

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

VELMI RYCHLÁ ELEKTROFORETICKÁ STANOVENÍ
KLINICKY VÝZNAMNÝCH LÁTEK V TĚLNÍCH
TEKUTINÁCH
HIGH-FAST ELECTROPHORETIC DETERMINATIONS OF
CLINICALLY IMPORTANT COMPOUNDS IN BODY
FLUIDS

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Klára Málková

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumných záměrů MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Ing. Petra Tůmy, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 3. května 2010.

.....
Klára Málková

Předmětová hesla: analytická chemie, separace, kapilární elektroforéza

Klíčová slova: bezkontaktní vodivostní detekce, glycerol, mannitol, mikrodialýza

Abstrakt

Pro přímé stanovení polyalkoholů glycerolu a mannitolu v biologických a farmakologických vzorcích byla vyvinuta metoda kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí. V optimalizovaném základním elektrolytu o složení 60 mM H₃BO₃ + 30 mM LiOH (pH 9,1) dochází k úplnému oddělení glycerolu i mannitolu od zóny elektroneutrálních látek v krátkém čase (3,0 min pro glycerol a 3,9 min pro mannitol). Limit detekce stanovení je 0,5 μmol.l⁻¹ pro glycerol a 0,3 μmol.l⁻¹ pro mannitol. Opakovatelnost stanovení je 0,5 % pro migrační čas a 3,6 % pro plochu píku. Tato metoda byla použita pro monitorování koncentrace volného glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně. Fyziologická studie prokázala, že lipolýzu lze během sportovního výkonu stimulovat lokální aplikací adrenalinu. Vypracovaná metoda byla dále aplikována pro stanovení mannitolu ve farmakologickém preparátu.

Abstract

A capillary electrophoretic procedure employing contactless conductivity detection (C⁴D) has been developed for direct determination of the glycerol and mannitol polyalcohols in biological and pharmacological samples. Both glycerol and mannitol are fully separated from the sample matrix within very short times of 3.0 and 3.9 min, respectively, when using the optimized background electrolyte, 60 mM H₃BO₃ + 30 mM LiOH (pH 9.1). The limits of detection amount to 0.5 μM for glycerol and 0.3 μM for mannitol. The repeatability of the glycerol determination in real biological materials is characterized by the coefficient of variation values, 0.5 % and 3.6 %, for the migration time and the peak area, respectively. The procedure has been used to monitor the free glycerol concentration in adipose tissue microdialyzates. A physiological study has demonstrated that the lipolysis occurring during a sporting action can be stimulated by local application of adrenaline. The procedure has further been utilized to determine mannitol in a pharmacological preparation.

OBSAH

| | |
|---|----|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 8 |
| ÚVOD | 9 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1.1 Kapilární elektromigrační metody | 11 |
| 1.1.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE) | 11 |
| 1.2 Detekce | 14 |
| 1.2.1 Detekční techniky v CE | 14 |
| 1.2.2 Bezkontaktní vodivostní detekce | 16 |
| 1.3 Obezita | 19 |
| 1.4 Mikrodialýza | 19 |
| 1.4.1 Využití mikrodialýzy při sledování metabolismu tukové tkáně | 20 |
| 1.5 Stanovení glycerolu a mannitolu | 21 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 24 |
| 2.1 Chemikálie | 24 |
| 2.2 Přístroje a postupy | 24 |
| 2.3 Odběr mikrodialyzátu tukové tkáně | 25 |
| 2.4 Úprava vzorků pro CE stanovení | 25 |
| 2.5 Kolorimetrické stanovení glycerolu | 26 |
| 2.6 Zpracování a vyhodnocení výsledků | 26 |
| 3 VÝSLEDKY A DISKUZE | 27 |
| 3.1 Optimalizace metody | 27 |
| 3.1.1 Složení separačního pufu | 27 |
| 3.1.2 Vliv pH | 32 |
| 3.1.3 Vliv acetonitrilu na zaostření zóny glycerolu | 35 |
| 3.1.3.1 Přídavek acetonitrilu ke vzorku | 35 |
| 3.1.3.2 Dávkování zóny acetonitrilu | 37 |
| 3.2 Kalibrační závislosti, limity detekce a opakovatelnost stanovení | 39 |
| 3.3 CE-C4D stanovení glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně a mannitolu ve farmakologickém preparátu | 41 |
| 3.4 Fyziologická studie | 43 |
| 4 ZÁVĚR | 45 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|------------------|---|
| C ⁴ D | bezkontaktní vodivostní detekce |
| CE | kapilární elektroforéza |
| CGE | kapilární gelová elektroforéza |
| CIEF | kapilární izoelektrické fokusování |
| CITP | kapilární izotachoforéza |
| CL | chemiluminiscence |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| DAD | diod array detektor |
| EC | elektrochromatografie v naplněných kapilárách |
| ECL | elektrochemiluminiscence |
| EOF | elektroosmotický tok |
| ESI | elektrosprej |
| FIA | průtoková injekční analýza |
| GC | plynová chromatografie |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| ICP | indukčně vázaná plazma |
| ITP | izotachoforéza |
| LIF | laserem indukovaná fluorescence |
| LOD | limit detekce |
| MALDI | ionizace laserem za účasti matrice |
| MEKC | micelární elektrokinetická chromatografie |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NAD | nikotinamidadenin dinukleotid |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| UV-VIS | ultrafialová a viditelná oblast spektra |

ÚVOD

Obezita je nejčastěji se vyskytující metabolické onemocnění. V souvislosti s obezitou vzrůstá riziko rozvoje inzulinové rezistence, výskytu diabetu mellitu 2. typu, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění, některých typů nádorů a dalších chronických onemocnění. Pro nalezení účinné léčby obezity je nutné pochopit mechanismy regulace metabolismu lipidů v tukové tkáni. Mikrodialýza je minimálně invazivní technika umožňující monitorovat lokální lipolýzu během fyziologických studií prováděných *in vivo*. Míru lipolýzy v tukové tkáni lze monitorovat prostřednictvím stanovení volného glycerolu v odebraném mikrodialyzátu.

Glycerol lze stanovit mnoha způsoby. Nejčastěji používané jsou enzymatické metody. Dalšími aplikovanými analytickými metodami jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) či amperometrie. Malý objem vzorku získaný mikrodialýzou, obvykle s nízkými koncentracemi sledovaných biologicky aktivních látek, je limitujícím faktorem pro použití výše uvedených metod. Metodou vhodnou pro spojení s mikrodialýzou je kapilární elektroforéza (CE).

CE stanovení glycerolu i dalších polyalkoholů (mannitol, sorbitol, 3-chloropropan-1,2-diol) byla již provedena v biodieselu, ve farmakologických preparátech či rostlinných extraktech. Využito bylo nepřímé UV a amperometrické detekce. Doposud však nebylo popsáno žádné stanovení glycerolu v klinických vzorcích. V této práci je testována kombinace CE s bezkontaktní vodivostní detekcí (C^4D) pro přímé stanovení volného glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně a mannitolu ve farmakologickém preparátu. C^4D je univerzální detekční technikou, která je vhodná především pro stanovení anorganických i celé řady organických látek. Uplatnění našla i v analýze biochemicky významných látek jako jsou aminokyseliny, peptidy či proteiny.

Tato diplomová práce si klade tyto cíle:

- vyvinout a optimalizovat metodu kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení polyalkoholů glycerolu a mannitolu
- provést kalibraci metody, stanovit limity detekce a ověřit opakovatelnost stanovení
- stanovit koncentraci glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně a mannitolu ve farmakologickém preparátu

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační separační metody jsou založeny na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Vlastní separace se provádí v kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů, zhotovených zpravidla z taveného křemene nebo jiného materiálu. Zásadní výhody těchto metod jsou především malá spotřeba vzorku a činidel potřebných pro separaci, velká účinnost separace, rychlost analýzy a aplikační rozmanitost. K nevýhodám patří nižší reprodukovatelnost a citlivost.¹

Zásadními událostmi pro vývoj kapilárních elektromigračních metod bylo v roce 1967 provedení elektroforetického experimentu v rotující kapiláře s vnitřním průměrem 1 mm S. Hjerténem a v roce 1981 použití křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 μm jako separační kolony v kapilární zónové elektroforéze J. Jorgensonem a K. Lukacsovou. Uvedení prvního komerčního přístroje pro kapilární elektromigrační metody na trh koncem osmdesátých let pak vedlo k jejich dramatickému rozšíření.²

Do kapilárních elektromigračních separačních metod se řadí tyto techniky: kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), elektrochromatografie v naplněných kapilárách (EC), kapilární izoelektrické fokusování (CIEF) a kapilární izotachoforéza (CITP).³

1.1.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší elektromigrační metodou používanou pro separace a stanovení látek, jejichž molekuly mohou nést náboj. Využívá dvou transportních jevů, elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou, na kterou je vloženo poměrně vysoké napětí až několika desítek kV.

Elektroforetickou migrací iontů rozumíme pohyb iontů v elektrickém poli pod vlivem elektrostatického pole o vysoké intenzitě. Konstantní elektroforetická rychlost, kterou se ionty pohybují v homogenním elektrickém poli k elektrodě s opačným nábojem, je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a elektroforetické pohyblivosti daného iontu. Intenzita elektrického pole uvnitř separační kapiláry je podílem napětí

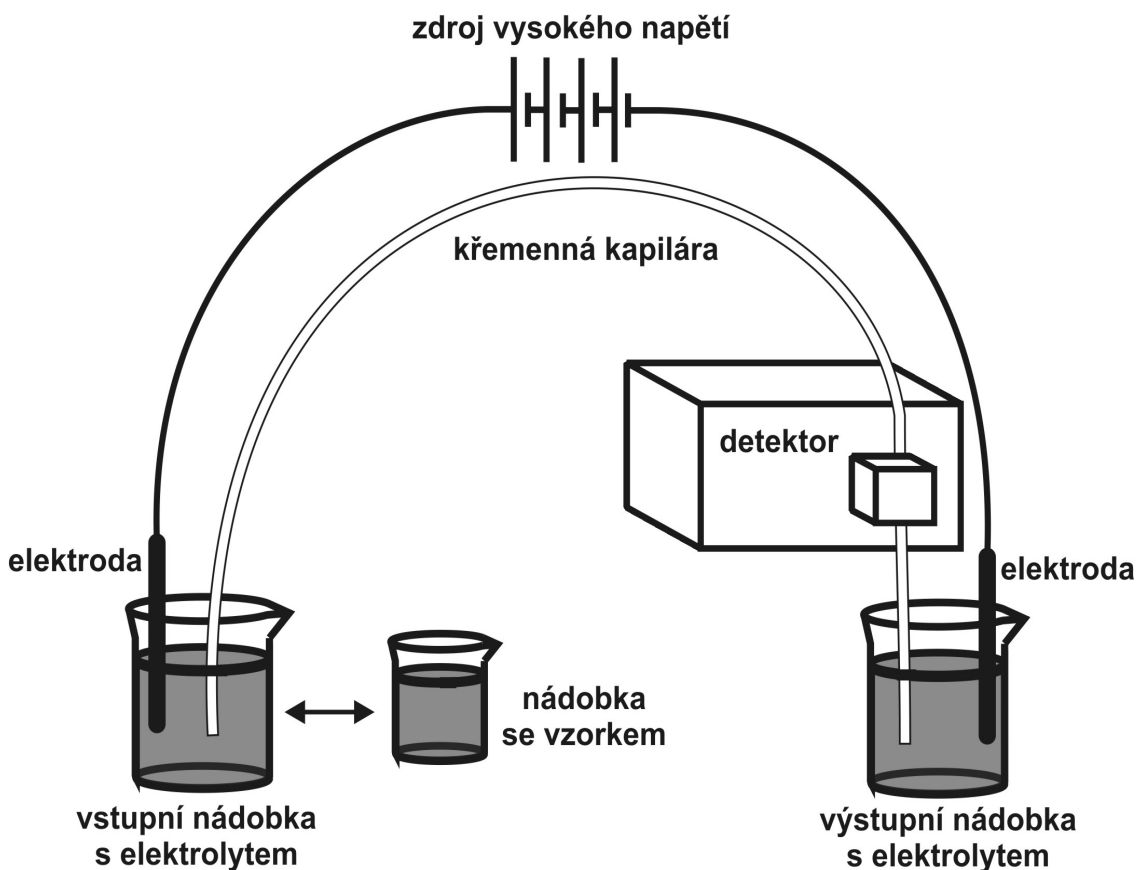
vloženého mezi elektrody a celkové délky kapiláry. Elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná celkovému náboji iontu a nepřímo úměrná jeho poloměru a dynamické viskozitě okolního prostředí.

