99
all- <i>trans</i> -Retinoic acid	0.0517	2.90	8289.8	12.1	0.2500	0.109	1.15	0.2857	2.90	3.71
Tocol	0.0781	3.96	8821.0	11.3	0.4688	0.2344	1.00	0.2857	3.96	5.64
gamma-Tocopherol	0.1156	5.49	8235.5	12.1	0.2500	0.1155	1.08	0.2571	5.49	2.83
alpha-Tocopherol	0.1184	6.34	9668.4	10.3	0.3433	0.125	1.38	0.3429	6.34	

Table 2. Repeatability of injection of the method (serum).

$n = 10$	Mean of area (unit) \pm SD	RSD (%)	Mean of retention time (min) \pm SD	RSD (%)
Retinol	17155 \pm 401	2.34	1.74 \pm 0.01	0.52
13- <i>cis</i> -Retinoic acid	15933 \pm 270	1.69	2.00 \pm 0.01	0.50
all- <i>trans</i> -Retinoic acid	36071 \pm 515	1.43	2.76 \pm 0.02	0.74
Tocol	25001 \pm 607	2.43	3.88 \pm 0.09	2.22
gamma-Tocopherol	1563 \pm 340	2.26	5.37 \pm 0.06	1.14
alpha-Tocopherol	34489 \pm 666	1.93	6.15 \pm 0.08	1.23

equation $R_{ij} = 2(t_R - t_{Rj})/(W_i + W_j)$ (t_R , t_{Rj} are retention times, W_i , W_j are peak widths). For the determination of injection repeatability, ten samples from one lyophilized human serum were analyzed. The repeatability of injection was expressed as the relative standard deviation (RSD) of peak area and retention time calculated from the obtained data. Table 2 compiles the RSD values of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid, retinol, tocol, alpha- and gamma-tocopherol in the serum sample.

3.1.2 Validation of parameters

In order to validate the developed method, precision, accuracy, linearity, detection, and quantification limits, as well as ruggedness, were evaluated.

3.1.2.1 Precision

For the determination of the method precision, ten samples prepared individually from one lyophilized human serum at two different concentration levels were analyzed. The method precision expressed by the repeatability of the peak area and retention time was determined as the relative standard deviation (RSD) calculated from the obtained data. Table 3 compiles RSD values of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid, retinol, tocol, gamma-tocopherol and alpha-tocopherol.

3.1.2.2 Accuracy

The accuracy of the method was tested first as recovery, which was determined by performing three measurements of the serum pool spiked with 13-*cis*-retinoic acid (final concentration at Level 1 was 1.00 $\mu\text{mol/L}$ and at Level 2 was 2.20 $\mu\text{mol/L}$), all-*trans*-retinoic acid (final concentration at Level 1 was 1.00 $\mu\text{mol/L}$ and at Level 2 was

2.20 $\mu\text{mol/L}$), gamma-tocopherol (final concentration at Level 1 was 10.00 $\mu\text{mol/L}$ and at Level 2 was 20.00 $\mu\text{mol/L}$). All the data are presented in Table 3.

Secondly, the accuracy of the method was determined by using the Chromsystems control set for vitamins A and E. The values obtained were always in the acceptable range (Level 1 retinol: 1.15–1.73 $\mu\text{mol/L}$, alpha-tocopherol: 15.00–21.3 $\mu\text{mol/L}$, Level 2 retinol: 2.75–4.12 $\mu\text{mol/L}$, alpha tocopherol: 28.0–40.1 $\mu\text{mol/L}$).

3.1.2.3 Linearity

Linearity of the calibration curves was determined using the LINREGRE program developed at the Department of Biophysics and Physical Chemistry at the Faculty of Pharmacy, Charles University, at six concentration levels in the range of 0.125–10.00 $\mu\text{mol/L}$ for all-*trans*-retinoic acid, 0.125–5.00 $\mu\text{mol/L}$ for 13-*cis*-retinoic acid, 0.25–10.00 $\mu\text{mol/L}$ for retinol, 0.5–50.00 $\mu\text{mol/L}$ for gamma-tocopherol, and 0.5–50.00 $\mu\text{mol/L}$ for alpha-tocopherol. Tocol was used as an internal standard at a concentration of 20.00 $\mu\text{mol/L}$. Each solution was injected onto the column three times. Table 4 shows the calculated regression equations and correlation coefficients based on data obtained for all compounds.

3.1.2.4 Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) was defined as the compound concentration that produced a signal-to-noise ratio greater than five, and the limit of quantification (LOQ) was evaluated as the concentration equal to ten times the value of the signal-to-noise ratio (Table 4).

Table 3. Precision, accuracy, and recovery in lyophilized human serum at two different concentration levels: For precision, ten samples were prepared individually from one lyophilized human serum at two different concentration levels, the accuracy of the method was tested first as recovery, which was determined by performing three measurements of the pool spiked serum and secondly the accuracy of the method was determined by using the Chromsystems control set for vitamin A and E.

	Level			Precision (Intra-day) Repeatability of the method		
	Added ($\mu\text{mol/L}$)	Found ($\mu\text{mol/L}$)	Recovery (%)	Area SD (units)/retention time SD (min)	<i>n</i>	RSD area/RSD retention time
Retinol	1.64	1.35	82.30	$36464 \pm 872/1.70 \pm 0.03$	10	2.39/1.95
	3.58	3.05	85.19	$71697 \pm 2075/1.75 \pm 0.01$	10	2.89/0.64
13- <i>cis</i> -Retinoic acid	1.00	1.00	100.00	$20992 \pm 274/2.10 \pm 0.03$	10	1.31/1.22
	2.20	2.06	93.64	$43378 \pm 1260/2.05 \pm 0.02$	10	2.90/0.95
all- <i>trans</i> -Retinoic acid	1.00	0.74	74.00	$23833 \pm 637/2.84 \pm 0.06$	10	2.67/2.13
	2.20	1.55	70.50	$48388 \pm 1059/2.90 \pm 0.06$	10	2.19/2.10
gamma-Tocopherol	10.00	9.81	98.10	$10724 \pm 231/5.25 \pm 0.07$	10	2.16/1.38
	20.00	17.39	87.00	$17834 \pm 551/5.14 \pm 0.08$	10	3.09/1.59
alpha-Tocopherol	17.6	15.17	85.71	$16153 \pm 313/6.09 \pm 0.09$	10	1.94/1.49
	36.70	28.03	77.10	$29517 \pm 95/6.02 \pm 0.09$	10	2.69/1.44

Table 4. Linearity and limit of detection and quantification.

Compound	Equation	Coeff. of correlation	Reliability (%)	LOD ($\mu\text{mol/L}$) signal-to-noise = 5	LOQ ($\mu\text{mol/L}$) signal-to-noise = 10
Retinol	$y = 0.8247x + 0.0177$	0.9998	99.5	0.03	0.06
13- <i>cis</i> -Retinoic acid	$y = 0.779x - 0.0104$	0.9997	99.5	0.04	0.09
all- <i>trans</i> -Retinoic acid	$y = 0.7038x + 0.0434$	0.9995	99.5	0.06	0.12
gamma-Tocopherol	$y = 0.0341x + 5E-05$	0.9999	99.5	0.60	1.20
alpha-Tocopherol	$y = 0.0278x - 0.0133$	0.9998	99.5	1.00	2.00

3.1.2.5 Selectivity

For the quantification of the method, tocol was used as an internal standard. The good selectivity of this method for retinol, 13-*cis*-retinoic acid, ATRA, and other compounds is documented in Fig. 2 and in Table 1.

3.1.2.6 Ruggedness

For the determination of method ruggedness, the pH of mobile phase and mobile phase composition were varied. Retention time and peak area were determined. The retention time was clearly not affected by variation of pH. But the area of the retinoic acids was clearly affected thereby (variations over 14%). Small changes of mobile phase composition ($\pm 2.2\%$) influence the retention times of tocopherols (variations over 9%) and the areas of all compounds (variations over 5%). But there is still adequate resolution for all compounds.

3.1.2.7 Stability

The stability of stock and working standard solutions of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid, retinol, tocol, and alpha- and gamma-tocopherol was tested at room temperature, 4°C, -25°C, and -80°C. Concentrations of compounds were calculated with the aid of an internal standard using calibration curve. The best stability for all-*trans*-ret-

inoic acid was at -25°C for 22 days and for 13-*cis*-retinoic acid at -80°C for 16 days (Figs. 3 and 4). The stock and working solutions of alpha- and gamma-tocopherol were stable for 6 months at 4°C. The best stability for retinol was at -25°C for 6 months.

4 Discussion

The newly developed method presented here combines the advantages of HPLC, monolithic technology, and solid phase extraction.

