

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Hnízdilová

VÝVOJ ELEKTROFORETICKÉ METODY STANOVENÍ SÍRANŮ V KREVNÍ PLAZMĚ

Development of electrophoretic method for determination of sulphate in
blood plasma

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 10. 8. 2019

Lucie Hnízdilová

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout metodu pro stanovení síranů v krevní plazmě pomocí kapilární zónové elektroforézy. Byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm a efektivní délce 41,5 cm. Plazmatické proteiny byly sráženy acetonitrilem. Jako optimální základní elektrolyt byla určena 0,4M kyselina mravenčí s 15mM chromanem draselným. Separální napětí bylo 25 kV. Vzorek byl dávkován napětím -5 kV po dobu 40 s. K vyhodnocení byla využita nepřímá UV detekce při 260 nm. Vzhledem ke složité matici je vhodné provést kvantifikaci metodou standardního přídatku. Po vztažení ploch píků na vnitřní standard (500 μM chlorečnanu) byla relativní směrodatná odchylka 5,97 %. Výhodou této metody oproti dříve používaným srážecím metodám je krátká doba analýzy a jednodušší úprava vzorku.

Klíčová slova

kapilární elektroforéza, anorganické ionty, sírany, krevní plazma

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi PhD. za cenné rady a především za jeho velkou trpělivost při vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za všechnu podporu nejen při psaní této práce.

Obsah

Poděkování	4
Použité zkratky a symboly	6
1. Úvod a teoretická část	8
1.1. Cíl práce	8
1.2. Význam síranů v organismu	8
1.3. Stanovení síranů v plazmě	9
1.4. Kapilární elektroforéza	10
1.5. Metody pro stanovení anorganických iontů pomocí kapilární elektroforézy ..	11
1.5.1. Stanovení anorganických iontů v plazmě	12
1.6. Metody pro potlačení elektroosmotického toku	13
1.7. Úprava vzorku.....	144
1.8. Detekce v kapilární elektroforéze	14
1.8.1. Optická detekce.....	14
1.8.2. Vodivostní detekce	15
1.8.3. Hmotnostní detekce	16
2. Experimentální část	17
2.1. Použité chemikálie.....	17
2.2. Použité přístroje.....	17
2.3. Experimentální podmínky	18
2.4. Příprava vzorků a výpočty	18
3. Výsledky a diskuze	20
3.1. Optimalizace základního elektrolytu	20
3.2. Optimalizace dalších podmínek.....	22
3.2.1. Optimalizace vkládaného napětí.....	22
3.2.2. Optimalizace dávkování	24
3.3. Optimalizace úpravy vzorku.....	25
3.4. Kvantifikace.....	26
3.5. Opakovatelnost	27
4. Závěr	28
5. Použitá literatura	29

Použité zkratky a symboly

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CE/CZE	kapilární elektroforéza/kapilární zónová elektroforéza (capillary electrophoresis/capillary zone electrophoresis)
CE-MS	kapilární elektroforéza s hmotnostním spektrometrem
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTAC	cetyltrimethylamonium chlorid
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LIF	fluorescence indukovaná laserem (laser induced fluorescence)
MALDI	desorpce a ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization)
MES	2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina
TCA	trichloroctová kyselina (trichloroacetic acid)
μ_i	elektroforetická mobilita

μ_{EOF}	mobilita elektroosmotického toku
λ	vlnová délka
A	plocha
A_λ	absorbance při vlnové délce λ
c	látková koncentrace
F_f	frikční síla prostředí
F_p	síla elektrického pole
q	náboj iontu
r	hydratovaný poloměr iontu
t_m	migrační čas

1. Úvod a teoretická část

1.1. Cíl práce

Cílem práce je vyvinout dostatečně spolehlivou metodu stanovení síranových aniontů v krevní plazmě, která by splňovala podmínky pro diagnostické testování. Předpoklady, které musí metoda vhodná pro klinickou laboratoř splňovat, jsou snadná a rychlá úprava vzorků a relativně malý objem vzorku potřebného k analýze (jednotky až desítky mikrolitrů). Časově nenáročná by měla být i samotná analýza.

1.2. Význam síranů v organismu

Sírany jsou hlavním konečným produktem metabolismu sirných aminokyselin a jejich plazmatická koncentrace je přímo ovlivněna příjmem těchto aminokyselin v potravě a renálním vylučováním. Anorganický síran hraje velkou roli při detoxikaci organismu (jako sekundární metabolit se účastní konjugační fáze biotransformace) a je důležitý pro střevní mikroflóru (zejména pro bakterie redukující sírany). Sírany jsou jedním z aniontů aniontové mezery, která má za úkol vyrovnávat kladný náboj kationtů v krvi. Anorganické sírany jsou v organismu přeměňovány také na kyselinu chondroitinsírovou, která je zabudována do chrupavek a šlach [1]. Přesto, že se přímo nezapojují do tvorby ledvinových kamenů, výrazně ovlivňují zakoncentrování moči a tím i rozpustnost solí tvořících kameny. Dále slouží jako ukazatel příjmu bílkovin, renální nedostatečnosti a dalších ledvinových onemocnění [2].

Siřičitany jakožto reaktivní meziprodukty metabolismu síry nejsou u zdravých jedinců detekovatelné, ale při snížení aktivity oxidáz může docházet k neurologickým poškozením vlivem zvýšení koncentrace siřičitanových iontů. Mohou také způsobovat alergické reakce na potraviny konzervované siřičitany.

Referenční hodnota koncentrace síry v séru je 156 až 468 mmol/l (hlavně elementární síra, sírany, siřičitany). Odchytky od těchto hodnot mohou být způsobeny vrozenými poruchami metabolismu sirných aminokyselin (homocysteinurie, hypermethionemie, cystationurie, sulfiturie, cystinoza, methioninový malabsorpční syndrom, cystinurie) [3].

1.3. Stanovení síranů v plazmě

Většina metod stanovení síranů je založena na srážení síranů benzidinem, chlorečnanem barnatým, nebo rhodizoatem. Nejčastěji se k měření intenzity vzniklého zákalu využívá klasických turbidimetrických metod, nebo kolorimetrických testovacích proužků. Dále je možné stanovit sírany nepřímo plamenovou spektrometrií. Tyto způsoby jsou však často ovlivněny interferencí složité matrice biologických vzorků. Zejména u spektrometrických metod je nutné nejprve odstranit interferující látky např. reakcí s uranylacetátem, benzidinsulfátem, kyselinou trichloroctovou, směsí NaCl a KCl. Dále je potřeba zohlednit vliv hemolýzy, lipémie a vysoké koncentrace bilirubinu. Proto se u nefelometrie a turbidimetrie používají stabilizátory obsahující želatinu, dextran a glycerol, které odstraňují vliv stálých koloidních suspenzí. Pro chromatografické stanovení síranů jsou interferenty nejčastěji odstraněny vazbou na latex.