Pokud se pracuje s velmi malými koncentracemi látek, chování systému se blíží ideálnímu modelu, kde platí Kohlraushův zákon o nezávislé vodivosti iontů. Můžeme tedy předpokládat, že se migrující separované ionty vzájemně neovlivňují. Pohyblivost jednotlivých iontů je pak regulována změnami hodnot náboje a poloměru. Náboj iontů slabých elektrolytů měníme změnou stupně disociace, tedy změnou pH. Náboj iontů silných elektrolytů můžeme regulovat tvorbou komplexů s vhodnými ligandy. Tímto způsobem lze rovněž měnit velikost iontů slabých i silných elektrolytů vázaných do komplexu.¹

Elektroosmotický tok (EOF) vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry. Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a současnou disociací ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry, u nejčastěji používané křemenné kapiláry jsou to silanolové skupiny. Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difúzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část vyskytující se v difúzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též *zeta* potenciál. Působením stejnosměrného elektrického pole v podélném směru kapiláry se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale prostřednictvím vnitřního tření v kapalině i veškerý roztok přítomný v kapiláře. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné látky stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, výrazně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy.⁴ Lze jej ovlivnit prostřednictvím elektrického pole, pH a koncentrace separačního elektrolytu, teploty či modifikace povrchu kapiláry.⁵

Významnou předností elektroosmotického toku je poměrně plochý rychlostní profil, jehož příspěvek k celkové disperzi zón analytů při jejich elektromigrační separaci je zanedbatelný.⁴ V kapilární elektroforéze se proto setkáváme s užšími píky, a tedy větší separační účinností. Plochý rychlostní profil elektroosmotického toku je částečně

deformován tepelnými efekty, ke kterým dochází v důsledku průchodu elektrického proudu elektrolytem. Elektrický výkon, který je dán součinem elektrického proudu procházejícího kapilárou a elektrického napětí vloženého na elektrody, se mění na Jouleovo teplo, které je odváděno stěnou kapiláry do okolního prostředí. Aby nedocházelo k přehřívání, je kapilára v komerčních přístrojích chlazena vzduchem proudícím kolem kapiláry nebo cirkulující chladicí kapalinou.¹



Obr. 1 Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu

Uspořádání přístroje pro kapilární elektroforézu je schematicky znázorněno na obrázku 1. Oba konce separační kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných vhodným separačním elektrolytem, kterým je naplněna také kapilára. Nejčastěji používaná separační kapilára z taveného křemene má vnější průměr kolem 370 μm , vnitřní průměr od 25 do 100 μm a délku většinou v rozsahu 30 až 100 cm. Její vnější povrch je pokryt ochrannou vrstvou polyimidu, která zvyšuje pružnost kapiláry a

současně odstraňuje její křehkost. Kruhový průřez separačního prostoru dovoluje relativně účinný odvod Jouleova tepla, což umožňuje použití vysokých intenzit elektrického pole, a tím i dosažení vysokých účinností a rychlostí separace.⁴

Dávkování vzorku do kapiláry lze provádět dvěma odlišnými způsoby. Při elektrokinetickém dávkování se na elektrody vloží dávkovací napětí po dobu několika sekund, během nichž dojde vlivem elektromigrace a elektroosmózy k nasátí malého množství vzorku do vstupního konce kapiláry. Při hydrodynamickém dávkování se nádoba se vzorkem s ponořenou kapilárou a elektrodou pneumaticky uzavře vhodným septem s přívodem stlačeného vzduchu a nad hladinu vzorku se přivede stlačený vzduch o tlaku několika set paskalů po dobu několika sekund. Přetlaku lze také docílit změnou polohy nádoby se vzorkem tak, aby se nacházela o definovanou diferenci výše než výstupní nádoba.¹

V okamžiku kdy je zóna vzorku nadávkována do kapiláry, je konec kapiláry s nadávkovanou zónou vzorku znovu ponořen do elektrodové nádoby a k systému je připojeno separační napětí. Jednotlivé složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a na tomto principu se od sebe oddělují. Zároveň je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem.

Pohyb zón vzorku v kapiláře je sledován pomocí detektoru umístěného před výstupním koncem kapiláry. Získaný záznam časového průběhu odezvy detektoru, tzv. elektroferogram, poskytuje informace kvalitativního i kvantitativního charakteru.⁴

1.2 Detekce

1.2.1 Detekční techniky v CE

V CE se nejčastěji využívá absorpční fotometrická detekce v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Detektor umístěný poblíž výstupního konce separační kapiláry měří absorpenci roztoku uvnitř kapiláry v místě průchodu světelného paprsku o dané vlnové délce.¹ Tento způsob detekce lze použít v CE v přímém modu pro analyty, které obsahují chromofory vykazující dostatečnou absorpci záření. Pokud tyto chromofory nejsou přítomny, je nutno analyt derivatizovat, anebo použít nepřímou detekci, čímž významně vzrůstá rozsah detekovatelných látek, ale zároveň se snižuje citlivost stanovení.⁶ Důvody rozšíření nepřímé detekční techniky jsou univerzálnost,

jednoduchost a komerční dostupnost. Limitujícím faktorem však může být nízká citlivost detekce, která souvisí zejména s délkou optické dráhy omezené vnitřním průměrem separační kapiláry (<100 μm).

Detektor s diodovým polem (DAD) je tvořen polem fotodiod, jejichž počet určuje spektrální rozlišení detektoru. Získaná UV-VIS spektra slouží k předběžné identifikaci píku a k určení jeho čistoty. Detekční limity, citlivost a lineární rozsah detektoru jsou v porovnání s klasickými detektory využívajícími jednu či několik vlnových délek srovnatelné nebo dokonce lepší. Data mohou být k dispozici i v 3D formě (čas, absorbance, vlnová délka).⁷

Fluorescenční detekce je vysoce citlivá detekční technika, zejména pak její varianta s laserem indukovanou fluorescencí (LIF), kde je s výhodou využito charakteristických prostorových vlastností laserového paprsku, jež jej činí kompatibilní s CE. Fluorescenční detektor měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Také fluorescenční detekci lze použít v CE v přímém i nepřímém modu. Výhodou přímé detekce je vysoká citlivost a selektivita. Nevýhodou je nutnost derivatizace analytů, které neobsahují fluorofory ve své struktuře. V případě použití LIF je výrazným omezením nedostupnost cenově přijatelných laditelných laserů.^{8,9}

Chemiluminiscenční detekce (CL) je také vysoce citlivá a lze ji použít v přímém i nepřímém modu. Chemiluminiscenční detektor měří záření emitované elektronově excitovanou látkou, která se tímto způsobem vrací do svého základního stavu. Excitace analytu v tomto případě není důsledkem absorpce elektromagnetického záření, ale chemické reakce. Výhodou je v porovnání s fluorescenční detekcí menší finanční nákladnost. Limitující je naopak nutnost kontroly faktorů ovlivňujících chemiluminiscenci (teplota, pH, iontová síla a složení separačního elektrolytu) a nízká selektivita. Přestože má spojení CE-CL velký potenciál, není rozšířeno, a to hlavně z důvodů komerční nedostupnosti. Výjimkou je případ spojení CE s elektrochemiluminiscenční detekcí.¹⁰ Elektrochemiluminiscenční detekce (ECL) je v CE často využívanou detekční technikou.¹¹

Z elektrochemických metod se pro detekci v CE používá potenciometrie, konduktometrie a amperometrie. Potenciometrická detekce je založena na principu iontově-selektivních elektrod. Jde o citlivou detekční techniku. Nevýhodou je ale krátká

životnost, obtížná manipulace a komerční nedostupnost. Amperometrická detekce je založená na redoxních reakcích probíhajících na elektrodách. Tato detekční technika, použitelná pro elektrochemicky aktivní analyty, je citlivá a selektivní. Nevýhodou je však nutnost údržby elektrod a především komerční nedostupnost. Jedinou komerčně dostupnou elektrochemickou technikou je vodivostní detekce.¹² Vodivostní detekce je založena na měření elektrické vodivosti roztoku mezi dvěma elektrodami. Klasická vodivostní detekce, kde jsou elektrody v kontaktu se separačním elektrolytem, nedosáhla v CE významného uplatnění stejně jako ostatní módy elektrochemické detekce. V posledních letech se však stala hojně využívanou bezkontaktní vodivostní detekce s kapacitní vazbou (capacitively coupled contactless conductivity detection, C⁴D), zkráceně označovaná jako bezkontaktní vodivostní detekce.^{6,13}

Hmotnostní detekce (MS) je univerzální a zároveň vysoce selektivní, citlivá detekční technika. Spojení CE-MS je nejčastěji realizováno pomocí iontového zdroje typu elektrosprej (ESI), méně využívaným zdrojem je indukčně vázaná plazma (ICP), použít pak lze i ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI). Toto spojení nachází uplatnění především v oblasti analýzy látek iontové povahy v komplikovaných matricích, kde se dobře uplatní vysoká účinnost kapilární elektroforézy s možností strukturně selektivní detekce hmotnostním spektrometrem.^{14, 1}

Další možné způsoby detekce jsou založeny na principu nukleární magnetické rezonance (NMR), Ramanovy spektroskopie či refraktometrie. Možné je také využití radioisotopová detekce.⁷

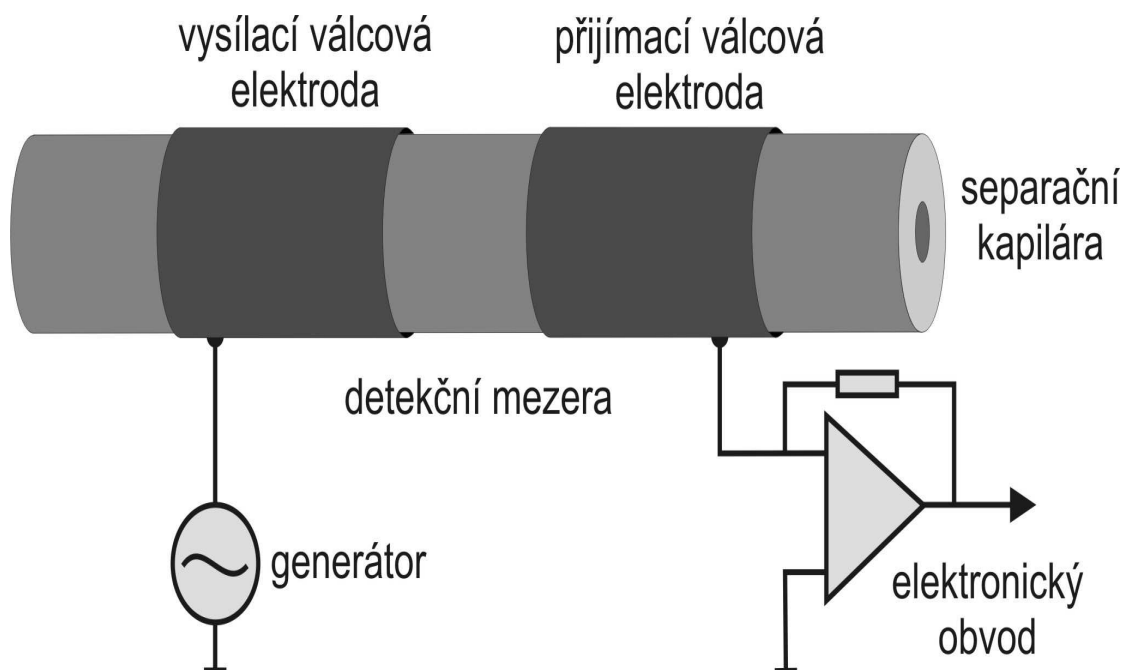
1.2.2 Bezkontaktní vodivostní detekce

Bezkontaktní vodivostní detekce (C⁴D) v CE je univerzální detekční technikou, která umožňuje detekovat nabitě i nenabitě látky, která byla původně vyvinuta pro stanovení malých anorganických iontů. Možná je ale také aplikace pro stanovení organických či biochemicky významných látek.

První zmínky o C⁴D ve spojení s elektroforézou se objevily v osmdesátých letech minulého století, kdy CZE v současné podobě ještě nebyla známa, a používanou elektromigrační technikou byla kapilární izotachoforéza (ITP), pro kterou byl vyvinut detektor tvořený čtyřmi elektrodami radiálně uspořádanými po obvodu separační kapiláry. Tento typ detektoru ale není vhodným pro CE, kde jsou běžně používány tenčí

kapiláry o vnitřním průměru kolem 50 μm .¹⁵

V roce 1998 představili dva autoři nezávisle na sobě novou konstrukci detektoru pro CE s axiálním uspořádáním elektrod, které bylo již dříve využíváno pro průtokovou injekční analýzu (FIA) a iontově výměnnou chromatografii. Skutečnost, že tento detektor pracuje při nižších frekvencích v porovnání se čtyřelektrodovým zapojením pro izotachoforézu, vedla k zjednodušení elektronického zpracování střídavého signálu.