In this study, using a PDA detector, reverse phase, and flow rate gradient HPLC procedure, very polar and non-polar analytes were separated in a single run within 7 min. The PDA detector enables analysis of a variety of analytes of interest while monoliths allow high flow rates and then short time of analyses. It is easier to regenerate the column because compounds of all types of polarity are eluted during each run. In our method there is a re-equilibration time of only 1 min which is suitable for routine analyses of many samples. Ammonium acetate, which is used to reduce the tailing of compounds with carboxyl functions such as retinoic acids, had several advantages over other buffering systems, such as phosphates and acetic acid, in being chemically stable in

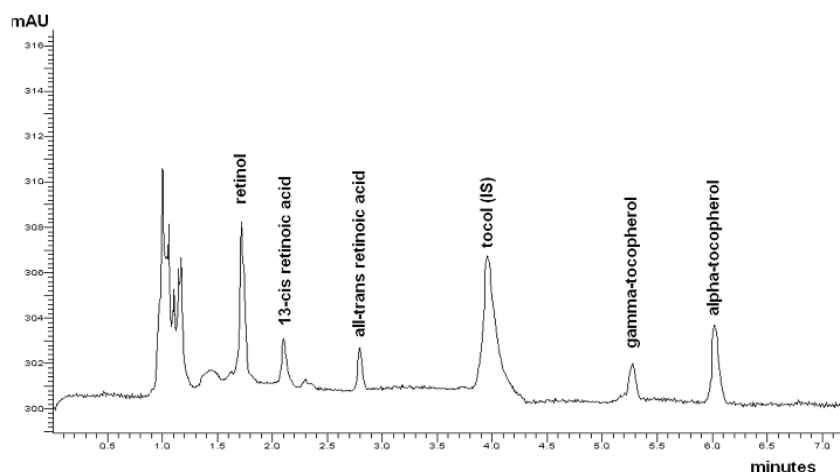


Figure 2. Separation of retinol, 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, gamma- and alpha-tocopherol in human serum (1.74 min retinol 0.99 $\mu\text{mol/L}$, 2.09 min 13-*cis*-retinoic acid 0.50 $\mu\text{mol/L}$, 2.81 min all-*trans*-retinoic acid 0.33 $\mu\text{mol/L}$, 3.09 min tocol (IS), 5.38 min gamma-tocopherol 7.44 $\mu\text{mol/L}$, 6.05 min alpha-tocopherol 22.56 $\mu\text{mol/L}$).

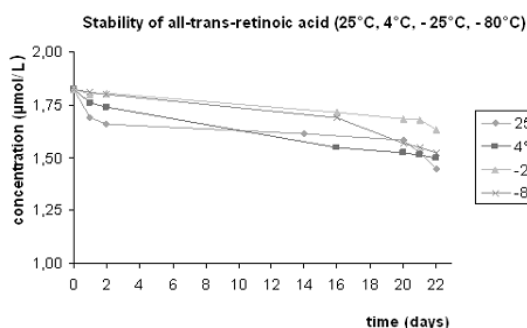


Figure 3. Stability of all-*trans*-retinoic acid in methanolic solution at concentration 1.82 $\mu\text{mol/L}$ at different temperatures (calculated by internal standard).

methanol and water, and suitable for masking the residual silanol functions [22]. Thus symmetrical peaks and better separations of analytes were possible.

Extraction of retinoids by use of the SPE techniques has been known to give low recoveries which are most probably caused by their highly protein-binding nature and their poor solubility in aqueous media [16].

Several procedures for sample pretreatment have been developed. Sample preparation is usually restricted to a liquid extraction procedure to liberate retinoids from the matrix and to solubilize them for subsequent injection onto a HPLC system. Some investigators used an on-line solid-phase extraction in combination with column switching [28]. Retinoids are sensitive to light, oxygen, and heat, all of which have to be considered in relation to sample collection and storage [13, 29]. Only a few examples exist where biological samples were applied to an analytical column without prior extraction [13, 30]. Gundersen and Sakhi used on-line SPE [16, 30]. Various methods for liquid–liquid extraction of retinoids were performed [31–33]. To extract all retinoids efficiently

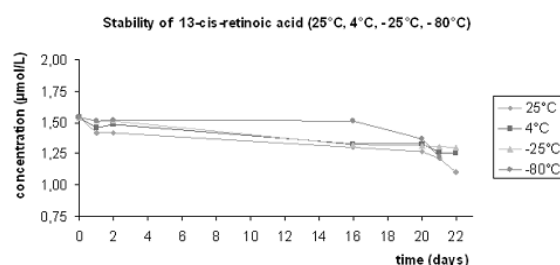


Figure 4. Stability of 13-*cis*-retinoic acid in methanolic solution at concentration 1.54 $\mu\text{mol/L}$ at different temperatures (calculated by internal standard).

from the biological matrix, a mono-phase liquid extraction utilizing isopropanol was employed [34]. Tocopherols were extracted into hexane using ethanol or ethanol with 1% of methanol as deproteinization solution [23, 35, 36].

Solid phase extraction of retinoids is very complicated. The reason may be the lack of good recovery when untreated plasma samples are applied to reversed phase stationary phases [13]. McPhilips *et al.* precipitated plasma proteins with acetonitrile and diluted the supernatant with acetic acid before SPE on C18 cartridges [37]. Plasma was extracted with *tert*-butyl methyl ether, using Extrelut columns, followed by a second clean-up on amino columns [13]. Vitamin E was extracted with other vitamins using a robotic station for liquid–liquid extraction, connected on-line with an automatic system for solid-phase extraction [38].

4.1 Application of the method

A simple, reproducible, and rapid method using monoliths that allows high throughput determination of phys-

iological and pharmacological concentrations of retinoids and tocopherols in serum samples is presented. Potential utilization of the method includes monitoring of drug concentrations in patients treated with retinoic acid for acute promyelocytic leukemia or for other malignancies in clinical trials. The monitoring of serum all-*trans*-retinoic acid concentrations is important in patients treated with this substance because of variations in pharmacokinetics and autoinduction of catabolism [4, 5]. Moreover, retinoic acid metabolism could be altered because of comorbidity, which is frequent in cancer patients. All-*trans*-retinoic acid is currently the standard therapy for acute promyelocytic leukemia, but 13-*cis*-retinoic acid may also be active in other tumors, e.g. squamous cell carcinoma of head and neck or uterine cervix [2, 6]. Retinoids are also under active investigation for cancer prevention, and monitoring of serum retinoic acids concentrations may also be useful in chemopreventive trials. Retinoic acids have also been studied in non-neoplastic disorders, such as emphysema [39].

The available data on serum retinoic acid concentrations in normal subjects or patients are limited, especially when compared with the data on other retinoids, e.g. retinol. Serum retinoic acid concentrations in normal subjects are in the nanomolar range, usually between 3 and 8 nmol/L [28, 39, 40], but slightly lower concentrations have been reported elsewhere [41]. Serum retinoic acid concentrations two orders of magnitude higher have been observed after oral administration [4, 5, 42]. A less dramatic increase of serum retinoic acid has been described as a result of a diet rich in retinoids or vitamin A supplements [43]. Lower retinoic acid concentrations have been reported in newborns [44] or during fasting [45]. Lower levels of serum retinoic acid have been observed in patients with lung cancer [46]. In animals, an increase of serum retinoic acid has been associated with inflammation [47]. However, there is little data on serum retinoic acid in patients with other tumors and in cancer patients during different phase of the disease, or before and after surgery, chemotherapy, or radiation.

So far, in most publications, alpha-tocopherol has been investigated in epidemiological studies in relation to cancer risk. For example, lower vitamin E concentrations have been reported in patients with breast cancer [48]. An association of low vitamin E intake and toxicity of chemotherapy has been reported in children with acute lymphoblastic leukemia [39]. We reported a similar observation in patients with breast and ovarian carcinoma treated with paclitaxel/platinum combination [49]. In addition, the administration of vitamin E has been shown to alleviate toxic effects of radiotherapy [10] or chemotherapy [13]. Although serial monitoring of vitamin E levels is a necessary prerequisite for any therapeutic use of this antioxidant vitamin, serum vitamin E is still not being routinely measured in cancer patients.

5 Concluding remarks

In this work, a new fast and simple HPLC method for selective and sensitive determination of all-*trans*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, retinol, gamma- and alpha-tocopherol in human serum using a monolithic column for clinical monitoring was developed and validated.

This method may be useful for pharmacokinetic monitoring of patients treated with retinoic acid for acute promyelocytic leukemia or patients with other tumors treated in clinical trials. This method will allow analysis of a large number of samples in clinical studies at relatively low cost, resulting in a better understanding of the metabolism of these compounds.

This work was supported by GAUK 88407/2009, MZO 00179906, IGA MZ CR NR/9096-4 and MSM 021620822.

The authors declared no conflict of interest.

6 References

- [1] Huang, M. E., Chen, Y. C., Chai, S. R., Lu, J. R., Zhao, L. J. X., Gu, L. J., Wang, Z. Y., *Blood* 1988, 72, 567–572.
- [2] Lippman, S. M., Lotan, R., Schleuniger, U., *Int. J. Cancer* 1997, 70, 481–483.
- [3] Park, S. H., Gray, C., Hernandez, I., Jacobs, M., Orth, R. A., Sutharalingam, M., Smith, R. G., Van Echo, D. A., Wu, S., Cinley, B. A., *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 847–851.
- [4] Mundi, J., Frankel, S. R., Miller, W. H., Jakubowski, A., Scheinberg, D. A., Young, C. W., Dmitrovsky, E., Warrell, R. P., *Blood* 1992, 79, 299–303.
- [5] Mundi, J. R. F., Frankel, S. R., Huselton, C., DeGrazia, F., et al., *Cancer Res.* 1992, 52, 2138–2142.
- [6] Shin, D. M., Khuri, F. R., Murphy, B., Garden, A. S., Clayman, G., Francisco, M., Liu, D., Glisson, B. S., Ginsberg, L., Papadimitrakopoulou, V., Myers, J., Morrison, W., Gillenwater, A., Ang, K. K., Lippman, S. M., Goepfert, H., Hong, W. K., *J. Clin. Oncol.* 2001, 19, 3010–3017.
- [7] Sun, S. Y., Lotan, R., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002, 41, 41–55.
- [8] Papadimitrakopoulou, V. A., Clayman, G. L., Shin, D. M., Myers, J. N., Gillenwaters, A. M., Goepfert, H., El-Maggar, A. K., Lewin, J. S., Lippman, S. M., Hong, W. K., *Head Neck Surg.* 1999, 125, 1083–1089.
- [9] Debier, C., Larondelle, Y., *Br. J. Nutr.* 2005, 93, 153–174.
- [10] Delanian, S., Porcher, R., Balla-Mekias, S., Lefaix, J. L., *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 2545–2550.
- [11] Erhola, M., Nieminen, M. M., Ojala, A., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1998, 17, 325–330.
- [12] Pace, A., Savarese, A., Picardo, M., Maresca, V., Pacetti, U., Del Monte, G., Biroccio, A., Leonetti, C., Jandolo, B., Cogentti, F., Bove, L., *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 927–931.
- [13] Wyss, R., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 1995, 671, 381–425.
- [14] Klvanová, J., Brtko, J., *Endocr. Regul.* 2002, 36, 107–113.
- [15] Takeda, N., Yamamoto, A., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 1994, 657, 53–59.
- [16] Gundersen, Th. E., Lundanes, E., Blomhoff, R., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 1997, 691, 43–58.
- [17] Ruhl, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 2497–2509.