Vyšší selektivity simultánní analýzy anorganických aniontů obsažených v plazmě (především Cl^- , SO_4^{2-}) lze dosáhnout iontovou chromatografií, ta je ovšem časově náročná na úpravu vzorků, což je v klinické praxi nevhodné.

Turbidimetrické stanovení

Turbidimetrické stanovení je založeno na tvorbě bílého zákalu BaSO_4 reakcí s barnatými ionty v prostředí NaCl a HCl. Intenzita zákalu úměrná koncentraci síranů je měřena spektrofotometricky.

Při kvantichromsulfátové metodě jsou sírany sráženy v polyethylenglykolu a intenzita zákalu je měřena při 540 až 610 nm. Tato metoda je vhodná pro rozsah koncentrací 0,01 až 1,2 mmol/l [4].

Želatinázová metoda využívá pro měření intenzity zákalu síranu barnatého želatinový roztok. Absorbance je měřena při 500 nm. Dynamický rozsah této metody je 0,05 až 10 mmol/l [5].

Plamenová spektrometrie

Stanovení síranů plamenovou spektrometrií je založeno na srážení SO_4^{2-} nadbytkem barnatých kationtů. Nespotřebovaný nadbytek Ba^{2+} iontů je po centrifugaci a inkubaci spektrofotometricky stanoven při 510 nm. Plamenovou spektrometrií lze v plazmě detekovat jednotky mikrogramů na litr.

Mezi radioizotopové metody patří např. stanovení koncentrace BaSO₄ vazbou na uranylacetát, nebo stanovení BaSO₄ po stabilizaci s křemenným práškem.

1.4. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační analytická metoda založená na pohybu nabitých částic v elektrickém poli v nosném médiu. Podle druhu nosného média a způsobu separace dělíme techniky kapilární elektroforézy na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární gelovou elektroforézu, micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii, kapilární isoelektrickou fokusaci a kapilární izotachoforézu [6].

Rozlišení jednotlivých analytů je možné díky rozdílným migračním rychlostem elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu látek v elektrickém poli je závislá na jejich elektroforetické mobilitě μ_e a na elektroosmotickém toku kapaliny křemennou kapilárou [7].

Elektroforetická mobilita je definována jako migrační rychlost iontu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě a je kvalitativní charakteristikou ionogenních látek pro dané prostředí [8]. Pohyb nabitých částic je způsobován elektrostatickým přitahováním jejich náboje k opačně nabitě elektrodě. Výsledný pohyb částic s nábojem q v roztoku je dán působením síly elektrického pole F_p a frikční silou prostředí F_f , která působí v opačném směru [9].

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

μ_i – elektroforetická mobilita, q – náboj iontu, η – viskozita okolního prostředí, r – hydratovaný poloměr iontu, E – intenzita elektrického pole, v_i – rychlost částic v elektrickém poli

EOF (elektroosmotický tok, z anglického electroosmotic flow), je pohyb elektrolytu daný působením stejnosměrného elektrického pole na elektrickou dvojvrstvu na rozhraní pevné a kapalně fáze u vnitřní stěny kapiláry (silanolové skupiny – SiOH). Tato dvojvrstva vzniká disociací ionogenních skupin ($-\text{SiO}^-$), která je způsobena neutrálními a zásaditými elektrolyty, nebo adsorpcí určitého druhu iontů na povrch kapiláry. V difuzní části této dvojvrstvy se tvoří přebytek volného náboje, který se vlivem stejnosměrného pole pohybuje a unáší i veškerý roztok v kapiláře. Míru tohoto přebytečného volného

náboje vyjadřuje veličina nazývaná zeta potenciál. Mobilita elektroosmotického toku je dána rovnicí

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

μ_{EOF} – mobilita elektroosmotického toku, ε – dielektrická konstanta, ζ – zeta potenciál, η – viskozita okolního prostředí

Elektroosmotický tok není selektivní a působí na všechny přítomné ionty stejně, bez ohledu na jejich náboj, ale ovlivňuje výslednou migrační rychlost a tím i účinnost separace a dobu analýzy [9]. K určení rychlosti elektroosmotického toku se nejčastěji používají elektroneutrální částice, které jsou kapilárou unášeny jen elektroosmotickým tokem.

Kromě malé spotřeby vzorku i základního elektrolytu a vysoké účinnosti je velkou výhodou CZE (kapilární zónová elektroforéza, z anglického capillary zone electrophoresis) plochý profil EOF, který na rozdíl od parabolického profilu typického pro laminární proudění způsobeného vnější hnací silou nosného média, např. u kapalinové chromatografie, nezpůsobuje rozmytí zón jednotlivých analytů a píky elektroferogramu jsou ostřejší [10]. Nevýhodou této metody jsou relativně vysoké detekční limity, zejména u spektrofotometrické detekce v UV a viditelné oblasti, což je způsobeno velmi krátkou optickou dráhou paprsku v měřeném prostředí [11].

1.5. Metody pro stanovení anorganických iontů pomocí kapilární elektroforézy

Stanovení kationtů

Anorganické kationty mají stejně jako malé organické molekuly mobilitu okolo 0,4 cm²/kVs, proto se jako BGE často využívá imidazol. Při nízkých koncentracích imidazolu nejsou píky jednotlivých kationtů symetrické. Zóny draselných iontů jsou rozmyty vpředu a u lithných iontů, které jsou nejpomalejší, se zóny naopak rozmývají vzadu. Symetričtějších píků lze dosáhnout zvýšením koncentrace imidazolu. S jeho rostoucí koncentrací však dochází k nežádoucí tvorbě tepla kvůli průchodu většího elektrického proudu. Optimální koncentrace imidazolu je 3 až 5 mM.

Analýzu lze urychlit zkrácením kapiláry, zvýšením napětí (30 kV) a použitím 3mM pufru při pH 6,0 [12].

Stanovení aniontů

Anorganické anionty se obvykle stanovují v zásaditých nebo slabě kyselých BGE, aby byla zajištěna jejich disociace a migrace v elektrickém poli. Citlivost stanovení aniontů je menší, než u kationtů [13].