Obr. 2 Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru s tubulárními elektrodami pro kapilární elektroforézu.

Bezkontaktní vodivostní detektor pro CE je tvořen dvěma tubulárními, popř. semitubulárními elektrodami, které jsou umístěny za sebou kolem vnější ochranné polyimidové vrstvy separační kapiláry a jsou od sebe odděleny detekční mezerou, viz. obrázek 2. Na jednu elektrodu je vkládán střídavý signál z generátoru, signál prochází přes stěnu separační kapiláry, je ovlivněn vodivostí zóny v detekční mezeře, a poté snímán druhou vodivostní elektrodou.¹³ V nejjednodušším přiblížení lze detekční celou nahradit sériovým spojením dvou kondenzátorů a rezistoru. Prstencové elektrody s přilehlou vnitřní stěnou křemenné kapiláry představují kondenzátory a roztok uvnitř kapiláry rezistor.

Často zmiňovanými výhodami tohoto uspořádání je izolace elektrochemického detektoru od separačního elektrického pole, což řeší problém interference se signálem detektoru a skutečnost, že měřicí elektrody nejsou v přímém kontaktu se separačním elektrolytem, takže nedochází k rozpuštění materiálu elektrody, látky se neadsorbují na povrch elektrody a neprobíhají děje, které vedou ke stárnutí elektrody. Tyto dva důležité faktory však nemají zásadní význam pro růst oblíbenosti C^4D , čemuž nasvědčuje fakt, že byla klasická vodivostní detekce, kde jsou elektrody v kontaktu se separačním elektrolytem, úspěšně používána. Zásadními limitujícími faktory klasických vodivostních detektorů jsou extrémně malé vnitřní rozměry a potřeba přesného sestavení kapiláry vzhledem k měřicí elektrodě, což vyžaduje precizní zpracování detekčních cel o rozměrech odpovídajících vnitřním průměrům kapilár kolem 50 μm .

Bezkontaktní vodivostní detektor pro CE je naopak jednoduché zkonstruovat. Také v porovnání s optickými detektory je konstrukce detekční cely mnohem jednodušší, není nutné použít speciální kazetu pro kapiláru a také se nemusí odstraňovat ochranná polyimidová vrstva, čímž se stává kapilára v tomto úseku velmi křehkou. Další výhodou je použití kapilár z alternativních materiálů jako je polyether ether keton, které s fotometrickou detekcí nelze využít. Je také možné používat organická rozpouštědla absorbující v UV oblasti spektra. Významným pozitivem tohoto detektoru je dobrá citlivost.

C^4D ve spojení s CE od svého prvního uvedení prodělala vývoj. Bylo realizováno použití planárních nebo semiplanárních elektrod v detekčních celách, které bylo možné připevnit na kapiláru, čímž se zjednodušila manipulace, kapilára se tak nemusela opatrně provlékat skrz elektrody.¹⁶ Dále byla představena duální detekce, která je uskutečňována prostřednictvím kombinované detekční cely, umožňující současně aplikovat C^4D s přímou fotometrickou nebo fluorescenční detekcí.^{17, 18} Velmi důležitým pokrokem byla konstrukce detektoru v mikroměřítku pro kapilární elektroforézu na čipu.¹⁹ Ještě stále jsou užívány detektory, které si laboratoře zhotovily samy. Na trhu jsou však již minimálně dvě komerčně dostupná zařízení, která lze zabudovat do stávajících přístrojů pro CE, což je další výhodou C^4D .

C^4D v CE má také svá negativa, mezi něž patří teplotní nestabilita vedoucí k vzniku šikmé základní linie či citlivost k iontové kontaminaci, která může být způsobena změnami ve složení separačního elektrolytu v důsledku elektrolyzy probíhající na

elektrodách. Je také známo, že při používání pufrů s hodnotou pH kolem 9 a vyšší dochází k absorpci vzdušného CO₂, což ovlivňuje základní linii. Další nevýhodou je, že proces optimalizace složení separačního elektrolytu vede k vzniku tzv. trojúhelníkovitého tvaru píku, a tedy k nižšímu rozlišení.

C⁴D je vhodná především k analýze anorganických iontů, pro které je jinak využívána nepřímá fotometrická detekce dosahující nižších limitů detekce. Stejně výhodné je využití C⁴D pro stanovení řady organických iontů. Výborně se tato detekční technika uplatnila také pro biochemicky významné látky zejména aminokyseliny, ale také peptidy či proteiny. Pomocí CE-C⁴D byly analyzovány i fragmenty DNA.²⁰

1.3 Obezita

Obezita je definována množením tuku v organismu. Jde o nejčastěji se vyskytující metabolické onemocnění.²¹ V souvislosti s obezitou vzrůstá riziko rozvoje inzulínové rezistence, výskytu diabetu mellitu 2. typu, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění, některých typů nádorů a dalších chronických onemocnění. Pro nalezení účinné léčby obezity je nutné pochopit mechanismy regulace metabolismu lipidů v tukové tkáni.

Tuková tkáň je hlavním zdrojem volných mastných kyselin, které se podílejí na etiopatogenezi některých metabolických onemocnění. K uvolňování mastných kyselin a glycerolu dochází v důsledku hydrolytického štěpení zásobních triacylglycerolů, které je katalyzováno lipasami. Nejdůležitějším fyziologickým faktorem stimulujícím lipolýzu je fyzická aktivita. Proces lipolýzy indukovaný fyzickou aktivitou je řízen několika hormony, a to především katecholaminy (adrenalin a noradrenalin), dále pak insulinem, atriovým natriuretickým peptidem (ANP), interleukinem-6 (IL-6) a růstovým hormonem.²²

1.4 Mikrodialýza

Mikrodialýza představuje minimálně invazivní techniku umožňující kontinuální sledování biochemických změn v extracelulárním prostoru tkání a orgánů. Mikrodialýza v principu napodobuje pasivní funkci krevní kapiláry. Do tkáně se implantuje mikrodialyzační sonda tvořená semipermeabilní membránou. Základem je pak perfúze sondy roztokem, který se svým složením blíží extracelulární tekutině. Molekuly mohou přes membránu volně difundovat oběma směry v závislosti na svém koncentračním

gradientu. Získaný dialyzát je analyzován vhodnou vysoce citlivou a selektivní metodou.

Mikrodialýza má mnoho výhod. Důležité je široké klinické uplatnění. Využití této techniky je také velkým přínosem pro experimentální činnost. Mikrodialýza umožňuje kontinuální sledování biochemických změn v tkáních nebo například monitorování metabolismu léčiv. Může být používána nepřetržitě po dlouhý časový úsek u volně se pohybujících subjektů, což vede k redukci počtu subjektů potřebných pro experiment. Při experimentech, kde může být mikrodialyzační sonda zavedena do lidského těla, jsou získávána data s lepší výpovědní hodnotou a navíc se eliminuje využití pokusných zvířat. Další výhodou je, že se lze obejít bez odběru extracelulárních tekutin nebo bioptického vzorku. Dialyzáty neobsahují proteiny, například enzymy, jsou tedy stabilnější a množství látek je možno přímo detekovat.

Mikrodialýza je limitována řadou faktorů ovlivňujících správný sběr a uchování vzorků, což může komplikovat interpretaci analytických výsledků. K ovlivnění výsledků také může dojít v souvislosti s biochemickými změnami, které se objevují při poškození tkáně během implantace sondy, důležitá je také správná lokalizace sondy v tkáni. Další nevýhodou je skutečnost, že jeden experiment může poskytnout až stovky vzorků. Komplikací je také možnost poškození membrány v důsledku ireverzibilních interakcí s analyty.²³

Při výběru vhodné analytické metody si je nutné uvědomit, že mikrodialýza poskytuje velký počet vzorků o malém objemu, často s nízkou koncentrací analytu. Nejčastěji používanými analytickými metodami ve spojení s mikrodialýzou jsou HPLC a CE. Hlavní předností CE je zejména vysoká separační účinnost a dobré rozlišení. Další výhodou v porovnání s HPLC je možnost pracovat i s velmi malými objemy vzorku, řádově s nanolitry. Separace prováděné CE jsou také mnohem rychlejší, což umožňuje zpracovat velké množství vzorků v kratším časovém úseku. Spojení mikrodialýzy s CE je často využíváno pro analýzy klinicky významných molekul jako jsou neurotransmitery, aminokyseliny, proteiny a biomarkery.²⁴

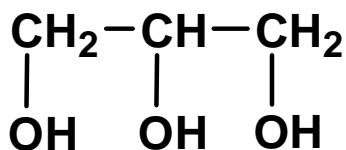
1.4.1 Využití mikrodialýzy při monitorování metabolismu tukové tkáně

Mikrodialýza umožňuje sledovat průběh lipolýzy v malé oblasti tukové tkáně. Sonda tvořená semipermeabilní membránou je zaváděna do podkožní tukové tkáně a následně

promývána fyziologickým roztokem bez nebo s přidavkem léčiva . Obsah glycerolu v získaném mikrodialyzátu odráží míru lipolýzy. ²²

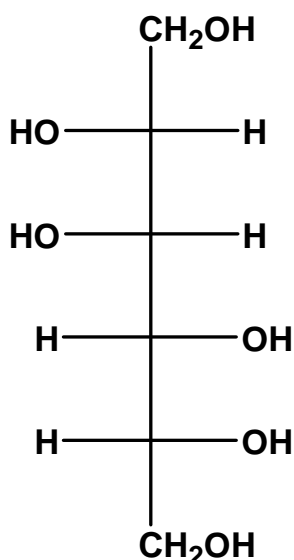
1.5 Stanovení glycerolu a mannitolu

Glycerol, v systematickém názvosloví označovaný jako propan-1,2,3-triol (obr. 3), je viskózní hygroskopická bezbarvá kapalina sladké chuti, dobře rozpustná ve vodě. Je součástí acylglycerolů.²⁵ Acylglyceroly, zejména pak triacylglyceroly, jsou hlavními složkami zásobního tuku.²⁶ Glycerol v organismu vzniká v důsledku hydrolytického štěpení acylglycerolů nebo redukcí dihydroxyacetonfosfátu s následnou defosforylací. Do metabolismu vstupuje po aktivaci fosforylací při níž vzniká glycerol-3-fosfát, který může být dehydrogenací převeden na meziproducty glykolýzy (obvykle dihydroxyacetonfosfát), jež mohou sloužit pro katabolické odbourávání nebo syntézu sacharidů.²⁷ Stanovení glycerolu má význam nejen pro klinické účely, ale důležité je též jeho stanovení ve farmakologických preparátech²⁸, potravinářských výrobcích²⁹ a v biopalivech.³⁰



Obr. 3 Strukturní vzorec glycerolu.

Mannitol, v systematickém názvosloví označovaný jako (2R,3R,4R,5R)-hexan-1,2,3,4,5,6-hexol (obr. 4), je polyalkoholický cukr používaný jako osmotické diuretikum a slabý renální vasodilatátor. V potravinářství je využíván jako sladidlo, zvlhčovač a stabilizátor.³¹



Obr. 4 Strukturní vzorec mannitolu.

Pro stanovení glycerolu jsou nejvíce využívány enzymatické metody, které vykazují největší citlivost a specifitu. V nejčastěji používané metodě je glycerol oxidován za katalýzy NAD-dependentní glyceroldehydrogenázy na dihydroxyaceton, přírůstek současně vznikající redukované formy nikotinamidadeninukleotidu ($\text{NADH} + \text{H}^+$) je monitorován spektrofotometricky při 340 nm či amperometricky.³² Dalšími méně často aplikovanými analytickými metodami pro stanovení glycerolu, mannitolu a dalších polyalkoholů jsou pak vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) či amperometrie.³³ V následující tabulce 1 je uvedeno několik příkladů stanovení glycerolu.

Tabulka 1

| Metoda | Detekce | LOD (μM) | Ref. |
|--------------------------------------|----------------|-----------------------|------|
| Enzymatická - glyceroldehydrogenáza | fotometrická | 0,4 | 34 |
| Enzymatická - glyceroldehydrogenáza | amperometrická | 22 | 35 |
| HPLC - derivatizace benzoylchloridem | fotometrická | 2,5 | 33 |
| GC | Hmotnostní | 3,3 | 36 |

Pro stanovení glycerolu, mannitolu a dalších polyalkoholů lze také využít kapilární elektroforézu. Vzhledem ke skutečnosti, že v molekulách polyalkoholů chybí vhodné chromofory, není využívána přímá spektrofotometrická detekce. Uplatnit se však může nepřímá spektrofotometrická, amperometrická, refraktometrická nebo laserem indukovaná fluorescenční detekce. Příklady elektroforetických stanovení polyalkoholů jsou uvedeny v tabulce 2. Doposud nebylo popsáno žádné elektroforetické stanovení v klinických vzorcích.