- [18] Giagounidis, A., Haase, S., Germich, U., Schlegelberger, B., Wysk, J., Grips, K. H., Grabenshorst, V., Rothmann, F., Lubbert, M., Ganster, A., Aivado, M., Heinisch, A., Aul, C., *Ann. Hematol.* 2005, 84, 389–395.
- [19] Dimery, I. W., Hong, W. K., Lee, J. J., Guillory-Perez, C., Phan, F., Fritsche, H. A., Lippman, S. M. Jr., *Ann. Oncol.* 1997, 8, 85–89.
- [20] Bieri, J. G., Wu, A., Tolliver, T. J., *J. Nutr.* 1981, 111, 458–467.
- [21] Bieri, J. G., Tolliver, T. J., *J. Nutr.* 1982, 112, 401–403.
- [22] Barua, A. B., Olson, J. A., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 1998, 707, 69–79.
- [23] Urbánek, L., Solichová, D., Melichar, B., Dvorák, J., Svobodová, I., Solich, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, 573, 267–72.
- [24] Kobayashi, H., Ikegami, T., Kimura, H., Hara, T., Takuda, D., Tanaka, N., *Anal. Sci.* 2006, 22, 491–501.
- [25] *European Pharmacopoeia*, 4th edition (Ph. Eur. 4), Council of Europe, Strasbourg, 2001, Chromatographic Separation Techniques (2.2.46), 61.
- [26] International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995, 11260.
- [27] International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, US FDA Federal Register, Vol. 62, March 1997, 27463.
- [28] Schmidt, C. K., Brouwer, A., Nau, H., *Anal. Biochem.* 2003, 31, 36–48.
- [29] Curley, R. W., Fowble, J. W., *Photochem. Photobiol.* 1988, 47, 831–835.
- [30] Sakhi, A. K., Gundersen, T. E., Ulven, S. M., Blomhoff, R., Lundanes, E., *J. Chromatogr. A* 1998, 828, 451–460.
- [31] Napoli, J. L., Pramanik, B. C., Williams, J. B., Dawson, M. I., Hobbs, P. D., *J. Lipid Res.* 1985, 26(3), 387–392.
- [32] De Leenheer, A. P., Lambert, W. E., Claeys, I., *J. Lipid Res.* 1982, 23, 1362–1367.
- [33] Taibi, G., Nicotra, C. M., *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, 780, 261–261.
- [34] Collins, M. D., Eckhoff, C., Slikker, W., Bailey, J. R., Nau, H., *Fundam. Appl. Toxicol.* 1992, 19, 109–116.
- [35] Hoehler, D., Frohlich, A. A., Marquardt, R. R., Stelsovsky, H. J., *Agric. Food Chem.* 1998, 46, 973–978.
- [36] Handelman, G. J., Machlin, L. J., Fitch, K., Weiter, J. J., Dratz, E. A., *J. Nutr.* 1985, 115, 807–813.
- [37] McPhillips, D. M., Kalin, J. R., Hill, D. L., *Drug Metab. Dispos.* 1987, 15, 204–206.
- [38] Mata-Granados, J. M., Luque De Castro, M. D., Quesada, J. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 35, 575–582.
- [39] Kennedy, D. D., Tucker, K. L., Ladas, E. D., Reinhold, S. R., Blumberg, J., Kelly, M., *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 1029–1036.
- [40] Mao, J. T., Goldin, J. G., Dermand, J., Ibrahim, G., Brown, S. M., Emerick, E., McNitt-Gray, M. F., Gjertson, D. W., Estrada, F., Tashkin, D. P., Roth, M. D., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, 165, 718–723.
- [41] Siegel, E. M., Graft, N. E., Roe, D. J., Duarte-Franco, E., Willa, L., Franco, E. L., Giuliano, A. R., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004, 13, 1693–1701.
- [42] Adamson, P. C., Bailey, J., Pluda, J., Poplack, D. G., Bauza, S., Murphy, R. F., Yarchoan, R., Balis, F., *J. Clin. Oncol.* 1995, 13, 1238–1241.
- [43] Van Vliet, T., Boelsma, E., de Vries, A. J., van den Berg, H., *J. Nutr.* 2001, 131, 3197–3203.
- [44] Soderlund Berggren, M., Fex, G. A., Nilsson-Ehle, P., *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 633–636.
- [45] Soderlund Berggren, M., Fex, G. A., Nilsson-Ehle, P., *J. Inter. Med.* 2003, 253, 375–380.
- [46] Moulas, A. N., Gerogianni, I. C., Papadopoulos, D., Gourgouliannis, K. I., *Respirology* 2006, 11, 169–174.
- [47] Van Merris, V., Meyer, E., Duchateau, L., Blum, J., Burvenich, C., *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 980–987.
- [48] Ray, G., Husain, S. A., *Clin. Biochem.* 2001, 34, 71–76.
- [49] Melichar, B., Kalabova, H., Krcmova, L., Urbánek, L., Hyspler, R., Malirova, E., Solichova, D., *Anticancer Res.* 2007, 27, 4397–4401.

13.8 Serum Neopterin, Retinol and Alpha-tocopherol in Patients with the Carcinoma of the Esophagus

J. Cincibuch, B. Melichar, H. Studentova, M. Kapustova, E. Malirova, D. Solichova, L. Krcmova, M. Kasparova, P. Schneiderka, J. Juranova, V. Sramek and K. Cwiertka

Pteridines, 20, 2, 49-53, 2009 (Citováno–1, IF₂₀₀₉–0,379)

Pteridines
Vol. 20, 2009, pp. 49 - 53

Serum Neopterin, Retinol and Alpha-tocopherol in Patients with the Carcinoma of the Esophagus

Jan Cincibuch¹, Bohuslav Melichar^{1,5}, Hana Študentová¹, Miloslava Kapustová², Eva Malířová⁴, Dagmar Solichová⁵, Lenka Krcmová^{5,7}, Markéta Kašparová^{5,7}, Petr Schneiderka², Jarmila Juránová³, Vlastislav Šrámek¹, Karel Cwiertka¹

¹Department of Oncology, ²Department of Clinical Biochemistry, and ³Hematology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, and ⁴Department of Nuclear Medicine, ⁵Department of Gerontology and Metabolic Care, and ⁶Department of Internal Medicine, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Hradec Králové, and ⁷Department of Analytical Chemistry, Charles University School of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic

Abstract

Increased serum or urinary concentrations of neopterin have been described in patients with tumors of different primary locations, but reports on neopterin in patients with esophageal carcinoma are scanty. We have studied serum neopterin, retinol and alpha-tocopherol in 45 patients with carcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction. Serum neopterin was determined using radioimmunoassay. Retinol and alpha-tocopherol were determined by high-performance liquid chromatography. Serum neopterin in patients with carcinoma of the esophagus was significantly increased while retinol and alpha-tocopherol were significantly decreased compared to controls. No correlation of neopterin with hemoglobin or peripheral blood cell counts was observed. During chemoradiation, neopterin increased significantly, while retinol and alpha-tocopherol did not change. In conclusion, the present study demonstrates increased serum neopterin and decreased retinol and alpha-tocopherol concentrations in patients with esophageal carcinoma. Chemoradiation induced a further increase of serum neopterin concentrations.

Key words: alpha-tocopherol, esophageal carcinoma, neopterin, retinol

Introduction

In Western countries, esophageal carcinoma is a relatively rare tumor. The mortality of patients affected with esophageal carcinoma is, however, high. Only a minority of patients presents with resectable tumors, and in patients who undergo resection the local and distant recurrence rate is high. Long-term survival may be obtained in only about 20% of patients undergoing radical resection. It has been demonstrated in randomized clinical trials that the administration of chemotherapy combined with external beam radiation increases the resection rate and improves survival compared to patients treated with surgery alone (1).

Preoperative (neoadjuvant) chemoradiation increases the percentage of radical operations and improves survival, however, at a price of significant toxicity.

Anemia commonly accompanies cancer and antitumor therapy (2). In many tumors, including esophageal carcinoma, low hemoglobin is associated with poor prognosis. In cancer patients, anemia is usually related to alterations of iron metabolism (3). In most cases, this is the anemia of chronic disease. An important part in pathogenesis of anemia associated with cancer is played by disorders of iron metabolism associated with systemic inflammatory response that is reflected in increased C-reactive protein or neopterin concentrations (4, 5). Neopterin is a heterocyclic compound which is primarily produced by human macrophages activated with Th1-type cytokine interferon-gamma. Thus, neopterin is an indicator of systemic immune activation (6). Increased urinary or serum neopterin concentrations accompany infectious and autoimmune disorders as well as cancer. In patients with cancer

Correspondence to: Karel Cwiertka M.D., Ph.D., Department of Oncology, Palacký University Medical School & Teaching Hospital, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic, phone: +420-588444288, fax: +420-588442522, e-mail: karel.cwiertka@fnol.cz

Pteridines/Vol. 20/No. 2

Table 1. Patient demographics

Parameter		n
Sex	Male	35
	Female	10
Histology	adenocarcinoma	17
	squamous cell carcinoma	28
Location	esophagus	33
	gastroesophageal junction	12
Stage	I-IIa	23
	IIb-III	13
	IV (distant metastases)	9

increased neopterin is associated with poor prognosis.