Malé anorganické anionty je možné stanovit nepřímou UV detekcí v BGE s vizualizujícím ko-iontem. Nejvhodnější je chroman, protože má podobnou mobilitu jako analyty a tím je potlačena nežádoucí elektromigrační disperze. S rostoucí koncentrací chromanu dochází k potlačení EOF, což prodlužuje migrační časy. Dobu separace lze zkrátit potlačením EOF při použití kyselého BGE nebo obrácením směru EOF modifikací stěny kapiláry. V obou případech je nutno také obrátit polaritu elektrod. Separaci ovlivňuje také přidavek organických rozpouštědel (methanol, acetonitril, aceton), která mění viskozitu elektrolytu a pK_a silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry [14].

1.5.1. Stanovení anorganických iontů v plazmě

Pro stanovení iontů v krevní plazmě není vhodné použít BGE obsahující MES a histidin, protože koncentrace některých iontů (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) jsou řádově vyšší než jiných a píky málo koncentrovaných iontů nelze rozpoznat. BGE obsahující kyselinu mléčnou a histidin neumožňuje separaci všech kationtů. Účinnější separace lze v tomto případě dosáhnout přidáním 10% methanolu.

Elektroforetické mobility vápenatých, hořečnatých a sodných iontů v BGE obsahujícím 18-crown-6 ether a arginin, můžou být upraveny komplexací 6,5mM kyselinou maleinovou. Takovéto složení BGE není vhodné pro simultánní stanovení kationtů a aniontů, protože dochází k překrytí zón dusičnanů a síranů. Úpravou koncentrace kyseliny maleinové na 13 mM a přidáním modifikátoru EOF lze dosáhnout rozlišení jednotlivých zón všech iontů [15]. Pro stanovení chloridů, síranů, fosforečnanů a hydrogenuhličitanů v plazmě kapilární elektroforézou s nepřímou UV detekcí lze jako hlavní složku BGE použít chroman. Přídavek cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) a acetonitrilu při pH 9,3 zamezuje adsorpci proteinů na vnitřní stěnu kapiláry [14].

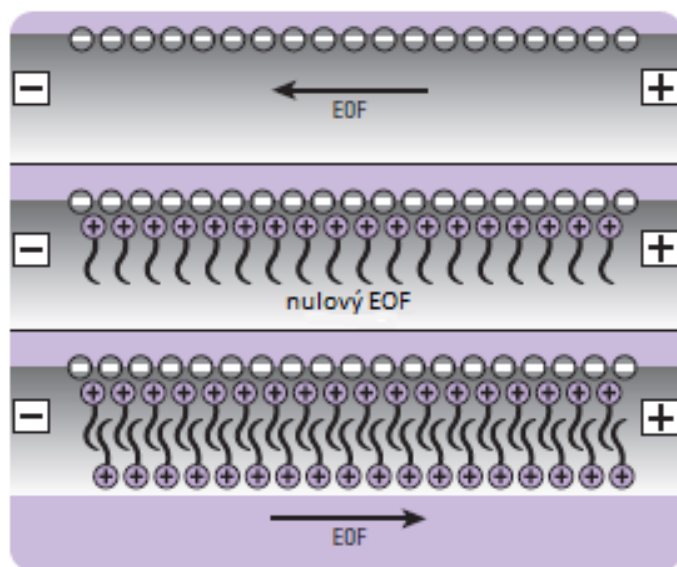
1.6. Metody pro potlačení elektroosmotického toku

Zpomalení EOF má zásadní vliv na separaci jednotlivých analytů. V některých případech je žádoucí zpomalení nebo úplné potlačení EOF. Pro separaci kationtů a aniontů v rámci jedné analýzy je naopak nutné zajistit rychlý a stabilní EOF.

Pokud je vnitřní stěna kapiláry záporně nabitá, dochází k nežádoucí adsorpci kladně nabitých látek. Při nízkých hodnotách pH jsou silanolové skupiny na povrchu kapiláry protonizované, což potlačuje sorpci kationtů a snižuje rychlost EOF [8].

Směr EOF lze změnit přidáním kationtových tenzidů do BGE. Tyto povrchově aktivní látky s dlouhým alifatickým řetězcem se vážou na záporně nabitou stěnu kapiláry, čím mění náboj stěny kapiláry a obrací směr EOF (Obr. 1). Mezi nejčastěji používané tenzidy patří cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), cetyltrimethylamoniumchlorid (CTAC) [16].

Další možností je použití neiontových polysorbátů (tzv. TWEEN) nebo kovalentní navázání hydrofilních polymerů jako je polyakrylamid, nebo hydroxyethylcelulóza [10].



Obr. 1: Navázání kationtového tenzidu na stěnu kapiláry, převzato z [10] a upraveno.

1.7. Úprava vzorků

Před samotnou separací aniontů v plazmě je nutné vysrážet plazmatické proteiny. Nejúčinnějšími srážedly jsou ACN (acetonitril), TCA (trichloroctová kyselina z anglického trichloroacetic acid) a síran zinečnatý o koncentraci asi 0,7 g/l. TCA vysráží 91 % proteinů, ACN 92 % a síran zinečnatý 96 % [17].

Přestože je síran zinečnatý nejúčinnější, je nevhodný pro stanovení anorganických iontů v plazmě, neboť se jeho přidávkem vzorek kontaminuje velkým množstvím stanovovaných síranových iontů. Srážení proteinů TCA by mělo být následované jejím vymytím ze vzorků acetonem. Zbytky TCA ve vzorku mohou ovlivňovat pH a rychlost elektroosmotického toku [18]. Srážení TCA je tedy vhodnější v případech, kdy se dále pracuje se sraženinou proteinů, nikoli s deproteinovaným roztokem. Srážení ACN je pro stanovení anorganických iontů v plazmě nejvhodnější, protože neinterferuje s žádným z analytů, je kompatibilní se základním elektrolytem a zásadně neovlivňuje výsledný elektroferogram.

1.8. Detekce v kapilární elektroforéze

1.8.1. Optická detekce

UV-VIS spektrofotometrie

Většina komerčně dostupných systémů využívá jako primární detektor UV nebo UV-VIS spektrometr. Detekce probíhá „on-line“ přímo na kapiláře. Detekční celá má ve srovnání s celou např. u HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z anglického high-performance liquid chromatography) mnohem menší rozměry. Dráha paprsku v měřeném roztoku je rovna vnitřnímu průměru použité kapiláry, tedy pouze desítky mikrometrů, proto je citlivost detekce u CZE o 1 až 2 řády menší. Pro zvýšení citlivosti je možné použít kapiláry s detekční celou ve tvaru bubliny, nebo písmene Z, jejichž optická dráha je delší. Nevýhodou takto modifikovaných kapilár je horší rozlišení jednotlivých analytů. Další možností je zakoncentrování analytu v kapiláře (sample stacking) [10].