Tabulka 2

| Analyt | Vzorek | Detekce | LOD (μM) | Ref. |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------|---------------------------------------|-------------|
| Glycerol ^{a)} | biodiesel | fotometrická | 46,7 | 30 |
| Mannitol | rostlinný extrakt | amperometrická | 1 | 37 |
| Mannitol a sorbitol ^{b)} | infúzní roztok | nepřímá fotometrická | 164,7 | 35 |
| 3-chloropropan-1,2-diol | sojová omáčka | amperometrická | 1,2 | 36 |

a) stanovuje se jodičnan vznikající při reakci glycerolu s jodistanem

b) stanovení založeno na komplexaci polyalkoholů s kyselinou boritou

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie vykazovaly stupeň čistoty p. a.:

mannitol (Sigma-Aldrich)

H₃B₃O₃ (Sigma-Aldrich)

LiOH (Sigma-Aldrich)

glycerol (Fluka)

acetonitril (ACN, Fluka)

NaOH (Fluka)

Pro přípravu pufrů i zásobních roztoků glycerolu a mannitolu (1 mg.ml⁻¹) byla použita deionizovaná voda Milli-Q kvality (Millipore, Bedford, USA). Separční pufr i zásobní roztoky stanovovaných látek byly uchovávány v lednici při teplotě 4°C. pH bylo měřeno laboratorním pH metrem (pMX 3000, WTW, Německo).

Optimalizace složení základního elektrolytu pro elektroforetickou separaci glycerolu od zóny elektroneutrálních látek byla prováděna s modelovým vzorkem 10 mg.l⁻¹ glycerolu v 75% v/v ACN (druhým rozpouštědlem je voda). Vliv pH pufru na separaci byl studován s ekvimolární směsí glycerolu a mannitolu (10 mg.l⁻¹) v 75% v/v ACN. Vliv přídavku ACN ke vzorku na účinnost separačního procesu byl studován s roztokem 10 mg.l⁻¹ glycerolu v 0 až 100 % v/v ACN. Při analýzách modelových i reálných vzorků bylo použito hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 6 s.

2.2 Přístroje a postupy

Všechna elektroforetická měření byla provedena na přístroji HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveném bezkontaktním vodivostním detektorem (C⁴D). C⁴D byl vyvinut a zkonstruován na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a pracuje při frekvenci 1,25 MHz. Detekční cela C⁴D je umístěna v kazetě termostátované na 25°C. Přístroj pro CE i sběr dat je řízen softwarem ChemStation.

Elektroforetické separace byly provedeny v křemenné kapiláře s vnější ochrannou vrstvou polyimidu o vnitřním průměru 50 μm, vnějším průměru 363 μm a celkové délce 40 cm, délka k detektoru byla 27 cm (Composite Metal Services, UK). Před prvním

použitím byla kapilára promývána 0,1 M NaOH po dobu 20 min, poté deionizovanou vodou (20 min) a nakonec separačním pufrem (10 min). Mezi jednotlivými analýzami vzorků mikrodialyzátu byla kapilára postupně promývána 0,1 M NaOH (1 min), deionizovanou vodou (1 min) a pufrem (3 min). Separace byly prováděny při konstantním napětí +10 kV.

2.3 Odběr mikrodialyzátu tukové tkáně

Odběr mikrodialyzátu tukové tkáně byl proveden na Ústavu tělovýchovného lékařství 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy podle postupu popsaného v literatuře.⁴² Pro odběr mikrodialyzátu byly použity dvě komerčně dostupné polyethylensulfonové mikrodialyzační sondy (CMA/20, Microdialysis AB, Švédsko) označované pro účely fyziologické studie jako sonda I a sonda II. Sondy jsou vybaveny membránou s molekulovou propustností 100 kDa. Pacientovi (muž, body mass index 23,2) byly do abdominální tukové tkáně ve vzdálenosti 10 cm od pupku podkožně zavedeny obě mikrodialyzační sondy. Sondy byly promývány za pomoci mikrodialyzační pumpy (Harvard Apparatus, Les Ulis, Francie) průtokovou rychlostí 2,5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

První sondou po celou dobu experimentu protékal Ringerův roztok (složení: chlorid sodný 8,60 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, chlorid draselný 0,30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, chlorid vápenatý dihydrát 0,33 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, pomocné látky hydroxid sodný a voda; Bieffe Medital, Itálie) s přídavkem 2,8 % v/v ethanolu. U druhé sondy byl v době mezi 40. až 100. minutou fyziologické studie navíc k Ringerovu roztoku přidáván adrenalin (Zentiva) o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Testovaný dobrovolník ležel v čase 0 až 100 min v klidu na lůžku a mezi 100. až 160. min šlapal na rotopedu (byla zvolena fyzická zátěž odpovídající 50% maximální tepové frekvence). Vzorky mikrodialyzátu z obou sond byly postupně shromažďovány v 20 min intervalech po celou dobu fyziologické studie. Odebrané vzorky byly dlouhodobě skladovány při teplotě -30 °C až do CE analýzy.

2.4 Úprava vzorků pro CE stanovení

2,5 μl rozmraženého mikrodialyzátu tukové tkáně bylo smícháno s 7,5 μl ACN ve vialce s insertem opatřené víčkem pro dávkování organického rozpouštědla. Vzorek ve vialce byl protřepán 20 s na třepačce a následně analyzován.

Farmakologický preparát Byetta (antidiabetikum s účinnou látkou exenatid, Eli Lilly,

Holandsko) s neznámým obsahem mannitolu byl od zakoupení v lékárně skladován v lednici při 4°C. Pro CE analýzu byl preparát Byetta zředěn vodou a ACN. Celkové zředění je 2000násobné a obsah ACN ve vzorku je 75 % v/v.

2.5 Kolorimetrické stanovení glycerolu

Koncentrace glycerolu v mikrodialyzátu byly současně stanovovány komerčním kolorimetrickým kitem (Radox Laboratories Ltd., United Kingdom). Jedná se o enzymatickou metodu spojenou s měřením absorbance roztoku při 520 nm. Stanovení bylo provedeno s 30 µl mikrodialyzátu.

2.6 Zpracování a vyhodnocení výsledků

Všechny CE analýzy modelových vzorků byly prováděny třikrát a v grafech je uváděna průměrná hodnota ± směrodatná odchylka. K vyhodnocení a statistickému zpracování experimentálních dat byl použit program Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Limit detekce (LOD) stanovený ze závislosti výšek píků na koncentraci analytu se vyjadřuje jako koncentrace látky, která odpovídá trojnásobku šumu základní linie detektoru (hodnota šumu základní linie C⁴D je 1,5 µV).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace metody

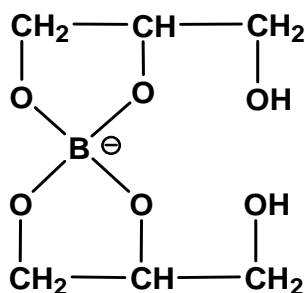
Prvním cílem této práce bylo nalezení optimálních separačních podmínek pro elektroforetické stanovení glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně a mannitolu ve farmakologickém preparátu. Proces optimalizace zahrnuje určení:

- optimálního složení separačního pufru
- optimální hodnoty pH pro separaci glycerolu a mannitolu
- optimálního přídavku acetonitrilu ke vzorku

3.1.1 Složení separačního pufru

K disociaci glycerolu dochází až při vysokých hodnotách pH (pK_A glycerolu je 14,4). Silně alkalické roztoky vykazují značnou elektrickou vodivost. Pokud jimi prochází elektrický proud dochází k uvolňování velkého množství Jouleova tepla, což se projevuje v rozmývání elektroforetických zón analytů a při použití vodivostního detektoru je pozorována též nestabilita základní linie detektoru. Z těchto důvodů mají roztoky s hodnotou pH kolem 14 v CE pouze velmi omezené využití.

Druhou možností stanovení glycerolu technikou CZE je provádět separaci v prostředí kyseliny borité. Kyselina boritá tvoří s glycerolem (obr. 5) a některými dalšími polyalkoholy komplexní sloučeniny, které mají charakter středně silných kyselin.³⁸ Tato skutečnost umožňuje využití separačních roztoků o nižších hodnotách pH (pH ~ 9). Pro CZE stanovení glycerolu byly testovány roztoky H_3BO_3 v koncentračním rozmezí 10 až 150 mmol/l s poloviční koncentrací LiOH.



Obr. 5 Pravděpodobná struktura komplexu glycerolu s kyselinou boritou.³⁹

K oddělování glycerolu od zóny elektroneutrálních látek začíná docházet v 20 mM H_3BO_3 , kdy je hodnota rozlišení glycerolu (R_G) rovna 0,9. Se zvyšující se koncentrací kyseliny borité hodnota rozlišení postupně roste a v 150 mM H_3BO_3 dosahuje hodnoty 10,8 (obr. 6). Hodnoty rozlišení byly vypočteny ze vztahu:

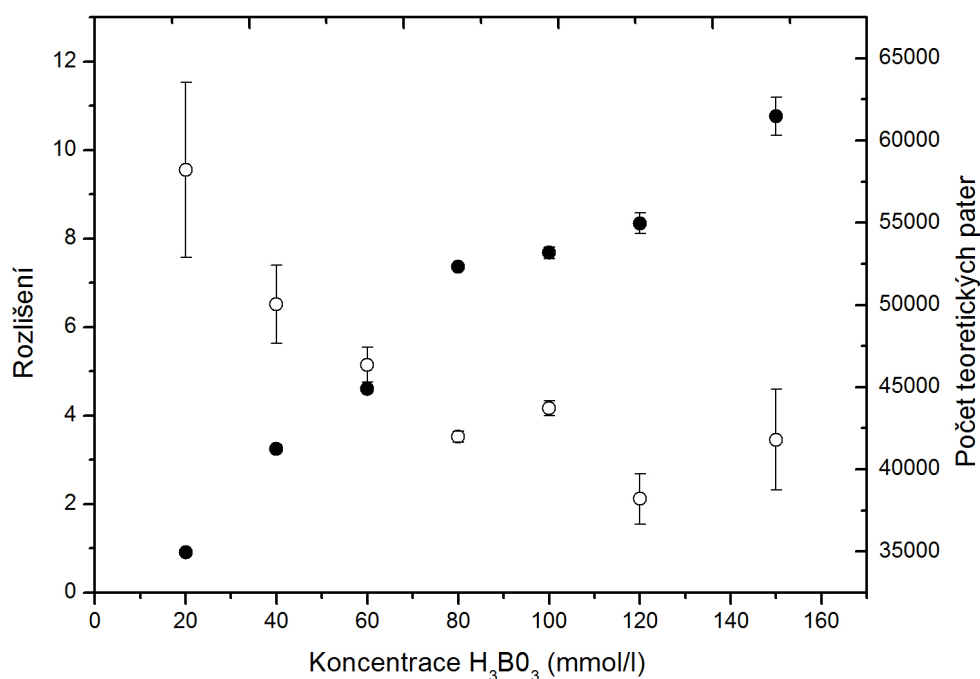
$$R_G = \frac{t_G - t_W}{w_G} \quad (1)$$

kde t_G je migrační čas glycerolu, t_W je čas průchodu konce zóny elektroneutrálních látek detektorem a w_G je šířka píku glycerolu při základně.