In previous studies we have demonstrated that systemic chemotherapy is accompanied by a significant rise in urinary neopterin that indicates systemic immune activation during chemotherapy (7). The rise of neopterin correlated with other abnormalities, e.g. decreased hemoglobin. Other studies have also confirmed the prognostic significance of neopterin in cancer patients. On the other hand, our knowledge concerning neopterin in esophageal carcinoma is very limited. Neopterin and dihydroneopterin are an oxidant/antioxidant system and changes in neopterin concentrations may be involved, at least partly, in changes of antioxidant equilibrium (8).

Oxidative equilibrium is also linked to the concentrations of some liposoluble vitamins, e.g. vitamin A or vitamin E (9). In earlier studies we have demonstrated significant changes in the serum concentrations of vitamins A (retinol) and E (alpha-tocopherol) (10). Alpha-tocopherol is a major serum antioxidant and changes in the concentrations of these vitamins are also associated with oxidative stress. A decrease of alpha-tocopherol correlated in cancer patients with the presence of systemic inflammatory response, and concentrations increased after chemotherapy (10). Changes in serum alpha-tocopherol were also associated with differences in the tolerance of chemotherapy (10). Because of significance of nutritional parameters in patients with esophageal carcinoma it is expected that changes in the concentrations of these vitamins will occur during neoadjuvant chemotherapy that could reflect the course of therapy.

The literature on neopterin as a marker of systemic immune activation in patients with esophageal carcinoma is limited (11). In the present study, we evaluated serum neopterin, alpha-tocopherol and retinol in patients with esophageal carcinoma. Correlation with

hemoglobin and peripheral blood cell counts was also evaluated.

Materials and Methods

Forty-five patients, 10 females and 35 males, aged (mean \pm standard deviation) 61 ± 11 (range 36 - 85) years, with histologically verified carcinoma of the esophagus, including 12 patients with tumors involving gastroesophageal junction, were included in the study (Table 1). Seventeen patients had adenocarcinoma, including the 12 patients with tumors involving gastroesophageal junction, and 28 patients had squamous cell carcinoma. Neopterin, retinol and alpha-tocopherol determination was performed in serum samples obtained for biochemical examination during routine care after the patient consent. The samples were obtained before therapy in 42 patients. Ten patients were examined before and after chemoradiation that included systemic administration of cisplatin and 5-fluorouracil and external beam radiation therapy. In three patients, samples were obtained after chemoradiation. Twenty healthy subjects, 15 females and 5 males, aged 43 ± 12 (range 25 - 61) years, served as controls.

The samples were stored at -20°C until analysis. Neopterin was determined with radioimmunoassay using a commercial kit (BRAHMS, Hennigsdorf, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Serum alpha-tocopherol and retinol were determined before and during the therapy by high performance liquid chromatography as described (12). Blood samples were drawn from a peripheral vein after an overnight fast. The samples were transferred immediately to the laboratory, centrifuged ($1600 \times g$, 10 minutes, 16°C), the serum was separated and frozen at -20°C until analysis. In the liquid-liquid extraction procedure, $500\mu\text{l}$ of serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5 % methanol ($500\mu\text{l}$, 5 minutes, 4°C). Subsequently, $2\ 500\mu\text{l}$ of n-hexane was added to this mixture and extracted for 5 minutes by a vortex apparatus. After centrifugation ($1\ 600 \times g$, 10 minutes, 0°C), the aliquot ($2\ 000\mu\text{l}$) of the clean extract was separated and evaporated in a vacuum concentrator (45°C). The residue was dissolved in $400\mu\text{l}$ methanol and analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography using the external standard calibration. The analyses were performed using the Perkin Elmer high performance liquid chromatography set (Norwalk, USA) comprising of a LC 200 pump, a LC 200 autosampler, LC Column Oven 101 thermostat and LC 235C Diode Array Detector attached to the Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation version 4.1. Separation of alpha-

tocopherol and retinol was performed using the Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm monolithic columns (Merck, Darmstadt, Germany). Methanol (100 %) was used as the mobile phase at the flow rate of 2,5 ml.min⁻¹ and column pressure 3.3 MPa. The block heater LC Oven 101 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) was utilized to keep the analytical column temperature at 25°C. The injection volume was 50µl. The detection of alpha-tocopherol and retinol was carried out at 295 nm and at 325 nm, respectively.

Peripheral blood cell count was performed using Coulter LH 750 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) and Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) hematology analyzers according to the instructions of the manufacturers. Hemoglobin was measured by a photometric method using sodium lauryl sulfate. Leukocytes were detected by flow cytometry method using a semiconductor laser, and platelets by impedance method using hydrodynamic focusing.

Differences of laboratory parameters between groups of patients or controls were analyzed by the Mann-Whitney U test. Differences before and after the therapy were compared by Wilcoxon signed rank test. Correlations were analyzed using Spearman's rank correlation coefficient. The decision on statistical significance was based on $p = 0.05$ level. The analyses were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

Results

Average serum neopterin concentrations in patients with carcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction was significantly increased compared to controls (mean \pm standard deviation 7.5 ± 6.4 , range 3.7 - 46.0 vs. 4.6 ± 0.8 , range 3.5 - 6.8 nmol/L, $p = 0.0002$). In contrast, serum alpha-tocopherol and retinol were significantly decreased (18.6 ± 8.0 , range 1.7 - 37.4 vs. 22.9 ± 6.1 , range 14.8 - 41.4µmol/L, $p < 0.001$, and 1.23 ± 0.61 , range 0.23 - 3.04 vs. 1.67 ± 0.26 , range 1.17 - 2.15µmol/L, $p < 0.05$, respectively). In patients mean hemoglobin was 138 ± 19 (range 82 - 165) g/L, mean leukocyte count was 8.5 ± 2.4 (range 4.3 - 13.6) $\times 10^9/L$, and mean platelet count was 282 ± 95 (range 114 - 581) $\times 10^9/L$. No significant differences in the investigated parameters were observed based on stage or histology with the exception of significantly lower retinol (1.07 ± 0.60 , range 0.23 - 3.04 vs. 1.49 ± 0.54 , range 0.95 - 2.62µmol/L, $p = 0.01$) and alpha-tocopherol (16.1 ± 8.7 , range 1.7 - 37.4 vs. 22.5 ± 4.9 , range 11.7 - 32.2µmol/L, $p < 0.01$) in patients with squamous histology compared to patients with adenocarcinoma.

In 10 patients, samples were obtained before thera-

py and after chemoradiation and neopterin was significantly increased by treatment, (6.2 ± 2.0 vs. 12.1 ± 4.6 nmol/L, $p = 0.005$; Fig. 1). No such change has

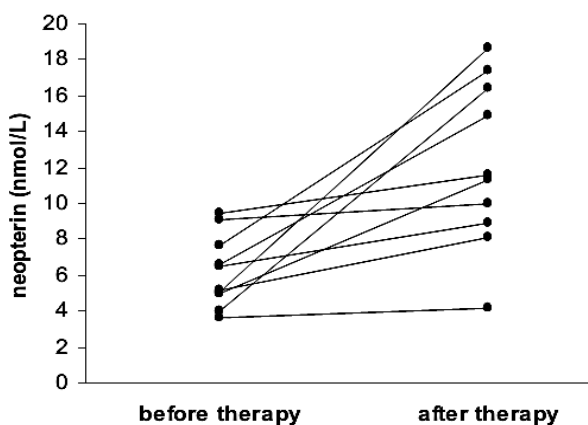


Figure 1. Serum neopterin concentrations before and after chemoradiation

been observed in serum alpha-tocopherol and retinol concentrations (12.9 ± 7.2 vs. 15.7 ± 7.5 , and 1.09 ± 0.44 vs. 1.15 ± 0.64 µmol/L, respectively). Hemoglobin concentration, leukocyte and platelet counts were significantly decreased compared to pre-treatment evaluation (147 ± 13 vs. 115 ± 10 g/L, $p < 0.01$, 8.1 ± 1.6 vs. $5.0 \pm 1.8 \times 10^9/L$, $p = 0.008$, and 247 ± 59 vs. $177 \pm 53 \times 10^9/L$, $p < 0.05$, respectively).

In patients serum neopterin correlated significantly with age ($r_s = 0.65$, $p < 0.00001$), and retinol correlated with alpha-tocopherol ($r_s = 0.54$, $p < 0.001$). No other significant correlation was observed between serum neopterin and retinol, alpha-tocopherol and hemoglobin concentrations or leukocyte or platelet counts in patients before therapy or after chemoradiation.

Discussion

Present data demonstrate increased serum neopterin concentrations in patients with esophageal carcinoma. An increase in serum or urinary neopterin concentrations in cancer patients has been amply documented (13, 14), but little is known about neopterin in patients with carcinoma of the esophagus (11). In the present study, we demonstrate increased serum concentrations of neopterin in patients with carcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction that were accompanied by decreased concentrations of retinol and alpha-tocopherol.