Nepřímá UV detekce

Pro látky, které neobsahují výrazné chromofory, se využívá nepřímá UV detekce. Do BGE se přidává silně absorbující iont, tzv. vizualizující ko-iont, jako je např. chroman,

nebo imidazol [12]. Vzorek je proměřen při vlnové délce odpovídající nejvyšší absorpční vizualizujícího ko-iontu. V momentě, kdy detekční celou prochází neabsorbující ionty, dochází k poklesu signálu, protože tyto ionty kvůli zachování podmínky elektroneutality vytěsní ze své zóny odpovídající množství ko-iontů BGE. V elektroferogramu jsou píky těchto iontů záporné. Pomocí této metody je možné stanovit mnoho anorganických i organických iontů. Vizualizující ko-iont musí mít stejné znaménko náboje jako stanovované ionty a vlnová délka jeho absorpčního maxima by měla být dostatečně vzdálená od vlnové délky, při které absorbují analyty [19].

Fluorescence

Fluorescenční detektory mají oproti UV a VIS spektrometrům větší citlivost a selektivitu, proto jsou využívány ke stanovení látek v biologických matricích. Nevýhodou těchto detektorů je nepoužitelnost pro látky, které nefluoreskují, nebo je nelze převést na fluoreskující deriváty. Velmi častá je fluorescence indukovaná laserem (LIF) [20].

1.8.2. Vodivostní detekce

Větší citlivosti lze dosáhnout použitím vodivostních detektorů, které měří a porovnávají rozdíl vodivosti zón analytů a BGE. Elektrody prvních vodivostních detektorů byly umístěny přímo v kapiláře. Nevýhodou přímého kontaktu s BGE byla adsorpce složek roztoku na povrch elektrod, což mělo za následek nízkou opakovatelnost měření [21].

Později byla vyvinuta bezkontaktní metoda s koaxiálním uspořádáním. Detektor je tvořen dvěma elektrodami umístěnými na vnějšku křemenné kapiláry, vzdálenými 2 mm od sebe. Při průchodu analytu touto mezerou, která funguje jako rezistor, se mění jinak konstantní odpor. V závislosti na změně odporu se mění napětí sériově zapojeného rezistoru. Napětí je dále zesíleno a zpracováno jako signál [22]. Tato metoda je nejčastěji využívána ke stanovení látek neabsorbujících v UV oblasti (anorganické ionty, sacharidy) a ve farmaceutické analýze [23].

Při výběru vhodného základního elektrolytu je potřeba dbát na to, aby mezi vodivostí BGE a analytů byl velký rozdíl. Rozdílné vodivosti však mají za následek menší účinnost separace a asymetrii píků vlivem elektromigrační disperze. Platí také, že čím více je BGE

vodivý, tím více Jouleova tepla vzniká při vložení napětí, což má rovněž negativní vliv na účinnost a reprodukovatelnost separace [24].

1.8.3. Hmotnostní detekce

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním detektorem CE-MS (z anglického capillary electrophoresis – mass spectrometry) kombinuje vysokou separační účinnost kapilární elektroforézy a citlivost hmotnostního spektrometru s nízkým detekčním limitem. V minulosti bylo spojení CE-MS limitováno nízkou citlivostí a spolehlivostí [25]. Pro odstranění problémů s robustností a zajištění kompatibility CE-MS je zásadní volba iontového zdroje. Nejčastější je ionizace elektrosprejem ESI (z anglického electrospray ionization), u které jsou možné tři druhy propojení.

Spojení s přídavným průtokem kapaliny je nejběžnější, protože nejlépe vyrovnává malé odchylky způsobené různými podmínkami měření. Kapilára ústí na konci ESI sondy, kde se jednotlivé zóny vzorku postupně mísí s vodivou kapalinou. Na konec kapiláry je kvůli funkčnosti elektrospreje vkládáno napětí 2 až 6 kV. Nevýhodami jsou nutnost úpravy BGE, aby nezpůsobil zanášení iontového zdroje a neovlivňoval signál, a pokles vodivosti způsobený ředěním vzorku přídavnou vodivou kapalinou. Nevýhodou spojení bez přídavné kapaliny je časté ucpávání a lámání zúženého konce kapilár (5 až 30 μm), což má za následek snížení robustnosti metody. Funkčnost elektrospreje je možné zajistit pokovením (pozlacením) špičky kapiláry. U kapalného spoje končí kapilára v nádobce s elektrolytem, kde uzavírá obvod kapilární elektroforézy. Mezi separační a ESI kapilárou je mezera asi 15 μm a na ESI kapiláru je vkládáno napětí potřebné k ionizaci analytů [26].

Další způsoby ionizace jsou chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, z anglického atmospheric pressure chemical ionization), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, z anglického atmospheric pressure photoionization), či ionizace laserem za účasti matrice (MALDI, z anglického matrix assisted laser desorption ionization), která je vhodná zejména pro analýzu proteinů.

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie

Kyselina mravenčí, 85% (Penta, Česká republika)

Tetrahydrát chromanu draselného, p.a. (Lach:Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný, p.a. (Penta, Česká republika)

Acetonitril, p.a. (Lach:Ner, Česká republika)

Dusičnan draselný, p.a. (Lach:Ner, Česká republika)

Chlorid draselný, p.a. (Penta, Česká republika)

Síran draselný, p.a. (Penta, Česká republika)

Sířičitan draselný, p.a. (Lach:Ner, Česká republika)

Chloristan sodný, p.a. (Penta, Česká republika)

Chlorečnan draselný, p.a. (Lach:Ner, Česká republika)

Pentahydrát thiosíranu sodného, 99,5% (Sigma-Aldrich, USA)

Směsný vzorek krevní plazmy od anonymních dárců (odběrové zkumavky s didraselnou solí kyseliny ethylendiamintetraoctové)

2.2. Použité přístroje

Kapilární elektroforéza Agilent Technologies CE3D (Waldbronn, SRN) s UV-VIS detektorem s diodovým polem; křemenná kapilára celkové délky 50,0 cm (efektivní délka 41,5 cm), vnitřní průměr 50 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)