Za těchto experimentálních podmínek byl zároveň sledován vliv koncentrace H_3BO_3 na účinnost elektroforetické separace zóny glycerolu. Účinnost separačního procesu charakterizována počtem teoretických pater (N) klesá s rostoucí koncentrací separačního pufru (obr. 6). K poklesu účinnosti separačního procesu dochází v souvislosti s prodlužováním migračních časů glycerolu a rozmýváním zóny glycerolu. Migrační čas se prodlužuje v důsledku zvyšující se iontové síly pufru. Rozšiřování píku glycerolu je způsobené uvolňováním většího množství tepla při vysokých koncentracích pufru. Hodnoty počtu teoretických pater byly vypočteny ze vztahu:

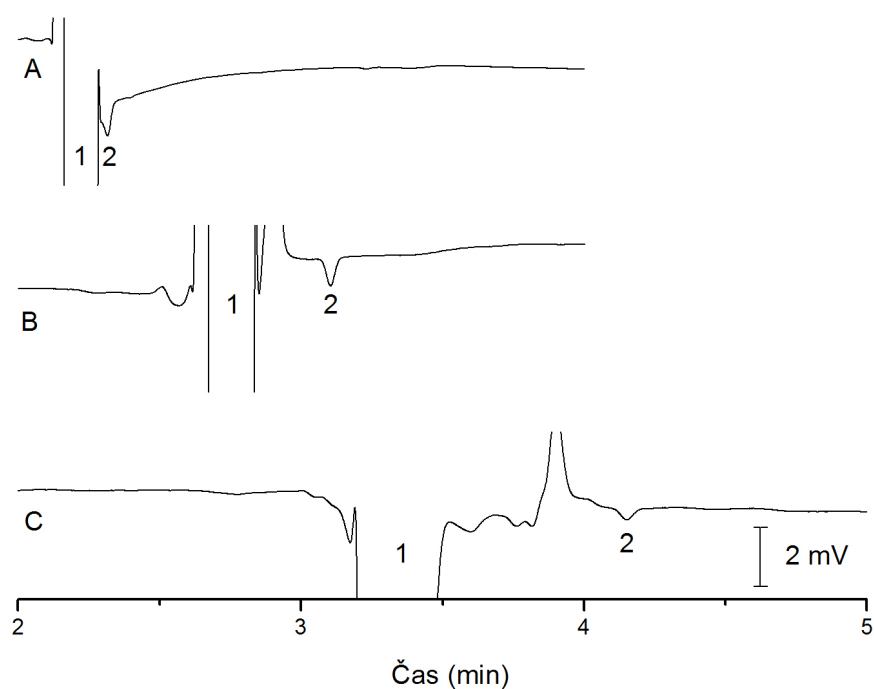
$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_G}{w_{1/2G}} \right)^2 \quad (2)$$

kde $w_{1/2G}$ je šířka píku v polovině výšky.



Obr. 6 Rozlišení pík glycerolu od zóny elektroneutrálních látek (●) a účinnost separačního procesu vyjádřená počtem teoretických pater pro pík glycerolu (○) v závislosti na koncentraci $H_3BO_3/LiOH$. Experimentální podmínky: koncentrace glycerolu 10 mg.l^{-1} v 75 % v/v ACN, hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 6 s, separační napětí +10 kV.

Příslušné elektroferogramy separace glycerolu v roztocích $H_3BO_3/LiOH$ jsou znázorněny na obrázku 7. Záporný pík glycerolu vzniká v důsledku nižší elektroforetické pohyblivosti velkého komplexu glycerolu s H_3BO_3 v porovnání s koiontem separačního elektrolytu, anionem H_3BO_3 . Naopak pro analyty o vyšší elektroforetické pohyblivosti v porovnání s koiontem separačního elektrolytu by vodivostní detektor poskytoval kladnou odezvu.



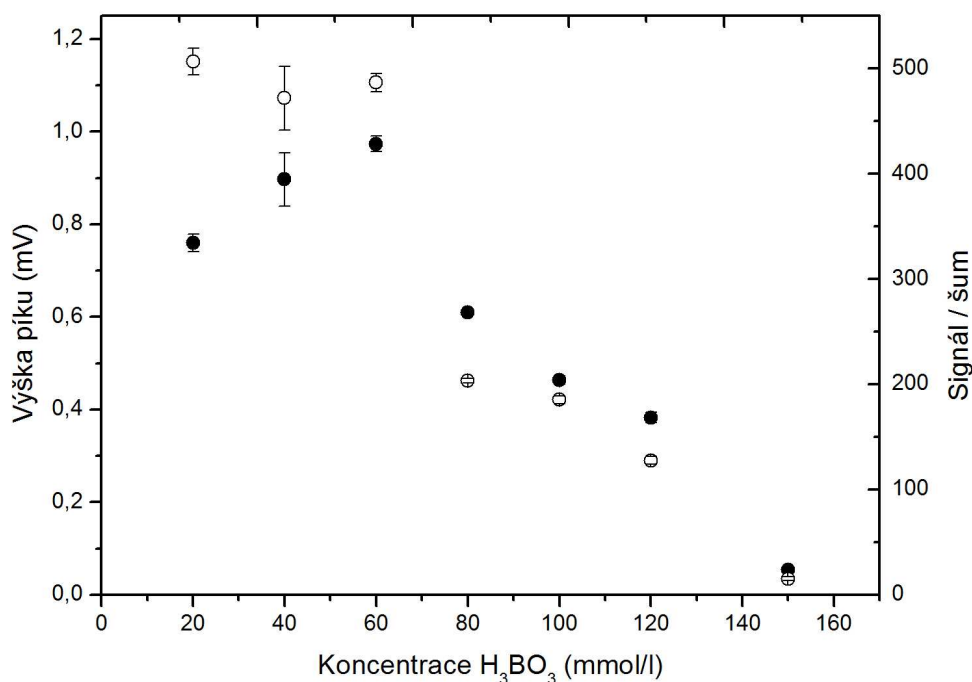
Obr. 7 Elektroferogramy separace glycerolu: A - 20 mM H_3BO_3 /10 mM LiOH, B - 60 mM H_3BO_3 /30 mM LiOH, C - 120 mM H_3BO_3 /60 mM LiOH. Identifikace píkú: 1 – zóna elektroneutrálních látek, 2 – glycerol. Další experimentální podmínky v obr. 6.

Dalším optimalizovaným parametrem je odezva detektoru na konstantní koncentraci glycerolu, 10 mg.l^{-1} v 75 % v/v ACN. Odezva C^4D na glycerol vyjádřená jako výška píku glycerolu je silně závislá na koncentraci separačního pufru (obr. 8). Výška píku glycerolu nejprve roste se zvyšující se koncentrací separačního pufru, při koncentraci 60 mmol/l dosahuje maxima 0,97 mV. Poté postupně klesá až na 0,05 mV pro koncentraci 150 mmol/l. Tento průběh závislosti odezvy detektoru na koncentraci separačního elektrolytu je typický pro vodivostní detekci. Detektor zaznamenává změny mezi vodivostí zóny analytu a vodivostí okolního separačního elektrolytu. Při velmi vysokých hodnotách vodivosti separačního pufru klesá odezva C^4D až k nule. V tomto případě je totiž zaznamenána malá změna vodivosti odpovídající průchodu zóny analytu proti vysoké hladině základní linie detektoru.

Poměr signál detektoru/šum základní linie vyjádřený poměrem výška píku/šum má zásadní význam pro posouzení citlivosti stanovení. Pro nízké koncentrace H_3BO_3 (20 až 60 mmol/l) jsou hodnoty poměru signál/šum vysoké a pohybují se kolem hodnoty 500.

Při koncentraci H_3BO_3 80 mmol/l dochází k prudkému poklesu poměru signál/šum a tento pokles plynule pokračuje až k nejvyšší koncentraci H_3BO_3 150 mmol/l; hodnota signál/šum je v 80 mM H_3BO_3 203 a v 150 mM H_3BO_3 153. Charakter závislosti poměru signál/šum na koncentraci H_3BO_3 se podobá závislosti odezvy C^4D vyjádřené jako výška píku glycerolu na koncentraci H_3BO_3 s tím, že je ještě ovlivněn šumem detektoru. Šum C^4D není v celém testovaném intervalu konstantní, ale postupně vzrůstá s rostoucí koncentrací H_3BO_3 . Hodnota šumu v 20 mM H_3BO_3 je 1,5 μV a v 150 mM H_3BO_3 3,5 μV ; šum detektoru byl vyhodnocován jako průměrná velikost vrcholů kolísání základní linie po dobu 1 min. Vzrůst hodnoty šumu vodivostního detektoru při vysokých koncentracích H_3BO_3 je způsoben tím, že při těchto koncentracích protéká elektronickým obvodem C^4D vyšší proud, který řídí šum detektoru.

Z kritického posouzení všech optimalizovaných parametrů byla jako optimální zvolena 60 mM koncentrace H_3BO_3 , která byla následně používána v dalších experimentech.



Obr. 8 Závislost výšky píku glycerolu (●) a poměru signál/šum C⁴D (○) na koncentraci H₃BO₃/LiOH. Další experimentální podmínky v obr.6.

3.1.2 Vliv pH

Při sledování vlivu pH na oddělení glycerolu a mannitolu od zóny elektroneutrálních látek byly testovány roztoky s konstantní koncentrací H₃BO₃ (60 mmol/l) a proměnnou koncentrací zásadité složky LiOH, které byla měněna v intervalu 10 až 50 mmol/l. Hodnoty pH těchto roztoků se nachází v rozmezí 8,4 až 9,8, přesné hodnoty pH jednotlivých roztoků jsou uvedeny v obrázku 9. Studie vlivu pH byla prováděna s modelovou směsí glycerolu a mannitolu o ekvimolární koncentraci 10 mg/l. Obě látky byly rozpuštěny v prostředí 75 % v/v acetonitrilu, druhým rozpouštědlem je voda.

Z naměřených elektroferogramů (obr. 10) je patrné, že mannitol obdobně jako glycerol vytváří s kyselinou boritou záporně nabitý komplex, který se kolem hodnoty pH 9 dobře odděluje od zóny elektroneutrálních látek. Protože elektroforetická pohyblivost komplexu mannitol/H₃BO₃ je vyšší než elektroforetická pohyblivost komplexu glycerol/H₃BO₃, dochází k oddělení mannitolu od zóny elektroneutrálních látek v celém testovaném intervalu pH a oba polyalkoholy se vzájemně také separují.

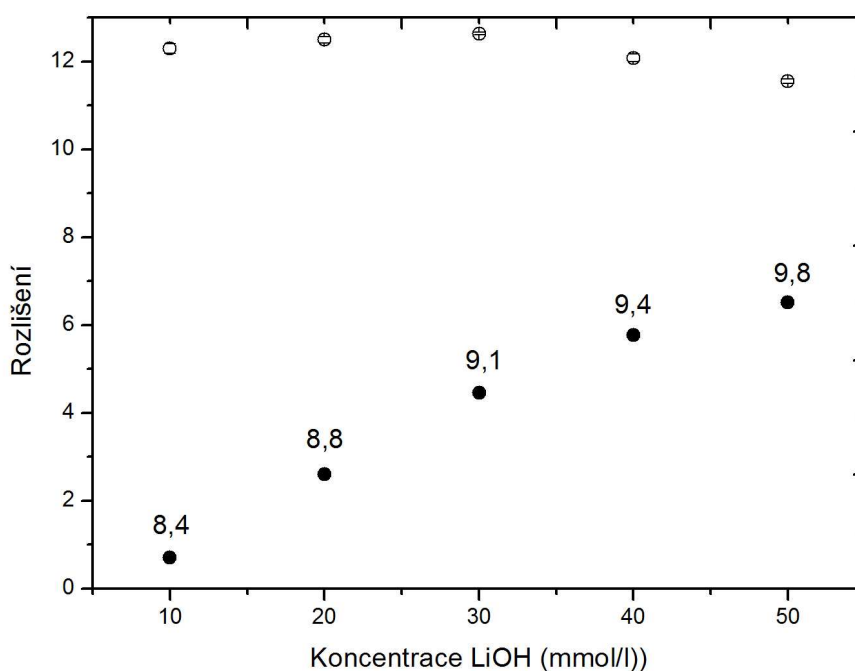
Hodnota pH separačního pufru má zásadní vliv na rozlišení glycerolu (R_G) od zóny elektroneutrálních látek, vypočteno ze vztahu (1). Při pH 8,4 je hodnota R_G 0,7 a při pH 9,8 je R_G 6,5. Na druhé straně vzájemné rozlišení píku glycerolu a mannitolu (R_{GM}) není na pH příliš závislé, s tím že hodnota rozlišení se pohybuje kolem 12 (obr. 9). Rozlišení glycerolu a mannitolu bylo vypočteno podle vztahu:

$$R_{GM} = \frac{t_M - t_G}{0,5 \cdot (w_M + w_G)} \quad (3)$$

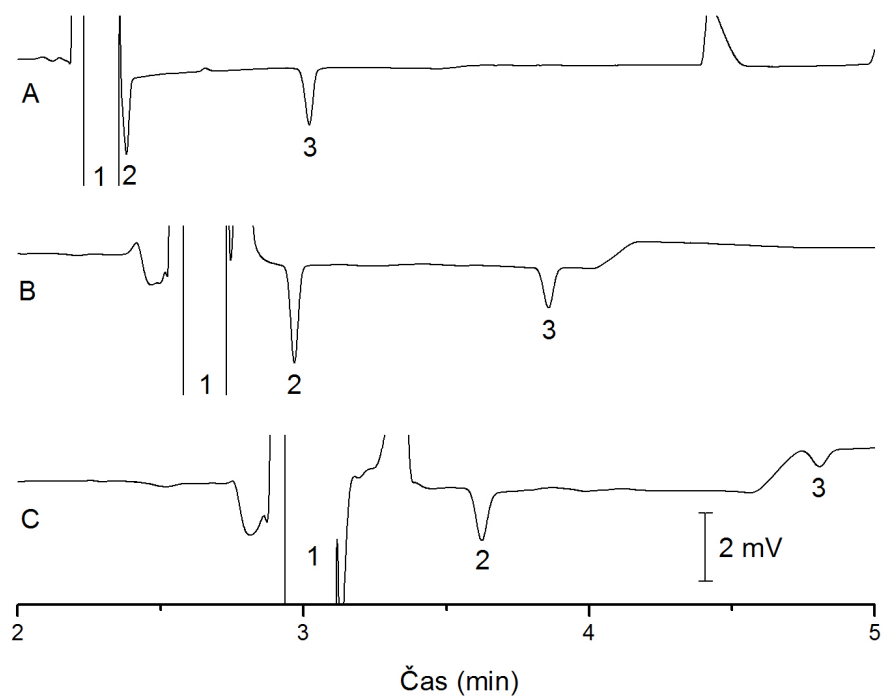
, kde t_M a t_G jsou migrační časy mannitolu a glycerolu a w_M a w_G jsou šířky píků mannitolu a glycerolu při základně.