Neopterin is increased in different disorders associated with systemic immune or inflammatory response, therefore determination of neopterin would be of little use in diagnosis. In patients with tumors of different primary locations, increased serum or urinary neopterin concentrations were associated with poor prognosis (13, 14). In earlier studies, correlations were observed between lower numbers or impaired function of lymphocytes or dendritic cells and increased neopterin concentrations (13). Thus, increased neopterin concentrations are thought to reflect immune dysregulation. An increase in serum neopterin has been observed in patients treated with chemoradiation indicating that the therapy results in systemic immune activation. Activation of systemic immune or inflammatory response has been earlier reported after the administration of cytotoxic agents (7) or radiotherapy (15). For example, in patients with breast carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy, we have observed increased urinary neopterin concentrations throughout the course of treatment (7).

In patients with esophageal carcinoma, increased concentrations of C-reactive protein, a marker of systemic inflammatory response, were reported that were associated with poor prognosis (16). The number of patients in the present study and short follow up did not allow us to investigate the prognostic significance of serum neopterin concentrations, but the prognostic significance of neopterin in esophageal carcinoma should be addressed in future studies. Nutritional deficiency is common in patients with esophageal carcinoma (17). Therefore, lower concentrations of retinol and alpha-tocopherol might be expected. No correlation of retinol or alpha-tocopherol was observed with serum neopterin.

A negative correlation between serum neopterin concentrations and hemoglobin has been described in patients with hematological and gynecological malignancies (4, 5). In the present cohort of patients, anemia was present only in a minority of patients, and mean hemoglobin concentrations indicate that a substantial proportion of patients had hemoglobin concentrations increased above normal range. Low hemoglobin concentrations are associated with poor prognosis in many tumors, but in patients with esophageal carcinoma both high and low hemoglobin predicts poor prognosis (18). No correlation was observed between hemoglobin and neopterin before or after the treatment, possibly because abnormal hemoglobin concentrations in esophageal carcinoma are observed both in high and low range.

In conclusion, serum neopterin is increased in patients with esophageal carcinoma. A further increase was induced by chemoradiation. Increased neopterin concentrations were accompanied by decreased serum

retinol and alpha-tocopherol.

Acknowledgement

Supported by Research Projects MZO 00179906 and MSM 6198959216.

References

- 1 Enzinger PC, Ilson DH, Kelsen DP. Chemotherapy in esophageal cancer. *Semin Oncol* 1999; 26 (Suppl. 15): 12-20.
- 2 Groopman JE, Itri LM. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1616-1634.
- 3 Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, et al. Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Haematol* 1991; 46: 65-70.
- 4 Denz H, Fuchs D, Huber H, et al. Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *Eur J Haematol* 1990; 44: 186-189.
- 5 Wachter H, Artner-Dworzak E, Fuchs D, et al. Association between neopterin and iron metabolism in cancer patients. *TumorDiagn Ther* 1990; 11: 229-232.
- 6 Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81-141.
- 7 Melichar B, Urbanek L, Krcmova L, et al. Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy. *Anticancer Res* 2008; 28: 2389-2396.
- 8 Murr C, Fuith LC, Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Fuchs D. Increased neopterin concentrations in patients with cancer indicator of oxidative stress? *Anticancer Res* 1999; 19: 1721-1728.
- 9 Blaha V, Solichova D, Cernohorsky D, Hyspler R, Zdansky P, Zadak Z. Fluorometric assay of lipoperoxides and chromatographic analysis of alfa tocopherol and fatty acids as biomarkers of risk from coronary atherosclerosis. *Talanta* 2003; 60: 505-513.
- 10 Melichar B, Kalabova H, Krcmova L, et al. Serum alpha-tocopherol, retinol and neopterin during paclitaxel/carboplatin chemotherapy. *Anticancer Res* 2007; 27: 4397-4401.
- 11 Melichar B, Solichova D, Svobodova I, Urbanek L, Melicharova K. Urinary neopterin in patients with upper gastrointestinal, biliary and pancreatic carci-

13.9 The importance of rheological parameters in the therapy of microcirculatory disorders

M. Blaha, E. Rencova, V. Blaha, R. Maly, M. Blazek, J. Studnicka, C. Andrys, I. Fatorova, S. Filip, M. Kasparova, R. Prochazkova, J. Maly, R. Zimova and H. Langrova

Clinical Hemorheology and Microcirculation, 42, 1, 37-46, 2009, (Citováno–14, IF₂₀₀₉–1,780)

The importance of rheological parameters in the therapy of microcirculatory disorders

M. Bláha^a, E. Rencová^b, V. Bláha^{c,*}, R. Malý^d, M. Blažek^a, J. Studnička^b, C. Andrýs^e, I. Fátorová^a, S. Filip^f, M. Kašparová^c, R. Procházková^a, J. Malý^a, R. Zimová^a and H. Langrová^b

^a *IInd Department of Internal Medicine, Haematology, Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

^b *Department of Ophthalmology, Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

^c *Department of Geriatry and Metabolism, Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

^d *Ist Department of Internal Medicine, Angiology, Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

^e *Institute of Immunology and Allergology, Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

^f *Department of Oncology and Radiotherapy, Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

Received 15 August 2008

Accepted 9 January 2009

Abstract. Rheological conditions basically influence tissue perfusion, oxygen and nutrient supply, tissue regeneration and in its consequence the course of pathological processes, especially in microcirculation and partially even in macrocirculation. Haemorheotherapy has shown to be successful in several indications (critical disorders in microcirculation) when other methods of therapy have failed. In this study we describe the changes of effectivity indicators in haemorheopheresis treatment and their clinical importance in cases of eye microcirculation, statoacoustic apparatus and disorders of the lower extremities. We treated with haemorheopheresis (separator Cobe.Spetra + Evaflux filter) 24 patients (16 patients with age related macular degeneration, 5 with critical peripheral arterial foot disease, and 3 with acute hearing loss). After the procedures α_2 -macroglobulin decreases by about 58%, fibrinogen by about 69%, IgM by about 61%, LDL-cholesterol by about 77%, apolipoprotein B by about 76% and lipoprotein(a) by about 63%. It corresponds with a decrease in blood and plasma viscosity and clinical improvement in the observed patients, i.e. visual improvement, acceleration of tissue defect healing and improvement in hearing. We noticed 7.1% clinically insignificant side-effects. The method of haemorheopheresis was safe. It led to improvement in patients' clinical condition in the above mentioned indications when other methods of treatment failed.

Keywords. Haemorheology, microcirculation, age related macular degeneration, diabetic foot, acute hearing loss

1. Introduction

Organ perfusion is related to blood flow, which is determined from the blood vessels and the rheology of the blood, both of which are related to each other. Blood rheology as related to whole blood

*Corresponding author. E-mail: blaham@email.cz.

viscosity is mainly determined from the blood cells and plasma. The fluidity of plasma is mainly determined from high molecular weight protein molecules as the molecular weight relates to the molecular size [12]. Physical laws related to blood rheology and/or organ perfusion are Ohm's law, Newton's law, Farhreis-Lindquist's law, Starling-Straubs and Kirchoff's law. Hagen-Poiseuille's law is of major interest as it hints at the importance of viscosity under conditions where other variables can hardly be influenced [6]. Thus a set of variables arises along with a new situation in the tissue microcirculation at each moment. Final rheological relations substantially influence tissue perfusion, supplying oxygen and nutrients, tissue regeneration and consequently the entire course of pathological processes, especially in the blood microcirculation and partially in macrocirculation. Blood rheology was considered to be of limited clinical importance until extracorporeal technologies enabling the treatment of cellular and plasmatic hyperviscosity syndromes were introduced in the second half of the 1970s. Since then, with the ongoing development of secondary differential separation techniques (such as precipitation), double filtration and rheohaemapheresis have been used for extracorporeal haemorheotherapy. Haemorheotherapy proved successful in several indications when critical disorders in the microenvironment developed and other therapeutic methods used up to that time had failed [30].

Rheological therapy is aimed at the improvement of clinical conditions. Its effectivity could be measured by changes in the main indicators of rheological conditions in tissues. As the fluidity of plasma is mainly determined by high molecular weight proteins, haemorheopheresis is directed to clearing away components such as fibrinogen, IgM, complement, α_2 -macroglobulin, lipoproteins (LDL-cholesterol). Molecules of molecular weight less than 150,000 are left in plasma.

In this study we describe changes in rheological effectivity indicators in the course of haemorheotherapy and their clinical importance in cases of microcirculatory disorders.

2. Methods

2.1. Our modification of haemorheopheresis

Plasma without cellular elements after high-speed centrifugation, obtained with a quality separator (Cobe-Spectra, Denver, USA) is drawn through a second level – filter. We used Evaflux 4A (Kuraray, Osaka, Japan) as the secondary filters. Plasma flow is continual, anticoagulation is carried out with a basic bolus of heparin and then continually with ACD-A (Baxter, USA) solution. The amount of washed plasma was counted with a Cobe-Spectra separator computer. In every therapeutic series, the amount washed was 1 body volume during the first procedure and 1.5 volume in all following procedures. The size of the filter pores enables catchments of a considerable amount of LDL-cholesterol, lipoprotein(a), fibrinogen, α_2 -macroglobulin and immunoglobulins, especially IgM. Other technical details are the same as during haemapheretic procedures (a more detailed description is in [2,3,6]).

2.2. Laboratory investigations

The basic examinations were carried out: blood count, basic biochemical profile (Na, K, Cl, Ca, P, urea, creatinine, urine acid, bilirubin, AST, ALT, creatine kinasis, alkali phosphates, total protein, albumin), spectrum of lipoproteins (total cholesterol, LDL-, HDL-cholesterol, lipoprotein(a)), triacylglycerols, apolipoprotein A, apolipoprotein B; further fibrinogen levels, α_2 -macroglobulin and immunoglobulins. Samples were collected before and after hemorheopheresis. The laboratory which performed the measurements is certified and accredited in the programs EQA SEKK (Czech Republic) and DGKL

(Germany). Informed consent was obtained from all patients. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee, and the reported investigations were in accordance with the principles of the current version of the Helsinki Declaration.