Centrifuga Microcentrifuge, Denver Instrument (Bohemia, USA)

Analytické váhy Kern ALS (Balingen, Německo)

2.3. Experimentální podmínky

Separční napětí: -25 kV (proud při použití optimálního BGE přibližně 65 μ A)

Optimalizovaný BGE: 0,4M kyselina mravenčí + 15mM chroman draselný

Optimalizované dávkování: elektrokinetické (-5 kV, 40 s)

Vlnová délka detekce: 260 nm

Příprava nové kapiláry: promytí 10 minut 1M roztokem hydroxidu sodného a poté 10 minut deionizovanou vodou

Příprava kapiláry před separací: promytí 1 minutu BGE do odpadní vialky a poté 1 minutu BGE do vialky s BGE

Teplota kazety s kapilárou: 25 °C

2.4. Příprava vzorků a výpočty

Proteiny ve vzorku plazmy byly sráženy acetonitrilem v poměru 3:1 (50 μ l plazmy + 150 μ l acetonitrilu) a následně odděleny centrifugací při 14000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut.

Nejistota výsledků byla vyjadřována směrodatnou odchylkou, relativní směrodatnou odchylkou, nebo intervalem spolehlivosti, které byly vypočítány podle následujících vzorců.

Směrodatná odchylka s

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i – naměřená hodnota, \bar{x} – aritmetický průměr naměřených hodnot, n – počet měření

Relativní směrodatná odchylka s_r vyjádřená v procentech

$$s_r = \frac{100 s}{\bar{x}}$$

s – směrodatná odchylka, \bar{x} – aritmetický průměr naměřených hodnot

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$ pro hladinu 95 %

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm K_7 (x_i - \bar{x}) = \bar{x} \pm 0,333 (x_i - \bar{x})$$

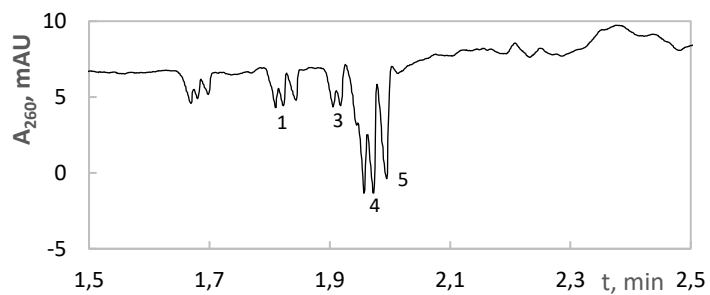
x_i – naměřená hodnota, \bar{x} – aritmetický průměr naměřených hodnot, K_7 – Dean-Dixonův koeficient pro 7 měření

3. Výsledky a diskuze

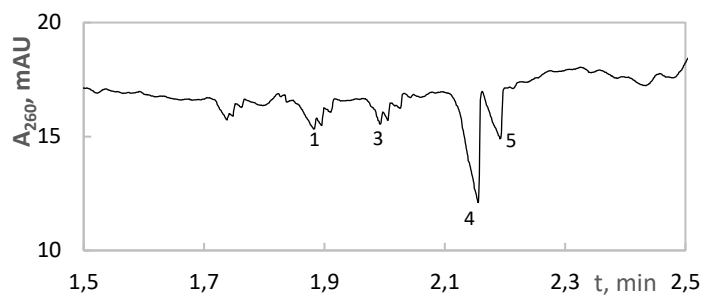
3.1. Optimalizace základního elektrolytu

Jako základní elektrolyt pro stanovení síranů byla zvolena kyselina mravenčí s přidavkem chromanu jakožto vizualizujícího ko-iontu. Chroman je vhodný, protože má podobnou elektroforetickou mobilitu jako ionty obsažené v plazmě, a nedochází tedy k výrazné elektromigrační disperzi. Pro určení optimálního složení základního elektrolytu byl použit vzorek obsahující standardy aniontů, které lze očekávat v plazmě a chlorečnany jako potenciální vnitřní standard. Koncentrace všech aniontů byly 1mM. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 3 s.

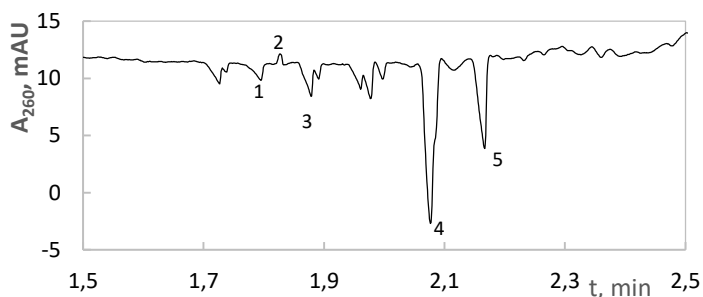
Přehled elektroferogramů získaných v průběhu optimalizace BGE nabízí Obr. 2. Na základě článku A. N. de Macedo a kol. byla počáteční koncentrace kyseliny mravenčí v BGE 0,4 M [27]. V BGE obsahujícím nižší koncentraci absorbujícího ko-iontu CrO_4^{2-} (0,4M HCOOH + 5mM K_2CrO_4) není absorbance BGE dostatečně vysoká, pokles absorbance při průchodu některých iontů detektorem je malý a píky jsou špatně rozlišitelné, také protože dochází k výraznější elektromigrační disperzi, která se projevuje trojúhelníkovým rozmytím píků. Výraznějších a lépe rozlišitelných píků lze dosáhnout zvýšením koncentrace chromanu. Při koncentracích nad 15 mM K_2CrO_4 však dochází k zvýšení proudu procházejícího kapilárou a k nežádoucímu zahřívání. Při použití BGE s nižší koncentrací kyseliny mravenčí (0,3 M HCOOH + 15 mM K_2CrO_4) píky nelze rozlišit téměř vůbec, protože je migrace analytů rychlejší a efektivní délka kapiláry nestačí k jejich separaci. Elektroferogram vzorku obsahujícího standardy analytů v BGE obsahujícím 0,4M kyselinu mravenčí a 15mM chroman draselný má nejstálejší základní linii, nejvíce ostré a symetrické píky, které se vzájemně nepřekrývají, a rozdíl mezi absorbancí iontů a základní linií je dostatečně velký. Vyšší koncentrace kyseliny mravenčí (0,5M HCOOH + 15mM K_2CrO_4) v BGE se pro vysoký šum a malé píky ukázala jako nevhodná, navíc při ní nejsou rozlišeny píky chlorečnanu a síranu.