S rostoucí hodnotou pH se snižuje výška píků obou polyalkoholů, což souvisí se závislostí odezvy C^4D na vodivosti separačního pufru (obr. 11).

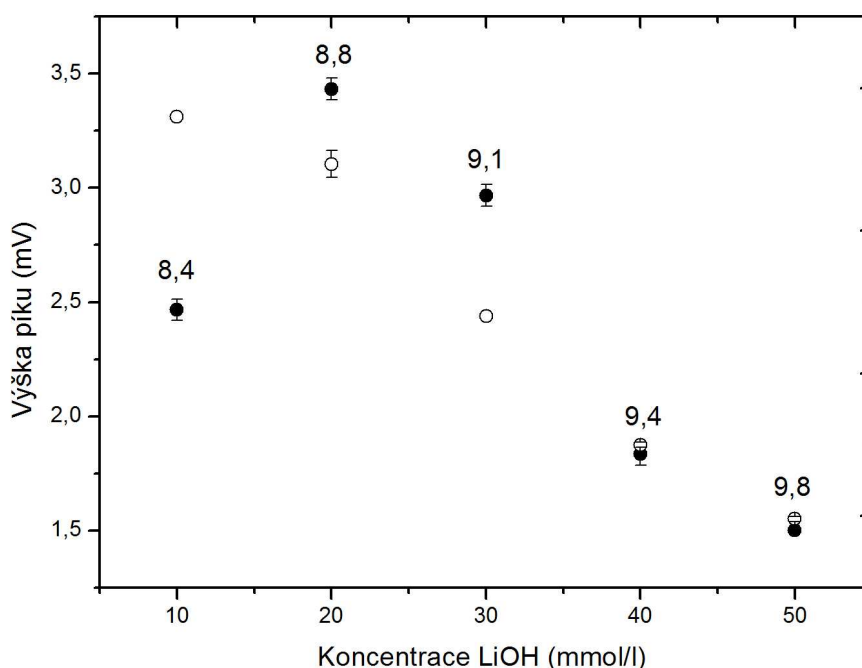
Celkové optimalizované složení separačního pufru, které bylo následně použito pro analýzu reálných vzorků, je 60 mM H_3BO_3 + 30 mM LiOH (pH 9,1).



Obr. 9 Závislost rozlišení glycerolu od zóny elektroneutrálních látek (●) a rozlišení glycerolu od mannitolu (○) na koncentraci LiOH. Hodnota koncentrace H_3BO_3 je konstantní 60 mmol/l. Hodnoty pH jsou uvedeny v grafu. Vzorek: glycerol + mannitol po 10 mg.l^{-1} v 75 % v/v ACN. Další experimentální podmínky v obr. 6.



Obr. 10 Elektroferogramy separace glycerolu a mannitolu: A - 60 mM H_3BO_3 /10 mM LiOH (pH 8,4), B - 60 H_3BO_3 /30 mM LiOH (pH 9,1), C - 60 H_3BO_3 /50 mM LiOH (pH 9,8). Identifikace píkú: 1 - zóna elektroneutrálních látek, 2- glycerol, 3 - mannitol. Další experimentální podmínky v obr. 9.



Obr. 11 Závislost výšky píku glycerolu (●) a mannitolu (○) na koncentraci LiOH. Hodnota koncentrace H_3BO_3 je konstantní 60 mmol/l. Hodnoty pH jsou uvedeny v grafu. Další experimentální podmínky v obr. 9.

3.1.3 Vliv acetonitrilu na zaostření zóny glycerolu

3.1.3.1 Přídavek acetonitrilu ke vzorku

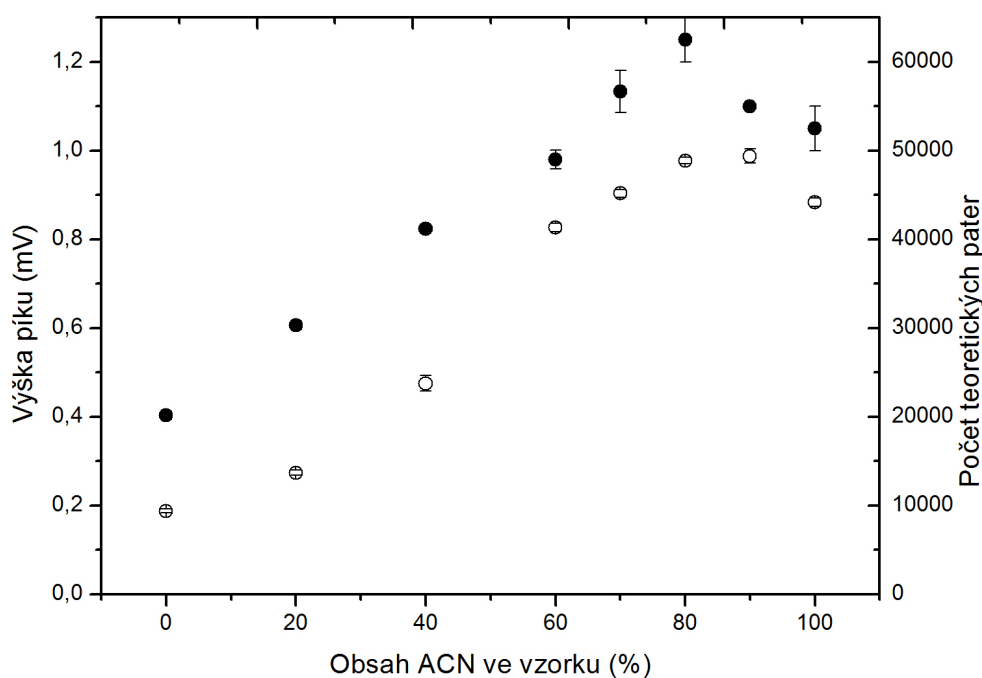
Z literatury je známo, že přídavek organického rozpouštědla (acetonitril, aceton, isopropanol) ke vzorku, zvyšuje účinnost separačního procesu v CZE.^{40,41} Tento efekt byl zaznamenán zejména při CE stanovení aminokyselin.

V této studii byl testován efekt přídavku acetonitrilu na zaostření glycerolu. Experiment byl proveden s modelovým vzorkem glycerolu o koncentraci 10 mg.l^{-1} ve směsném rozpouštědle ACN/ H_2O . Obsah ACN ve vzorku byl měněn v rozsahu 0 až 100 % v/v. S rostoucím obsahem ACN ve vzorku, roste výška píku glycerolu od hodnoty 0,4 mV v 0 % v/v ACN až po 1,2 mV v 80 % v/v ACN. Další zvyšování obsahu ACN pak vede k mírnému poklesu výšky píku glycerolu. Obdobný průběh lze pozorovat i pro závislost účinnosti separačního procesu vyjádřenou jako počet teoretických pater podle vztahu (2) na obsahu ACN ve vzorku, viz. (obr. 12). Hodnota N pro 0 % ACN je 9400 a maximální účinnosti s $N = 49400$ bylo dosaženo při 90 %

obsahu ACN ve vzorku.

Kladný účinek přidavku ACN ke vzorku lze vysvětlit potlačením vodivosti vzorku. Přídavek ACN potlačí elektrickou vodivost zóny vzorku, která je pak menší než vodivost okolního separačního elektrolytu. Po zapnutí separačního napětí je na zóně vzorku vyšší intenzita elektrického pole než na okolním elektrolytu. Záporně nabitý komplex glycerolu migruje uvnitř zóny vzorku rychleji než v okolním separačním elektrolytu. Tímto procesem se původní délka nadávkované zóny glycerolu zaostří po vstupu do separačního elektrolytu. Tento kladný efekt postupně vzrůstá od 0 % obsahu ACN až po 80 - 90 % obsah ACN ve vzorku. Při obsahu ACN ve vzorku vyšším než 80 - 90 % klesne vodivost zóny vzorku natolik, že se projeví nepříznivé zahřátí této zóny vlivem uvolněného Jouleova tepla, což má za následek zvýšené rozmývání píků.

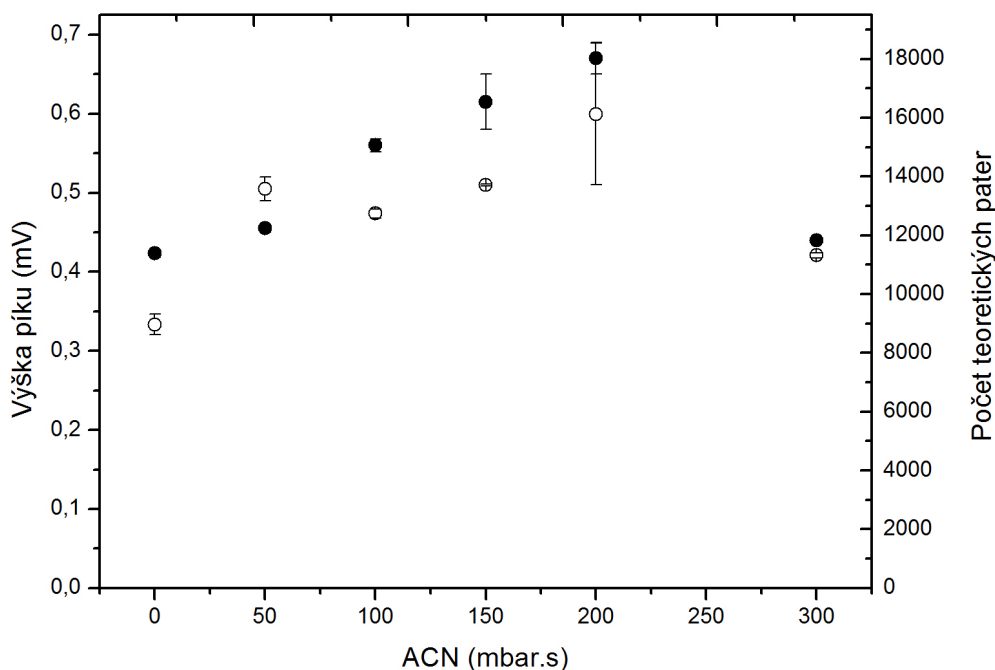
Jako optimální obsah acetonitrilu ve vzorku byl určen 75 % *v/v* přídavek ACN, který byl následně použit v analýzách reálných vzorků.



Obr. 12 Závislost výšky píku glycerolu (●) a počtu teoretických pater (○) pro glycerol na obsahu ACN ve vzorku *v/v*. Pufr: 60 mM H₃BO₃/30 mM LiOH (pH 9,1). Vzorek: 10 mg.l⁻¹ glycerol. Další experimentální podmínky v obr. 6.

3.1.3.2 Dávkování zóny acetonitrilu

V této sérii pokusů nebyl acetonitril přidáván přímo ke vzorku glycerolu, ale nejprve byl do kapiláry nadávkován vodný vzorek glycerolu o koncentraci 10 mg.l^{-1} v množství 300 mbar.s a za ním byla nadávkována zóna čistého acetonitrilu. Množství nadávkovaného ACN bylo testováno v rozmezí 0 až 300 mbar.s. S rostoucím množstvím dávkovaného ACN, roste výška píku glycerolu od 0,42 mV při 0 mbar.s do 0,67 mV při nadávkování tlakem 200 mbar.s. Při dalším zvýšení nadávkovaného množství ACN na 300 mbar.s klesne výška píku glycerolu na 0,44 mV. Obdobný průběh byl pozorován i pro účinnost separačního procesu. Při množství nadávkovaného ACN 0 mbar.s je $N = 9000$, při 200 mbar.s ACN je $N = 16100$ a při 300 mbar.s ACN je $N = 11300$, viz. obr. 13.