2.3. Patients and controls

We treated with hemorheopheresis 24 patients with severe disorders of microcirculation. Treating them with other known and accessible methods had proven unsuccessful.

2.3.1. Age related macular degeneration (AMD)

A total number of 29 eyes in 16 patients with dry AMD were randomized for treatment from 2005 to 2007, aged 64 ± 5 years (55–71, mean 63). In all patients, progressive, dry AMD was confirmed. Diagnosis was carried out with digital fundus photography of the eye, fluorescein angiography (FAG) and optic coherent tomography (OCT). The control set was formed by 25 eyes in 16 comparable patients (with the same disease). The design of the study was the same as the to that time largest published MIRA-1 study [28], i.e., 2 procedures weekly, then a 14 day pause, repeating the procedure four times. The introduced ophthalmologic examinations were carried out before and after the procedures, that is, after the first, the fourth and the last procedure.

2.3.2. Peripheral arterial foot disease

A total of 5 patients were treated with ischemic arterial foot disease of grade III or IV according to the Fontain classification. They fulfilled the criteria of critical extremity ischemia (CLI) according to TASC (Transatlantic Inter-Society Consensus 2007) [24]. The patients were two women (62 years in age) and three men (51, 56 and 61 years old). A series of 10 hemorheophereses (2 procedures a week, followed by a 2 week pause, then the whole process was repeated five times) were used. It was “ultimum reffugium” treatment when in spite of the application of medicamentous and surgical means amputations of the extremities threatened.

2.3.3. Sudden hearing loss

Three patients were treated (2 men aged 50 and 61, and 1 woman aged 68). All fulfilled the criteria of acute idiopathic sudden sensorineural hearing loss (SSHL) [27,33,34]. The disorder was unilateral, accompanied with tinnitus, lasting 1 week, 1 month and 3 months, respectively. In each patient the three procedures were carried out over a span of two weeks.

3. Statistical analysis

The aim of the evaluation was to measure determined parameters in investigated sets and to evaluate the parameters before and after apheretic procedures, and in AMD cases to compare the results with the control set. Microsoft Excel 2003 statistical software and NCSS 2007 were used for statistical evaluation. For evaluation of the normality of the data distribution in the sets we used the D'Agostine test. Student's *t*-test, *F*-test and Pearson's correlation coefficient were used for normally distributed data. For the sets with data distribution in which normality was not confirmed, the Mann-Whitney test, Wilcoxon's pair test and Spearman's correlation coefficient were used. Statistical significance was judged on the level of $p \leq 0.05$.

The software SYSTAT 8 was used for statistical calculation during AMD evaluation. Visual acuity was evaluated in three categories: worsening, improving and without change. Independence of frequencies of

separate categories between the treated patients and the control set was evaluated with Pearson's χ^2 -test on the significance level 5%. For drusen evaluation the results of the examination were arranged, due to the small number of values, into two categories (worsening in comparison with improvement or no change). Fisher's exact test was used for the evaluation.

4. Results

The safety of the procedures was confirmed by the results of the investigated blood counts and basic biochemical indicators. No clinically serious changes were noted (results not given). α_2 -Macroglobulin, IgM, fibrinogen, lipoproteins and their effect on blood and plasma viscosity were evaluated as the indicators of rheopheresis procedure effectivity (see Table 1).

(Note: Results of patients with acute hearing loss are not given in Table 1, since the small number does not enable statistical evaluation.) A decrease appeared even in PAD in almost all indicators, but not statistically significant in α_2 -macroglobulin and IgM; it might be due to the small numbers used in this set.

4.1. Clinical results

Clinical results could be briefly summed up by stating that they corresponded with significant improvement in rheological parameters.

Table 1
Indicators of rheological effectivity – patients according to diagnosis

Followed parameter	Diagnosis	N	Before procedure		After procedure		Statistical significance	% of difference
			Mean	SD	Mean	SD		
Immunoglobulin M	AMD	40	1.35	0.62	0.52	0.53	<0.001	-61.48
	PAD	10	1.325	0.6174	1.088	0.8465	0.3497	-17.89
α_2 -macroglobulin	AMD	40	147.76	42.17	62.62	31.9	<0.001	-57.62
	PAD	10	123.4	41.987	90.4	49.327	0.2095	-26.74
Fibrinogen	AMD	38	3.121	0.6303	0.9813	0.311	<0.001	-68.58
	PAD	10	4.711	1.9233	1.992	0.8284	0.0005	-57.74
Total cholesterol	AMD	38	4.2834	1.139	1.6416	0.4075	<0.01	-61.68
	PAD	10	3.76	1.28	1.92	0.78	0.0052	-48.93
LDL cholesterol	AMD	38	2.4016	0.9458	0.6093	0.2784	<0.001	-75.00
	PAD	10	2.165	0.9769	0.892	0.4006	0.0017	-58.79
HDL cholesterol	AMD	38	1.3729	0.2933	0.8037	0.18	<0.001	-41.60
	PAD	10	1.004	0.233	0.763	0.5371	0.1716	-24.00
Apo B	AMD	38	0.7347	0.222	0.175	0.082	<0.001	-76.02
	PAD	10	0.683	0.2418	0.296	0.1597	0.0025	-56.22
Lp(a)	AMD	38	0.1634	0.1948	0.0605	0.0918	<0.001	-63.19
	PAD	10	0.358	0.4236	0.151	0.1753	0.0336	-57.82
Blood viscosity	AMD	37	6.4386	1.0194	5.5286	0.8776	<0.001	-14.13
	PAD	10	5.69	1.12	5.49	0.61	0.5789	-3.51
Plasma viscosity	AMD	37	2.1081	0.4518	1.8367	0.3814	0.001	-12.85
	PAD	10	2.11	0.53	1.66	0.37	0.0179	-21.32

Legend: PAD – peripheral arterial ischemic disease; AMD – age related macula degeneration; HDL – high density lipoprotein; LDL – low density lipoprotein; ApoB – apolipoprotein B; Lp(a) – lipoprotein (a). Statistically significant changes are pointed out.

Table 2

Survey of drusen occurrence in the patients from the followed set and in the controls			
Set of patients	Worse or same finding	Improvement of about 25% or more	Number of eyes in total
Control group	25	0	25
Followed set	18	11	29
Total	43	11	54

Test statistic	Value	Df.	Prob.
Fisher's exact test (two-tail)			0.00

Legend: In patients from the followed set, a decrease in the finding of the soft drusen occurred in 11 cases, but in the control set in none of the cases.

Patients with AMD were followed up to 15.5.2008 for a total of 17.6 ± 10.8 months (5–35), median 12. In 16 patients with dry AMD, a reduction of more than 25% in the size of drusen occurred in 11 eyes in 9 patients (see Table 2). In 5 out of 7 eyes with retina pigment epithelial detachment, significant reduction occurred, which did not happen in any of the controls. BCVA improved in patients: in 6 eyes about 1 line of ETDRS optotypes, about 2 lines in 3 eyes, about more than 3 lines in one eye. Only once did vision worsening of about 1 line appear, and likewise only once did vision worsening appear of about 3 lines within one year of completing treatment (in 14 eyes the vision remained the same). On the contrary, in controls the drusen increased in 6 eyes (absorption was observed only in one drusen, but was replaced by RPE atrophy; in the place of the original drusen window an RPE defect originated on the fluoroangiogram). In 2 eyes retina pigment epithelial detachment developed, and in 11 eyes vision worsening occurred (5× about 1 line, 4× about 2 lines and 2× about 3 lines). When we evaluate visual acuity in the whole group against controls, a statistically significant difference is present in benefit of patients treated with rheopheresis ($p = 0.05$). For percentages in patients and controls, see Fig. 1.

We followed up on 7 patients for more than one year (up to 35 months) after treatment and no progression of the findings in terms of worsening on the fundus oculi (fluorescent angiography) occurred; in the controls 1× significant progression to wet AMD appeared: central neovascularisation developed (CNV). The development of CNV and loss of visual acuity are associated with lower choroidal circulatory parameters at baseline. In addition, some authors suggest that decreases in the foveolar choroidal circulation precede the development of CNV in AMD and may play some role in its development [22]. Changes in the flow through chorioidea compared with the findings of Soudavar et al. [32] were not found in our set.

In the patients with PAD a series of 10 rheophereses was efficient. In 4 cases, positive effects from treatment appeared, i.e. total healing (2×) or faster ulceration healing and impediment of the necessity of amputation. In both patients where macroangiopathy prevailed, complete or nearly complete healing of the defect and an increase in transcutaneous oxygen pressure occurred. In two patients with microangiopathy, $TcpO_2$ also increased but did not show significant values. In the fifth patient, rheopheresis did not have any effect, disease progression inevitably continued and ended with amputation in the crus.