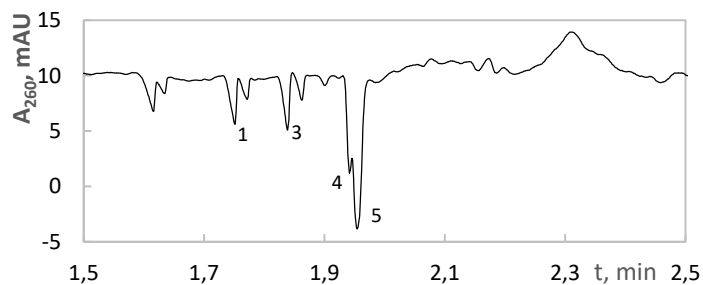
0,3 M HCOOH + 15 mM K₂CrO₄



0,4 M HCOOH + 5 mM K₂CrO₄



0,4 M HCOOH + 15 mM K₂CrO₄



0,5 M HCOOH + 15 mM K₂CrO₄

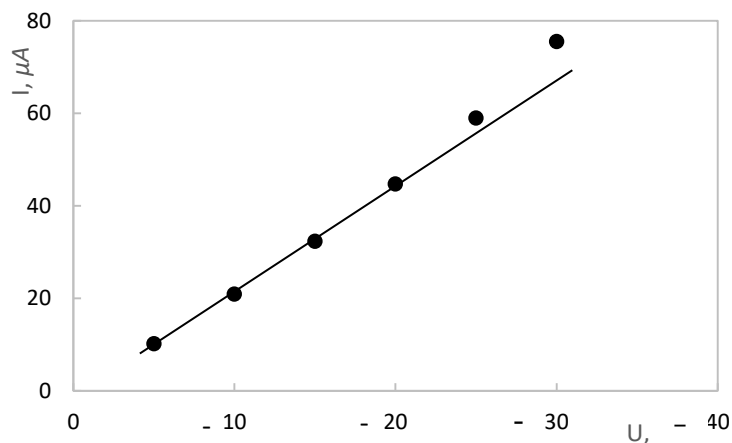
Obr. 2: Porovnání elektroferogramů směsi standardů aniontů při čtyřech různých koncentracích kyseliny mravenčí a chromanu draselného v základním elektrolytu. Vložené napětí -25 kV, dávkování hydrodynamické – 5 kPa po dobu 3 s, efektivní délka kapiláry 41,5 cm, celková délka 50,0 cm. 1 – Cl⁻, 2 – S₂O₃²⁻, 3 – NO₃⁻, 4 – ClO₃⁻, 5 – SO₄²⁻

3.2. Optimalizace dalších podmínek

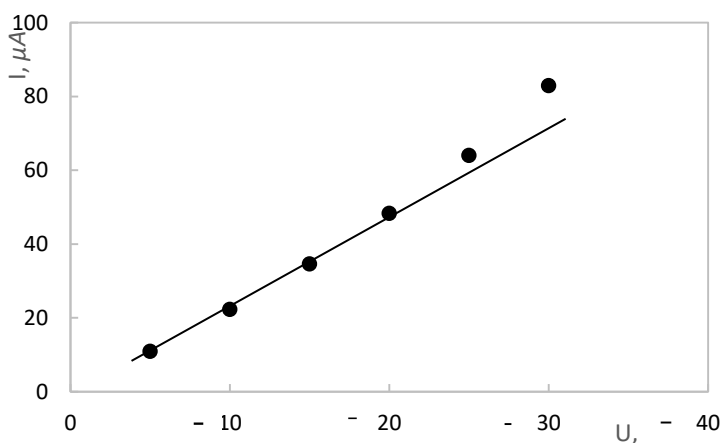
3.2.1. Optimalizace vkládaného napětí

Pro optimalizaci vkládaného napětí byl měřen vzorek 1mM síranů v BGE obsahujícím 0,4M HCOOH a 15mM K₂CrO₄. Při napětí -20 kV byla základní linie signálu při 260 nm nestálá a analýza byla pomalá (migrační čas síranů byl 3,0 min). Při aplikaci -25 kV se základní linie ustálila a migrační čas síranů se snížil na 2,3 min. Při zvýšení napětí na -30 kV, došlo k výraznému zvýšení šumu a destabilizaci základní linie.

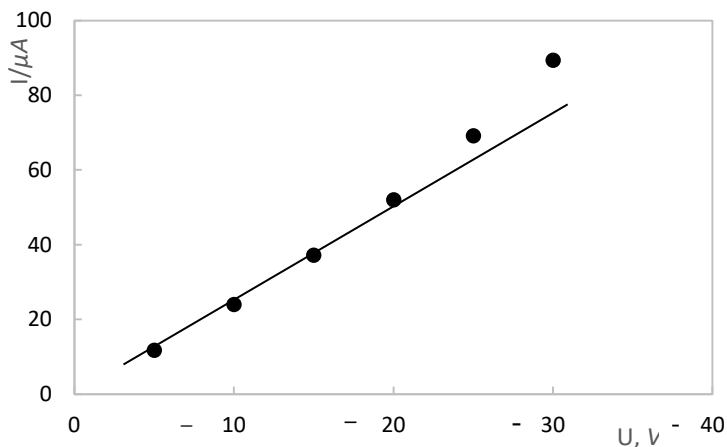
Aby byla zjištěna míra zahřívání roztoku v kapiláře za různých podmínek, byl proveden následující experiment. Na kapiláru bylo po dobu 30 s postupně aplikováno napětí -5 kV, -10 kV, -15 kV, -20 kV, -25 kV a -30 kV. Po ustálení byla zaznamenána hodnota proudu procházejícího kapilárou. Proměřeny byly tři různé koncentrace HCOOH v BGE (0,3 M, 0,4 M a 0,5 M). Koncentrace K₂CrO₄ byla ve všech třech typech BGE 15 mM. Z grafů závislosti naměřeného proudu na vloženém napětí (Obr. 3) je patrné, že při napětí vyšším, než asi 20 kV se závislost odchýlila od lineárního průběhu. Je také patrné, že s rostoucí koncentrací kyseliny mravenčí se míra odchýlení zvyšovala. Proud při napětí -25 kV dosahoval hodnoty 60-70 μA, což mělo za následek ohřívání roztoku v kapiláře a pokles viskozity BGE. Ten způsobil nárůst vodivosti. To je v souladu s předchozím pozorováním, že zvýšení napětí z -25 kV na -30 kV se projevovalo snížením stability základní linie, zároveň však docházelo ke zkrácení doby analýzy. Jako kompromis mezi těmito trendy byla zvolena hodnota vkládaného napětí -25 kV a BGE s 0,4M HCOOH.