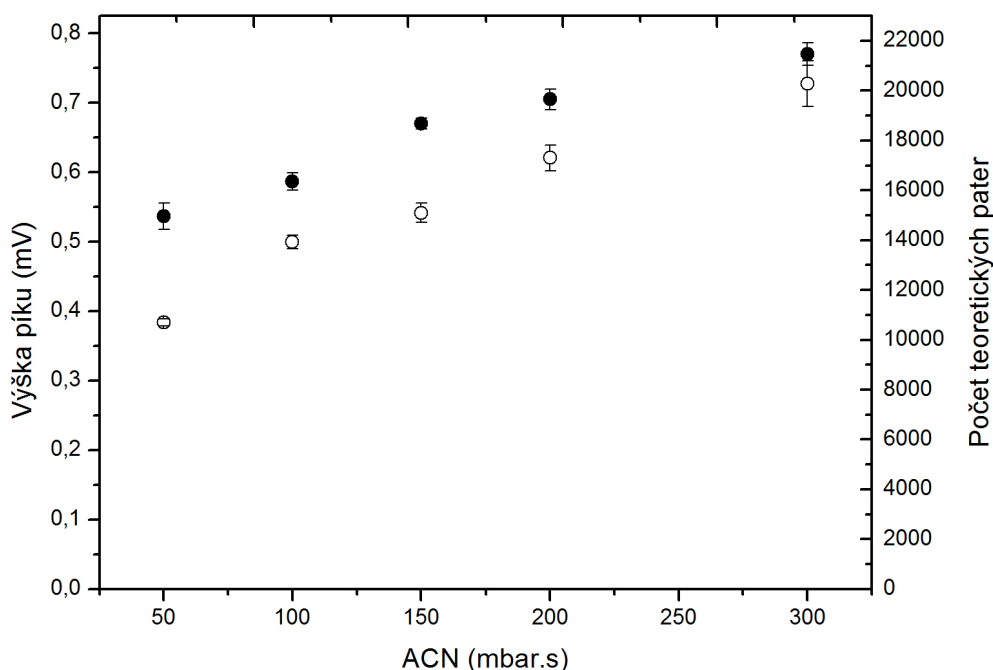


Obr. 13 Závislost výšky píku glycerolu (●) a počtu teoretických pater (○) pro glycerol na délce zóny acetonitrilu. Zóna čistého ACN byla dávkována za zónu vzorku (10 mg.l^{-1} glycerol v H_2O , 300 mbar.s) v množství 0 až 300 mbar.s. Pufr: 60 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/30 \text{ mM}$ LiOH (pH 9,1). Vzorek: 10 mg.l^{-1} glycerol. Další experimentální podmínky v obr. 6.

Dalšího zvýšení kladného efektu acetonitrilu lze získat kombinací dávkování zóny ACN před a za zónu vzorku. Množství nadávkovaného ACN před zónu vzorku (10 mg/l

glycerol, 300 mbar.s) bylo použito 100 mbar.s a délka zóny ACN dávkovaná za vzorek se pohybuje v rozmezí 50 až 300 mbar.s. S rostoucím množstvím ACN nadávkovaného za zónu vzorku roste výška píku glycerolu od hodnoty 0,54 mV pro množství 50 mbar.s do hodnoty 0,77 mV pro množství 300 mbar.s. V celém testovaném intervalu vzrůstá též účinnost separačního procesu, obr. 14.

Kombinací dávkování dvou zón acetonitrilu před a za zónu vzorku lze dosáhnout zaostření vzorku vyjádřené výškou píku glycerolu z původních 0,42 mV (není dávkován ACN) až po 0,77 mV (100 mbar.s ACN dávkováno před vzorek a 300 mbar.s ACN dávkováno za vzorek), což je nárůst o cca 80 %. Tento způsob zaostření vzorku dávkováním zóny organického rozpouštědla před a za zónu vzorku je výhodný z hlediska automatizace analytického procesu, pro který není nutné provádět manuální ředění vzorku biologického materiálu.



Obr. 14 Závislost výšky píku glycerolu (●) a počtu teoretických pater (○) pro glycerol na délce zóny acetonitrilu dávkovaného za zónu vzorku. ACN dávkované před zónu vzorku je konstantní 100 mbar.s a množství ACN dávkované za zónu vzorku je v rozmezí od 50 do 300 mbar.s. Pufr: 60 mM H₃BO₃/30 mM LiOH (pH 9,1). Vzorek: 10 mg.l⁻¹ glycerol, 300 mbar.s. Další experimentální podmínky v obr. 6.

3.2 Kalibrační závislosti, limit detekce a opakovatelnost stanovení

Pro modelovou směs glycerolu a mannitolu byly naměřeny kalibrační závislosti, které byly vypočteny pro plochu a výšku píku v závislosti na koncentraci analytů. Závislost odezvy detektoru na koncentraci dávkovaného analytu lze popsat obecně platnou rovnicí přímky:

$$S = a + b \cdot c \quad (4)$$

kde S je odezva detektoru měřená jako plocha nebo výška píku, a je konstantní člen závislosti (úsek na ose y), b je konstanta úměrnosti mající význam citlivosti stanovení a c je koncentrace analytu. Kalibrace byla provedena s ekvimolární modelovou směsí glycerolu a mannitolu o koncentracích 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25 mg/l, obsah acetonitrilu ve vzorku je 75 % v/v , dávkované množství 300 mbar.s, separační pufr o složení 60 mM $H_3BO_3/30$ mM LiOH (pH 9,1). Každý vzorek byl stanovován 3krát. Zpracování naměřených dat a statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Origin.

Parametry naměřených kalibračních závislostí jsou shrnuty v tab. 3. Získané kalibrační závislosti jsou lineární v celém testovaném rozsahu koncentrací. Hodnoty korelačního koeficientu (R) jsou velmi blízké 1. Vysoký stupeň linearitu pozorovaný pro výšku i plochu píku je důsledkem malého vlivu elektrodisperze na rozmytí píku.

Limit detekce (LOD) odpovídá koncentraci analytu, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. LOD byl vypočten ze vztahu:

$$LOD = 3 \cdot \text{šum}/b \quad (5)$$

kde b je směrnice kalibrační závislosti pro výšku píku a šum detektoru byl vyhodnocován jako průměrná velikost vrcholů kolísání základní linie po dobu 1 min. Získané hodnoty LOD dosahují pro oba analyty submikromolární úrovně, 0,5 $\mu\text{mol/l}$ pro glycerol a 0,3 $\mu\text{mol/l}$ pro mannitol. Nízké hodnoty LOD souvisí především s vysokou citlivostí C^{4D} . Optimalizací elektronického obvodu C^{4D} došlo ke snížení šumu detektoru asi na úroveň 1 μV , což vede k zvýšení citlivosti detekce. S nízkými hodnotami LOD souvisí i použití krátké kapiláry o délce 40 cm, kde je dosahováno krátkých migračních časů, pro glycerol $3,00 \pm 0,00$ min a pro mannitol $3,60 \pm 0,01$ min.

Vyvinutá metoda vykazuje dostatečnou citlivost. Lze ji tedy použít pro přímé stanovení glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně bez nutnosti prekoncentrace biologického materiálu. Parametry kalibračních závislostí pro mikrodialyzát jsou podobné závislostem pro modelový vzorek. Rozdíly mezi naměřenými hodnotami CE-

C⁴D metodou a kontrolní enzymatickou metodou nepřevyšují 5 %.

Tabulka 3

Parametry lineárních regresních závislostí plochy a výšky píku na koncentraci glycerolu a mannitolu. Parametry byly získány z pěti různých koncentrací v koncentračním rozmezí od 0,5 až 50 mg.l⁻¹.

| Parametry | Glycerol | Mannitol |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Plocha píku | | |
| Citlivost [mV.s.mg ⁻¹ .l] | 0,195 (0,001) | 0,217 (0,001) |
| Úsek [mV.s] | 0,064 (0,010) | 0,035 (0,016) |
| <i>R</i> | 0,99989 | 0,99979 |
| Výška píku | | |
| Citlivost [mV.s.mg ⁻¹ .l] | 0,107 (0,001) | 0,090 (0,001) |
| Úsek [mV.s] | 0,018 (0,007) | 0,015 (0,007) |
| <i>R</i> | 0,99983 | 0,99979 |
| LOD [mg.l ⁻¹] | 0,04 | 0,05 |
| LOD [μM] | 0,5 | 0,3 |

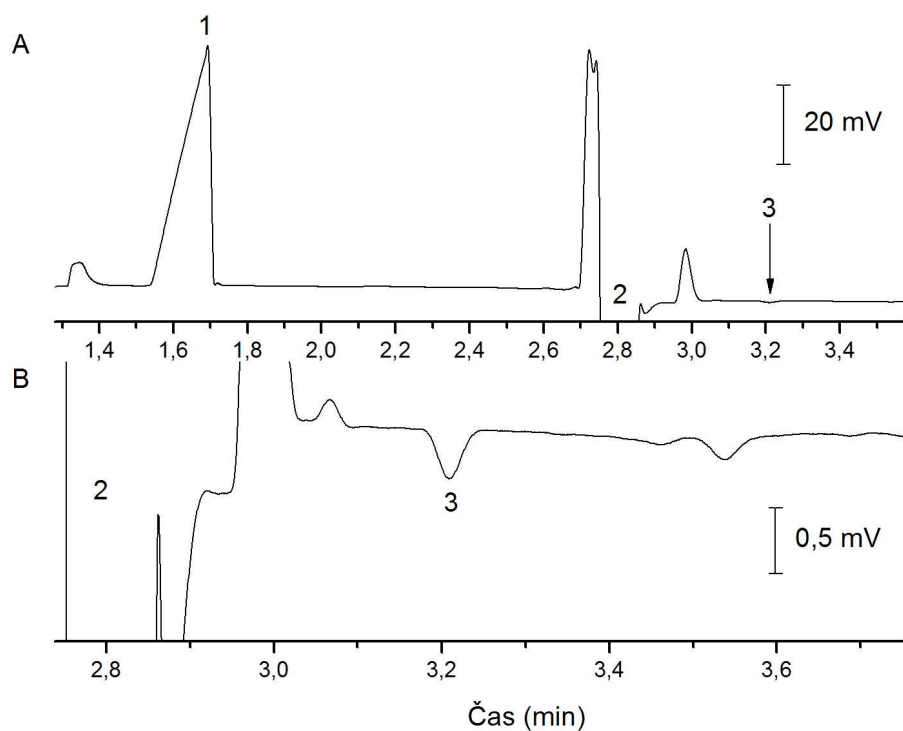
Opakovatelnost metody byla testována na deseti po sobě opakovaných analýzách jednoho vzorku mikrodialyzátu s obsahem glycerolu 17 mg.l⁻¹. Před každým stanovením byl mikrodialyzát opakovaně zpracován. Hodnota koeficientu variace pro migrační čas je 0,5 % a pro plochu píku 3,6 %. Nízká hodnota opakovatelnosti plochy píku svědčí o tom, že lze s dostatečnou přesností pracovat s mikrolitrovým množstvím vzorku.

3.3 CE-C⁴D stanovení glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně a mannitolu ve farmakologickém preparátu

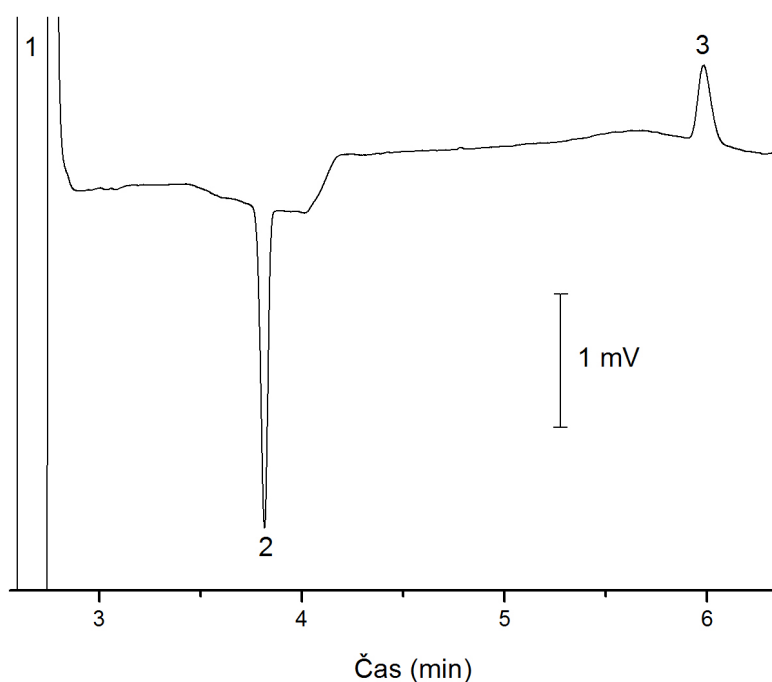
Vyvinutou metodou CE-C⁴D byl analyzován vzorek mikrodialyzátu tukové tkáně. Na elektroferogramu mikrodialyzátu tukové tkáně lze dobře pozorovat negativní pík glycerolu, který je úplně oddělen od zóny elektroneutrálních látek (obr. 15). Protože vodivostní detekce patří mezi neselektivní detekční techniky, lze na elektroferogramu z C⁴D pozorovat i píky ostatních látek přítomných ve vzorku. Vedle glycerolu byl identifikován i velký pík sodných iontů, které pocházejí z Ringerova roztoku.