Rheologically important parameters were influenced positively in sudden hearing loss. The LDL-cholesterol, atherogenity index, fibrinogen and whole blood viscosity dropped significantly in all patients. The results of the treatment in patient No. 1 are shown in Fig. 2 (the results before the therapy and after the first, second and third procedure). Concerning the patients with sudden hearing loss, improvement in hearing of about 6.3 dB according to the WHO, i.e. 5% according to Fowler, was achieved in only

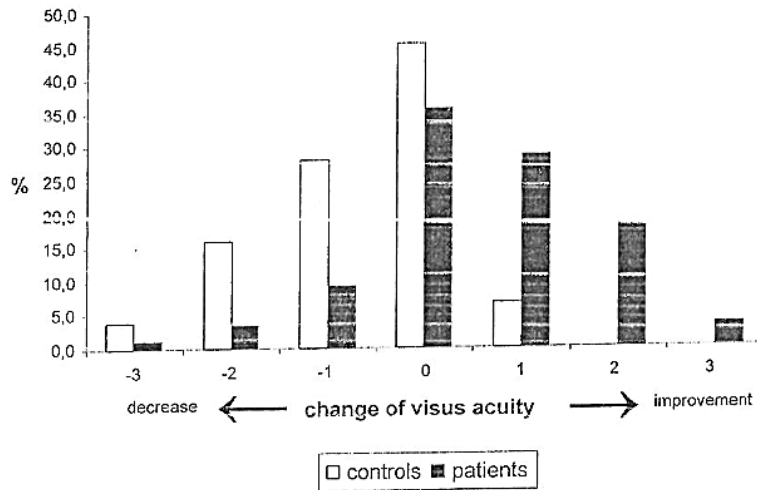
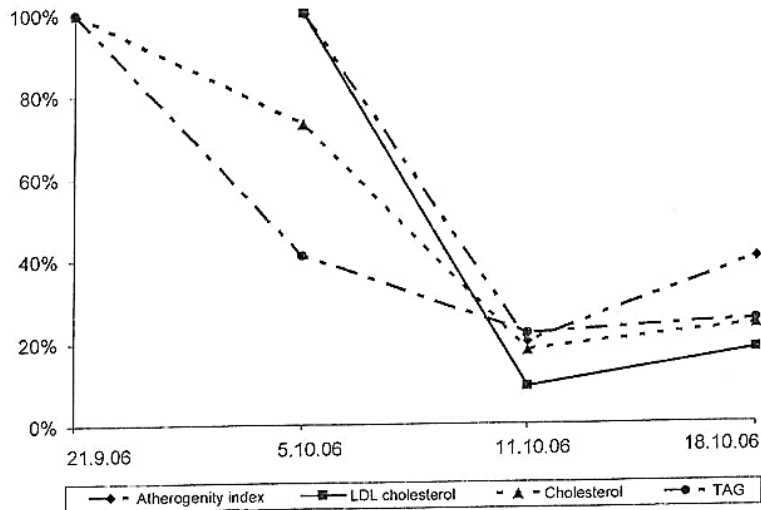


Fig. 1. Changes of visual acuity in patients and controls. Axis y: percentage of patients or controls; axis x: changes of visual acuity in the patients after rheopheresis treatment and in the controls; middle value 0 is used for the initial vision value. At the left as negative values, mean vision worsening is marked of about 1 up to 3 lines, while at the right mean vision improvement in the patients and the controls is shown. Visual acuity was measured by EDTRS charts.

Laboratory outcome - patient No. 1



	Before therapy	After procedures		
		1	2	3
AI (%)	—	100	20	40
LDL (%)	—	100	9	18
Cholesterol (%)	100	73	18	24
TAG (%)	100	41	22	25

Fig. 2. Laboratory results after hemorheophereses. LDL = LDL cholesterol level; TAG = triacylglycerols; AI = atherogenity index.

one patient. The most important fact for this patient was that tinnitus disappeared (it was 500 Hz/55 dB before treatment). In the second patient, though an important decrease of lipoproteins values and rheological parameters was reached, hearing improvement was only about 1.2% according to Fowler, and tinnitus, which was found at the beginning of treatment, did not disappear. In the third patient, the hearing of only her healthy right ear normalized to the values before treatment. Chronic tinnitus, however remained uninfluenced.

5. Discussion

Haemorheotherapy is clinically successful in several indications where serious disorders in the area of microcirculation play an important role [26,36]; in other circumstances/situations where there are as of yet no cogent studies, positive results could be expected in the future. Some results of pathophysiological experimental works or published anecdotic cases testify to it.

Concerning ophthalmology, studies on treatment of effusion syndrome, uveitis, diabetes maculopathy with oedema, central vein thrombosis (inclusive prestasis syndrome) and age-related macular degeneration [6,7,9,13,15,16] have been carried out. In the case of AMD, the experience till now is exceptionally interesting. Positive results were observed by the following studies: MAC-I at the University of Cologne, Germany; Utah-trial at the University of Salt Lake City, USA; MAC-II at the University of Frankfurt; MAC-III at the University of Hamburg and additional centres in Germany – for more details, see [6,15,16]. Our opinion is affirmative. Considerable confusion has been aroused by preliminary results from the Mira 1 studies; it is an extensive sham-controlled, randomized, multicenter trial in the US. Encouraging preliminary results were later challenged and a clear positive effect was not proved [28,29]. However, 37% of the treated cases did not meet inclusion criteria. The study will certainly be more specific in the future. The situation in this area is very complicated and includes several considerations, since improvement in visual acuity after treatment is usually considered a decisive factor. We suppose that in evaluating the treatment results, it is not suitable to evaluate them by only one decisive criterion, namely visual improvement. In a number of cases, the changes to the retina are irreversible, and in these cases the conclusions of Donaldson and Pulido (2006) are valid [8]: “The holy grail of therapy for age-related macular degeneration is to avoid the development of choroidal neovascularization”. Prevention of AMD progression is a quite sufficient effect, as it prevents practical blindness. Moreover, even if we start rheopheresis treatment in time (in agreement with the opinions held up till now), visual acuity could be still normal or only slightly worse, thus making evaluation difficult. The decisive matter here is also whether the treatment prevents progression of the disease to the stage where vision is considerably worsened. Nonetheless, we observed in our 16 patients with dry AMD significant improvement ($p = 0.05$) against controls upon evaluation.

Even further clinical evaluation sounds numerically better in favour of the investigated set: drusen reduction, reduction of retina pigment epithelial detachment, and prevention of progression into CNV. The number of cases is small for a reliable statistical evaluation. In spite of this, we attempted an evaluation: Fisher’s exact test for the small sets of data was used to evaluate drusen findings. The test result is statistically significant (for improvement in the followed set – see Table 2).

We carried out one preventive hemorheopheresis after one year of following up of the patients. We used as a basis for this procedure the experience of a centre in Germany (Deutsche Hemapheresis Zentrum, Köln/Rhein) [5], where it was found that the character of disease demands further careful observation and possibly further procedures according to the patient’s condition.

Haemorheotherapy may improve blood flow through small vessels by reducing both plasma and blood viscosities as well as erythrocyte and thrombocyte aggregability [4,19,20,23,26]. Impaired flow in blood vessels beneath the retina (in the chorioid) is thought to contribute to the development of dry macular degeneration. We did not find improvement in blood flow through the choroidea after rheopheresis, unlike other authors [22,32].

At present, concerning AMD, it is possible to make only partial conclusions. Hemorheopheresis therapy in AMD has travelled a bumpy road. The first study was carried out at the University of Utah in the USA. European studies have previously stated the positive effect of hemorheopheresis on dry AMD, and our study supports this conclusion. The Mira-1 study, though it had very encouraging initial results, did not have further compelling effects. On February 3, 2006, OccuLogix announced that a preliminary analysis of MIRA-1's "intent to treat the population" had indicated that the study did not demonstrate a statistically significant difference in the mean change of Best Spectacle-Corrected Visual Acuity (when applying the Early Treatment Diabetic Retinopathy Scale, the "ETDRS BCVA") between the treated and placebo groups at 12-months post-baseline. As expected, the treated group demonstrated a positive response. There was, however, an anomalous outcome for the control group. The study was probably flawed, (partially) scientifically and by the choice of controls. A complementary study was planned and in spite of the fact that it was approved by the FDA, it was unfortunately interrupted at the end of 2007, most probably due to financial reasons. Further development will bring definitive results [1,25,29]. Our study proved positive results of rheopheresis treatment in AMD concerning improvement in rheopheretic indicators as given above and in the same way as in clinical results.

Concerning patients with trophic defects of the foot, we had 5 such patients in our study (classification III–IV according to Fontain). A series of 10 rheophereses led to quicker healing or total healing 4×, in the 5th patient the treatment was not successful (it did not prevent amputation). Our results are in accordance with the results of other authors [14,17,18]. Improvement in all patients, as noted by Ferrarinni et al. [9], we did not observe.

Little is known about the pathogenesis of SSHL (sudden sensorineural hearing loss), but disturbances in microcirculation, immunopathological processes, and viral infections of inner structures are the most frequently discussed causes [11]. SSHL is a relatively frequent disorder (1/3000–5000), with an increasing incidence in western countries [34]. There is general consent that SSHL is a symptom rather than a distinct disease with different causes. Increased plasma viscosity and decreased erythrocyte filterability is thought to be a cause of SSHL [33]. Blood supply to the inner ear is provided by the labyrinthine artery and the spiralis modioli artery, which supply the cochlea and the vestibular organ. Therefore, that 30% of patients also have vestibular symptoms lends support to the hypothesis that SSHL has a vascular pathogenesis. Two of our patients had vestibular symptomatology. SSHL is usually treated with plasma expanders such as hydroxyethyl starch or dextrane, although it was not shown that this therapy is more effective than saline infusions in treating this disease. Steroids are a popular treatment for SSHL in many countries, even though the mechanism of action of these drugs is not clearly understood [21,27,33]. Corticosteroids could be effective because of their antiinflammatory and immunosuppressive effects. Different methods of hemorheopheresis can be employed for the management of SSHL. Plasma exchange with 5% albumin substitution is the simplest technique for the removal of LDL-cholesterol, fibrinogen and other rheologically relevant plasma proteins. Also, an LDL-apheretic procedure could be effective (with decreased LDL-cholesterol and fibrinogen [31]). Hemorheopheresis allows for the removal of different macromolecules (α_2 -macroglobulin, IgM, fibrinogen, LDL-cholesterol, LDL-triglycerides, vWf, circulating immune complexes, thrombomodulin) [35]. Decreasing the level of these substances makes it possible to influence favourably the microcirculation flow and, consequently, to improve hearing [10,35].