0,3M HCOOH + 15mM K₂CrO₄



0,4M HCOOH + 15mM K₂CrO₄



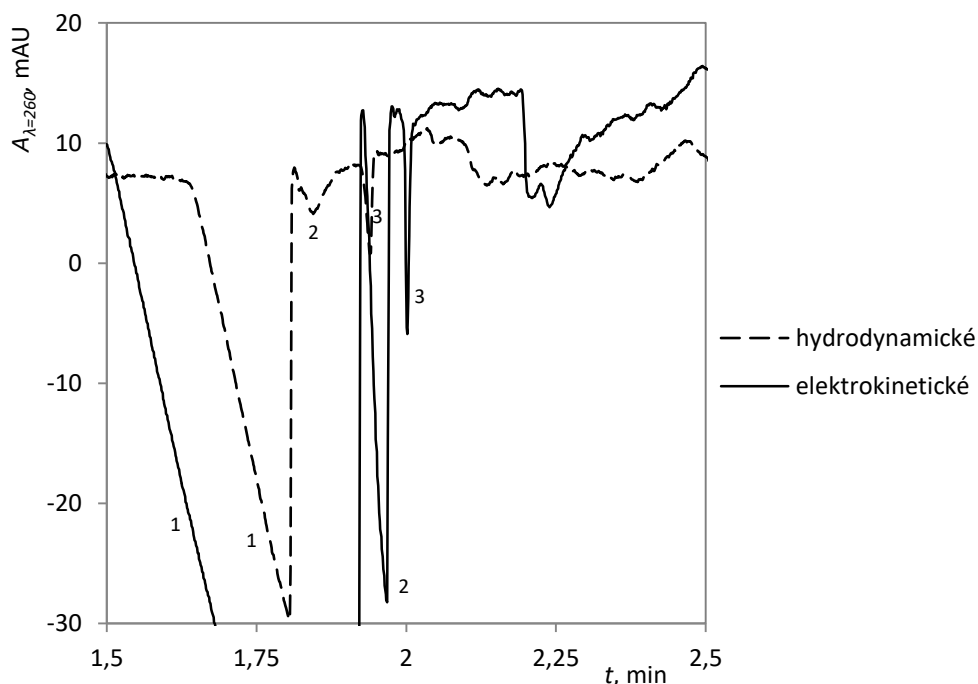
0,5M HCOOH + 15mM K₂CrO₄

Obr. 3: Závislost proudu protékajícího kapilárou na vloženém napětí při třech různých koncentracích kyseliny mravenčí (0,3 M, 0,4 M a 0,5 M) v BGE. Koncentrace K₂CrO₄ byla ve všech případech 15 mM. Doba aplikace napětí 30 s, efektivní délka kapiláry 41,5 cm, celková délka 50,0 cm.

3.2.2. Optimalizace dávkování

Hydrodynamické dávkování je obvykle robustnější, v některých případech však nemusí poskytovat dostatečnou citlivost. Při elektrokinetickém dávkování je možné využít zakoncentrování analytů vlivem zesílení pole, které zvýší citlivost měření. Nevýhodou elektrokinetického dávkování je nižší opakovatelnost způsobená závislostí množství nadávkovaného analytu na vodivosti vzorku. Tento jev lze částečně eliminovat přidáním vnitřního standardu. Jelikož je množství dávkovaného analytu závislé na jeho mobilitě, měla by být mobilita vnitřního standardu co nejbližší mobilitě analytu.

Očekávaná koncentrace síranů ve vzorku plazmy je v rozmezí 100 až 1000 μM a normální hodnota koncentrace chloridů v plazmě je zhruba 100 mM, proto byl pro určení optimálního dávkování použit vzorek obsahující 500 μM SO_4^{2-} , 100mM Cl^- a 2 mM ClO_3^- v BGE s 0,4M HCOOH a 15mM K_2CrO_4 a bylo testováno hydrodynamické dávkování tlakem 5 kPa po dobu 3 s a elektrokinetické dávkování napětím -5 kV po různě dlouhou dobu. Z elektroferogramu (Obr. 4) je patrné, že při dávkování -5 kV po dobu 40 s není pík síranů dostatečně velký. Prodloužením doby dávkování dosáhneme větších píků. Největší citlivosti bylo dosaženo při elektrokinetickém dávkování -5 kV po dobu 40 s.

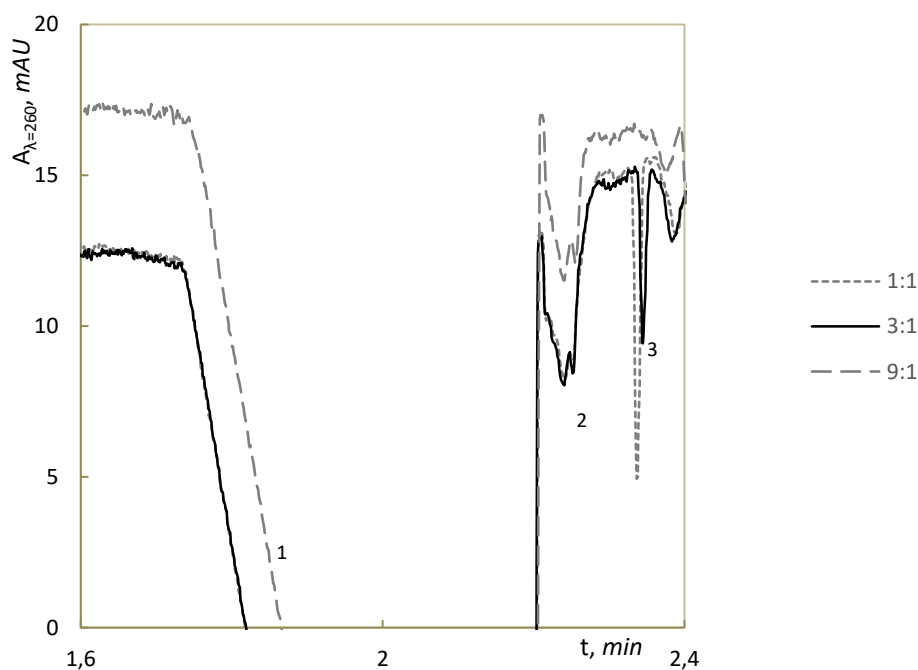


Obr. 4: Porovnání elektroferogramů při hydrodynamickém (5 kPa po dobu 3 s) a elektrokinetickém dávkování (-5 kV po dobu 40 s) na vzorku 500 μM síranů, 100mM Cl^- a 2 mM

ClO_3^- . Vložené napětí -25 kV, efektivní délka kapiláry 41,5 cm, celková délka 50,0 cm. 1 – Cl^- , 2 – ClO_3^- , 3 – SO_4^{2-} .