Druhou analýzou reálného vzorku je stanovení mannitolu ve farmakologickém preparátu Byetta, který se používá pro léčbu diabetes. Na elektroferogramu je patrný negativní pík mannitolu, který je úplně oddělen od zóny elektroneutrálních látek (obr. 16). Dále byl na elektroferogramu identifikován i pozitivní pík aniontu kyseliny octové, která se přidává do farmakologického preparátu pro stabilizaci pH roztoku. Ve farmakologickém preparátu Byetta byl ze tří analýz stanoven obsah mannitolu v množství $(57,4 \pm 2,0) \text{ mg.l}^{-1}$.

Zásadní předností vyvinuté CE-C⁴D metody je skutečnost, že není potřeba provádět složitou úpravu vzorku biologického nebo farmakologického materiálu. Mikrodialyzát a preparát Byetta se pouze ředí přídatkem acetonitrilu ke vzorku (roztok Byetta se ředí ještě vodou) a takto jednoduše upravený roztok se přímo dává do separační kapiláry.



Obr. 15 CE-C⁴D elektroferogram mikrodialyzátu tukové tkáně: A - celý záznam, B – detail zóny glycerolu. Identifikace píků: 1 – Na⁺, 2 – zóna elektroneutrálních látek, 3 – glycerol. Pufr: 60 mM H₃BO₃ / 30 mM LiOH (pH 9,1), hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 6 s, separační napětí +10 kV. Úprava vzorku: 2,5 µl mikrodialyzátu bylo smícháno se 7,5 µl acetonitrilu.



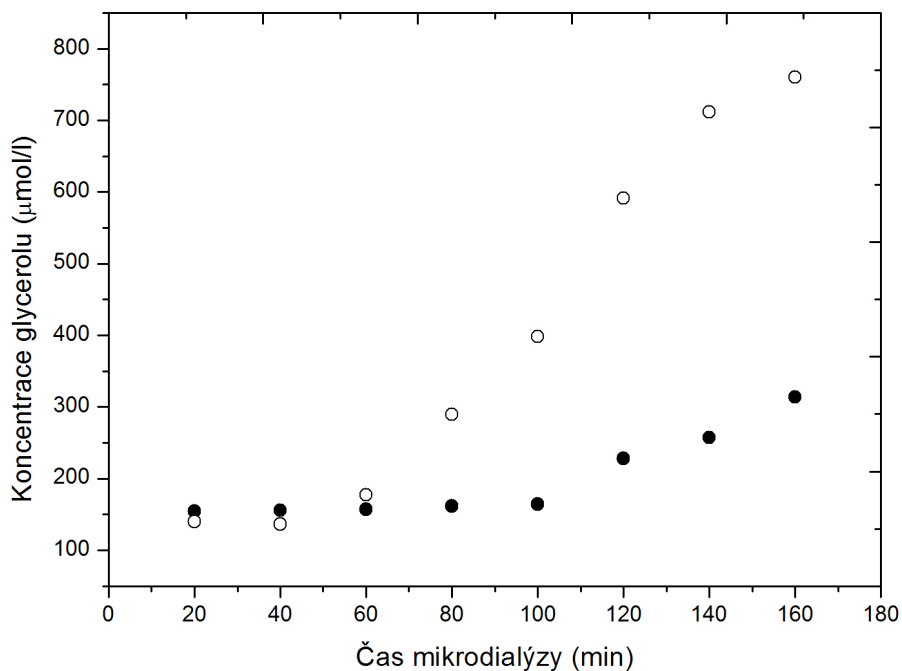
Obr. 16 CE-C⁴D stanovení mannitolu ve farmakologickém preparátu Byetta. Identifikace píků: 1 – zóna elektroneutrálních látek, 2 – mannitol, 3 – acetát. Pufr: 60 mM H₃BO₃ / 30 mM LiOH (pH 9,1), hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 6 s, separační napětí +10 kV. Úprava vzorku: 2,5 µl 2000krát zředěného vzorku bylo smícháno se 7,5 µl acetonitrilu.

3.4 Fyziologická studie

Vyvinutá metoda byla použita pro monitorování lipolýzy, která se projevuje uvolňováním glycerolu do mikrodialyzátu, v průběhu jízdy zdravého dobrovolníka na rotopedu. Na počátku fyziologické studie je testovaný jedinec v klidovém stavu (0. až 100. minuta pokusu). Poté následuje fyzická aktivita ve formě jízdy na rotopedu mezi 100. až 160. minutou. V klidovém stavu se pohybuje koncentrace glycerolu na konstantní hladině cca 150 µmol/l. Od 100. minuty, kdy započne fyzická aktivita, dochází k postupnému nárůstu koncentrace až k hodnotám cca 310 µM (sonda I v obr. 17).

Lipolýza v tukové tkáni byla indukována lokální aplikací adrenalinu. Mezi 40. až 100. minutou experimentu difunduje adrenalin z mikrodialyzační sondy II do okolní

tukové tkáně. Aplikace adrenalinu se projeví zvýšením lipolýzy již od 60. minuty pokusu, kdy je ještě testovaný jedinec v klidu. Při následné jízdě na rotopedu, kdy již není adrenalin podáván, vzestup uvolňování glycerolu dále pokračuje. Kombinace aplikace adrenalinu a fyzické zátěže vede k nárůstu koncentrace glycerolu až k hodnotám cca 760 $\mu\text{mol/l}$ (sonda II v obr. 17), což je pětinasobek bazální hladiny.



Obr. 17 Koncentrace glycerolu v mikrodialyzátu v průběhu fyziologické studie: mikrodialyzační sonda I = jízda na rotopedu (●); mikrodialyzační sonda II = jízda na rotopedu + lokální aplikace adrenalinu (○).

4 ZÁVĚR

Byla vyvinuta CE metoda pro stanovení glycerolu a mannitolu s bezkontaktní vodivostní detekcí (C^4D). V procesu optimalizace elektroforetického stanovení glycerolu a mannitolu bylo určeno optimální složení separačního pufru: 60 mM H_3BO_3 + 30 mM LiOH, pH 9,1. Ze studia vlivu acetonitrilu na zaostření zóny glycerolu vyplynulo, že 75 % v/v přídavek acetonitrilu ke vzorku je optimální a vede k 3násobnému zaostření. Kalibrační závislosti určené z plochy i výšky píku jsou lineární pro oba polyalkoholy s korelačními koeficienty vyššími než 0,999. Vyvinuté stanovení je citlivé s LOD pro glycerol 0,5 $\mu\text{mol/l}$ a pro mannitol 0,3 $\mu\text{mol/l}$. LOD je dostatečně nízký pro přímé monitorování glycerolu v mikrodialyzátu tukové tkáně bez nutnosti prekoncentrace vzorku. Pro stanovení mannitolu ve farmakologickém preparátu byl vzorek 2000krát ředěn.

Jednoduchá úprava vzorku spočívající pouze v ředění biologického a farmakologického materiálu a malé požadavky na jeho množství činí z uvedené metodiky silný nástroj pro klinický výzkum. Z provedené obezitologické studie vyplývá, že fyzická námaha v podobě jízdy na rotopedu, zvyšuje míru lipolýzy v abdominální tukové tkáni. Lipolýzu lze navíc akcelarovat lokální aplikací adrenalinu

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Štulík, K.; Ševčík, J.; Pacáková V.; Jelínek, I.; Coufal, P.; Bosáková, Z.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2005.
2. Oh, E.; Hasan, M. N.; Jamshed, M.; Park, S.H.; Hong, H.M.; Song, E.J.; Yoo, Y. S.: *Electrophoresis* **31**, 74 (2010).
3. Unger, M.: *Planta Med.* **75**, 735 (2009).
4. Kašička, V.: *Chem. Listy* **91**, 320 (1997).
5. Ahmadzadeh, H.; Prescott, M.; Muster, N.; Stoyanov, A.: *Chem. Eng. Comm.* **195**, 129 (2008).
6. Padaruskas, A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 132 (2006).
7. Heiger, D.: High performance capillary electrophoresis. Německo, Agilent Technologies 2000.
8. Swinney, K.; Bornhop, D. J.: *Electrophoresis* **21**, 1239 (2000).
9. Schulze, P.; Belder, D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 515 (2009).
10. García-Campana, A. M.; Lara, F. J.; Gámiz-Gracia, L.; Huertas-Pérez, J. F.: *Trends Anal. Chem.* **28**, 973 (2009).
11. Li, H. J.; Han, S.; Hu, L. Z.; Xu, G. B.: *Chin. J. Anal. Chem.* **37**, 1557 (2009).
12. Kappes, T.; Hauser, P.: *Electroanalysis* **12**, 165 (2000).
13. Tůma, P.; Samcová, E.: *Chem. Listy* **101**, 200 (2007).
14. Timerbaev, A. V.: *Trends Anal. Chem.* **28**, 416 (2009).
15. Gaš, B., Demjaněnko, M., Vacík, J.: *J. Chromatogr.* **192**, 253 (1980).
16. Tůma, P., Opekar, F., Jelínek, I.: *Electroanalysis* **13**, 989 (2001).
17. Chvojka, T., Jelínek, I., Opekar, F., Štulík, K.: *Anal. Chim. Acta* **433**, 13 (2001).
18. Tan, F., Yang, B. C., Guan, Y. F.: *Anal. Sci.* **21**, 583 (2005).
19. Pumera, M.: *Talanta* **74**, 358 (2007).
20. Kubáň, P.; Hauser, P. C.: *Electrophoresis* **30**, 176 (2009).
21. Hainer, V.; Janco, A.; Kunešová, M.; Svačina, Š.: *Obezita*. Praha, Galén 1997.
22. Polak, J.; Bajzova, M.; Stich, V.: *Future Lipidol.* **3**, 557 (2008).
23. Guihen, E.; O'Connor, W.: *Electrophoresis* **30**, 2062 (2009).
24. Guihen, E.; O'Connor, W.: *Electrophoresis* **31**, 55 (2010).
25. Wu, L.; Cheng, Ch. M.: *Anal. Biochem.* **346**, 234 (2005).
26. Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha, Academia 2002.

27. Kodíček, M. *glycerol*. z *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-04-26]. Dostupný z www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=glycerol>
28. Pospíšilová, M.; Polášek, M.; Šafra, J.; Petříška, I.: *J. Chromatogr.* **1143**, 258 (2007).
29. Xing, X.; Cao, Y.: *Food Kontrol* **18**, 167 (2007).
30. Filho, L. C. G.; Micke, G. A.: *J. Chromatogr.* **1154**, 477 (2007).
31. Wikimedia foundation, Wikipedia, The free encyklopedia. *Mannitol*.
32. Lapenaite, I.; Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **36**, 13 (2006).
33. Frieler, R. A.; Mitteness, D. J.; Golovko, M. Y.; Gienger, H. M.; Rosenberg, T. A.: *J. Chromatogr.* **877**, 3667 (2009).
34. Rangel, A. O. S. S.; Toth, I. V.: *Anal. Chim. Acta* **416**, 205 (2000).
35. Alvarez-Gonzalez, M. I.; Saidman, S. B.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P.: *Anal. Chem.* **72**, 520 (2000).
36. Thevis, M.; Guddat, S.; Flenker, U.; Schanzer, W.: *Eur. J. Mass Spectrom.* **14**, 117 (2008).
37. Chen, G.; Zhang, L.; Wu, X.; Ye, J.: *Anal. Chim. Acta* **530**, 15 (2005).
38. Bartoš, M.; Švancara, I.; Šrámková, J.: *Laboratorní cvičení z analytické chemie I*. Pardubice, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra analytické chemie 2004.
39. Renger, F.; Kalous, I.: *Analytická chemie I*. Pardubice, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra analytické chemie 2004.
40. Shihabi, Z. K.: *Electrophoresis* **23**, 1612 (2002).
41. Tůma, P., Soukupová, M., Samcová, E., Štulík, K.: *Electrophoresis* **30**, 3436 (2009).
42. de Glisezinski, I.; Larrouy, D.; Bajzová, M.; Koppo, K.; Polák, J.; Berlan, M.; Bulow, J.; Langin, D.; Marques, M. A.; Crampes, F.; Lafontan, M.; Štich, V.: *J. Physiol.-London* **587**, 3393 (2009).