This is exactly what happened in two of our three patients and, in addition, in one of them the subjective unpleasant tinnitus disappeared.

What is interesting, and till now still contentious, is the opinion on the plasma volume necessary to wash during one rheopheretic procedure. It could have an impact on the clinical effect of the treatment. Some authors prove a statistically significant dependence, the volume of washed plasma increasing the amount of removed proteins, e.g. rheopheretically significant α_2 -macroglobulin [6]. A number of authors recommend as a sufficient amount of washed plasma 1 body volume, as the highest absolute effect is reached at the beginning of the procedure and decreases later. After washing one body volume, the elimination is low. In spite of this, we arrived at the same opinion as Ferrannini et al. [9] and during the first procedure we washed (to be cautious) usually one body volume, but later always one and a half. The output does not last so long as to trouble the patient significantly. Side effects of the output are not clinically significant and the benefit of even a small decrease in pathogenetic factors is a boon. Even from an economic point of view this procedure is profitable.

Ferrannini et al. [9] did not note any side effects. In our set of 324 rheophereses carried out in the last 3 years, the rate of side effects was found to be about 7.1%. The most frequent were vasovagal incidences (sickness, light and short term decrease in blood pressure 6 times). Brief interruption of the procedure with horizontal or Trendelenburg positioning was enough to eliminate these incidences. No other serious side effects were observed which required medical attention other than calcium administration during mild citrate toxicity.

In summary, we can confirm positive effects of rheopheresis even in diseases which are not curable with standard means.

Acknowledgement

The work was supported by the grant of Internal Grant Agency, Ministry of Health, CZ, NR/9103-4.

References

- [1] A. Afenyi-Anan, M.E. Brecher and N. Bandarenko, Update on multi-center clinical trials in the United States, *Transf. Sci.* 36 (2007), 5–12.
- [2] M. Bláha, Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia, *Acta Medica (Hradec Králové)* 46 (2003), 3–7.
- [3] M. Bláha, M. Cermanová, V. Bláha, M. Blažek, J. Malý, O. Široký, D. Solichová, S. Flip and V. Řeháček, Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia, *Ther. Apher. Dial.* 11 (2007), 9–15.
- [4] M. Blažek, M. Bláha, M. Pecka, V. Bláha, V. Mašín and J. Malý, Primary hemostasis in patients treated with LDL-apheresis for severe familial hypercholesterolemia: a prospective pilot trial usual PFA-100 analysis to rationalize therapeutic LDL-apheresis procedure, *Hematologica* 12 (2007), 371–376.
- [5] H. Borberg, 25 Jahre LDL-Apherese Erfahrungen und Übersicht, in: *Seminar "25 Jahre der LDL-Apherese"*, Köln, 30 April, 2007.
- [6] H. Borberg and M. Tauchert, Rheohaemapheresis of ophthalmological diseases and diseases of the microcirculation, *Transf. Sci.* 34 (2006), 41–49.
- [7] R. Brunner, R.A. Ridder, R.A. Fischer, P. Walter, K.U. Bartz-Schmidt and K. Heimann, Clinical efficacy of haemorheological treatment using plasma exchange, selective adsorption and membrane differential filtration in maculopathy, retinal vein occlusion and uveal effusion syndrome, *Transf. Sci.* 17 (1996), 493–498.
- [8] M.J. Donaldson and J.S. Pulido, Treatment of nonexudative (dry) age-related macular degeneration, *Curr. Opin. Ophthalmol.* 17 (2006), 267–274.
- [9] M. Ferrannini, G. Vischini, E. Staffolani, F. Scaccia, N. Miani, M.C. Parravano, M.M. Louis, G. Splendiani and N. Di Daniele, Rheopheresis in vascular diseases, *Int. J. Artif. Organs* 30 (2007), 923–929.

- [10] R.P. Finger and A.O. Gostian, Apheresis for idiopathic sudden hearing loss: reviewing the evidence, *J. Clin. Apher.* **21** (2006), 241–245.
- [11] J. Harris and P. Sharp, Inner ear antibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing disorders, *Laryngoscope* **100** (1990), 516–524.
- [12] F. Jung, G. Pindur and H. Kiesewetter, Plasma viscosity dependence on proteins and lipoproteins: Results of the Aachen-study, *Clin. Hemorheol.* **12** (1992), 557–571.
- [13] R. Klingel, Rheopheresis for dry AMD: controversy requiring mutual respect, *J. Clin. Apher.* **20** (2005), 169–170.
- [14] R. Klingel, B. Erdtracht, V. Gauss, A. Piazzolo, P. Mausfeld-Lafdbiya and C. Diehm, Rheopheresis in patients with critical limb ischemia – results of an open label prospective pilot trial, *Ther. Apher. Dial.* **9** (2005), 473–481.
- [15] R. Klingel, C. Fassbender, T. Fassbender, B. Erdtracht and J. Berrouschot, Rheopheresis: Rheologic, functional, and structural aspects, *Ther. Apher.* **4** (2000), 348–357.
- [16] R. Klingel, C. Fassbender, T. Fassbender and B. Göhlen, Clinical studies to implement rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine, *Transf. Apher. Sci.* **29** (2003), 71–84.
- [17] R. Klingel, Ch. Mumme, T. Fassbender, F. Himmelsbach, U. Altes and J. Lotz, Rheopheresis in patients with ischemic diabetic foot syndrome: results of an open label prospective pilot trial, *Ther. Apher. Dial.* **7** (2003), 444–455.
- [18] S. Kobayashi, H. Moriya, K. Maesato, K. Okamoto and T. Ohtake, LDL-apheresis improves arterial occlusive disease with an implication for anti-inflammatory effects, *J. Clin. Apher.* **20** (2005), 239–243.
- [19] K. Matschke and F. Jung, Regulation of the myocardial microcirculation, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **39** (2008), 265–279.
- [20] K. Matschke, C. Mrowietz, R. Sternitzky, F. Jung and J.-W. Park, Effect of LDL apheresis on oxygen tension in skeletal muscle in patients with cardiac allograft vasculopathy and severe lipid disorder, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 263–271.
- [21] D. Megighian, M. Savastano, L. Salvador, A. Frigo and M. Bolzan, Audiometric and epidemiological analysis of elderly in the Veneto region, *Gerontology* **46** (2000), 199–204.
- [22] T.I. Metelitsina, J.E. Grunwald, J.C. DuPont, G.S. Ying, A.J. Brucker and J.L. Dunaief, Foveolar chorioidial circulation and chorioidial neovascularization in age-related macular degeneration, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49** (2008), 358–363.
- [23] K. Michalska-Malecka, L. Slovinska, M. Vrecka and W. Romanin, Correlations in some pathogenic factors and values of hemorheological parameters in age related macular degeneration, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **38** (2008), 209–216.
- [24] L. Norgren, W.R. Hyatt, J.A. Dormandy, M.R. Nehler, K.A. Harris, F.G. Fowkes, R.B. Rutherford and TASC II Working Group, Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease, *Int. Angiol.* **26** (2007), 81–157.
- [25] OccuLogics Reports Positive Mira-1 Analysis Results, <http://www.mdsupport.org/library/theotri3.html>, last accessed October 2, 2006.
- [26] J.-W. Park, C. Mrowietz, S. Schüler, C. Labarrere and F. Jung, Cutaneous microcirculation in cardiac allograft recipients with severe hypercholesterolemia before, during, and after the first HELP apheresis, *Appl. Cardiopulm. Pathophys.* **9** (2000), 19–25.
- [27] H. Propher and W. Ramlow, Sudden hearing loss and HELP apheresis – a single center experience, *Inter. J. Artif. Org.* **30** (2007), 689.
- [28] J.S. Pulido and Multicenter Investigation of Rheopheresis for AMD (MIRA-1) Study Group: Multicenter prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled study of rhopheresis to treat nonexudative age-related macular degeneration: interim analysis, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **1** (2002), 85–107.
- [29] J.S. Pulido, J.L. Winters and D. Boyer, Preliminary analysis of the final multicenter investigation of rheopheresis for age related macular degeneration (AMD) trial (MIRA-1) results, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **104** (2006), 1–231.
- [30] M.-W. Ramping, The great divide: from viscometer to vasculature, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **39** (2008), 9–20.
- [31] A. Ramunni, N. Quaranta, M.T. Salianni, R.A. Fallacara, R. Ria and G. Ranili, Does the reduction of adhesion molecules by LDL-apheresis have a role in the treatment of sudden hearing loss?, *Ther. Apher. Dial.* **10** (2006), 282–286.
- [32] F. Soudavar, R.A. Widder, R. Brunner, P. Walter, K.U. Bartz-Schmitz and H. Borberg, Changes of retinal haemodynamics after elimination of high molecular weight proteins and lipids in patients with age-related macular degeneration, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39** (1998), 386.
- [33] M. Suckfüll, Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial, *Lancet* **360** (2002), 1811–1817.
- [34] H. Ullrich, T. Kleinjung, T. Steffens, P. Jacob, G. Schmitz and J. Strutz, Improved treatment of sudden hearing loss by specific fibrinogen apheresis, *J. Clin. Apher.* **19** (2004), 71–78.
- [35] M. Valbonesi, F. Mora, R. Mora and P. Carlier, Rheopheresis for sudden hearing loss (SHL), *Inter. J. Artif. Org.* **27** (2004), 806–809.
- [36] S. Wolf, K. Schulte, O. Arend, M.-W. Glöckner, S. Handt, F. Jung and M. Reim, Correlation between retinal microcirculation, plasma viscosity and visual function in patients with macroglobulinemia, *Clin. Hemorheol.* **12** (1992), 725–731.