3.3. Optimalizace úpravy vzorku

Na vzorku plazmy bylo porovnáno srážení plazmatických proteinů acetonitrilem v objemovém poměru ACN:plazma 1:1, 3:1 a 9:1. Po vysrážení byl vzorek 10 minut odstředován při 14 000 otáčkách za minutu. V elektroferogramech (Obr. 5) můžeme vidět, že přidavek ACN neměl vliv na tvar ani symetrii píků. Přidáním velkého nadbytku ACN (9:1) plazma byla ACN naředěna tak, že pík síranu není v elektroferogramu vidět. U vzorků s přidavkem ACN v poměru 1:1 a 3:1 jsou elektroferogramy velmi podobné. Vhodnější je dávkovat vzorek s ACN v poměru 3:1 (150 μl ACN a 50 μl plazmy), protože nadbytek ACN vysráží více plazmatických proteinů a nedochází tak k častému ucpání kapiláry.

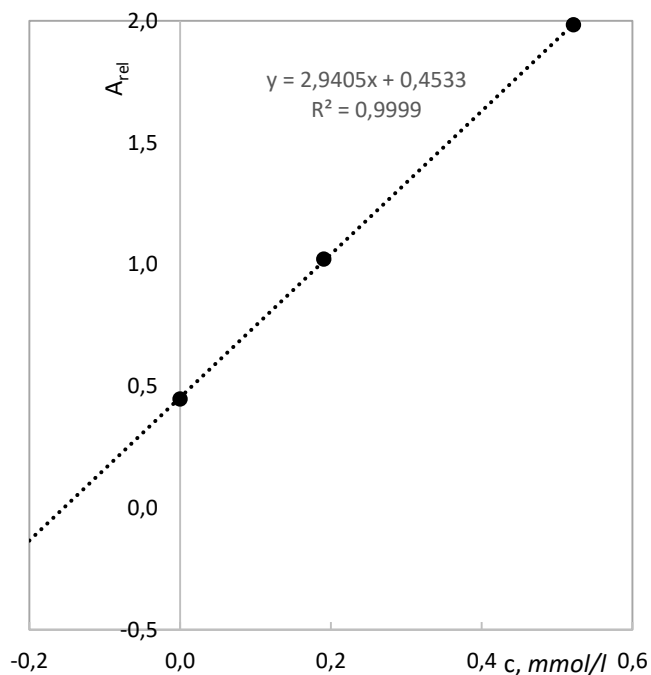


Obr. 5: Porovnání elektroferogramů vzorků plazmy srážených ve třech různých poměrech ACN:plazma (1:1, 3:1 a 9:1). BGE: 0,4M HCOOH a 15mM K_2CrO_4 , elektrokinetické dávkování -5 kV po dobu 40 s, efektivní délka kapiláry 41,5 cm, celková délka 50,0 cm. 1 – Cl^- , 2 – ClO_3^- , 3 – SO_4^{2-} .

3.4. Kvantifikace

Jako vnitřní standard byl použit chlorečnanový iont, jehož t_m je 2,40 min, takže se jeho pík nepřekrývá s píky ostatních iontů. Velikost píku 0,2mM KClO_3 byla vzhledem k okolnímu šumu příliš nízká a při zvýšení koncentrace KClO_3 na 1 mM byl pík naopak příliš velký a částečně se překrýval s píkem síranů. Proto byla zvolena koncentrace 0,5 mM.

Vzhledem k složité matici vzorku plazmy je vhodnější metodou kvantifikace metoda standardního přídatku. K 50 μl plazmy bylo přidáno 150 μl ACN. Vzorek byl odstředěn 10 minut při 14000 otáčkách za minutu. Nejdříve byl dávkován samotný supernatant, poté k němu bylo postupně přidáno 10 a 30 μl 1mM roztoku síranů. Skutečná koncentrace síranů ve standardním přídatku tedy byla 190 a 522 μM . Měření bylo provedeno v tripletu a průměrné hodnoty relativních ploch píků síranů byly vyneseny do grafu (Obr. 6) v závislosti na koncentraci síranů ve standardním přídatku. Průměrná plocha píku síranů ve vzorku bez standardního přídatku vztažená na vnitřní standard byla 0,4475, což odpovídá koncentraci 0,1542 mmol/l.



Obr. 6: Graf závislosti relativních ploch píků síranů na koncentraci standardního přídatku.

3.5. Opakovatelnost

Opakovatelnost ploch píků byla ověřena měřením vzorku plazmy s acetonitrilem v poměru 3:1, které bylo provedeno osmkrát ze stejné vialky. Relativní směrodatná odchylka ploch píků síranů je 9,4 %. Chybu lze zmenšit vztažením ploch píků analytu na vnitřní standard. Po vztažení ploch píků síranů na plochy píků chlorečnanů je směrodatná odchylka jen 5,97 %. Výsledky měření shrnuje Tab. 1.

Vlivem vložení napětí -25 kV dochází k degradaci BGE. Pro dosažení lepší opakovatelnosti je vhodné po každých 10 měření měnit BGE ve vstupní i výstupní vialce.

Tabulka 1: Naměřené a vypočítané hodnoty opakovatelnosti ploch píků v plazmě s ACN v poměru 3:1. A – plocha píku, A_{rel} – relativní plocha píku (vztažená k vnitřnímu standardu), s – směrodatná odchylka, s_{rel} – relativní směrodatná odchylka.

	A		A_{rel}
	[mA.u.s]		
	ClO_3^-	SO_4^{2-}	SO_4^{2-}
1	9,2	5,5	0,598
2	8,5	5,8	0,682
3	9,4	5,6	0,596
4	11,1	6,6	0,595
5	8,5	5,9	0,694
6	8,4	5,1	0,607
7	8,6	5,6	0,651
8	9,8	6,1	0,622
s	0,9	0,4	0,038
s_{rel} [%]	9,4	7,2	5,97

4. Závěr

Během této práce byly shrnuty dosud využívané metody klinické biochemie, které umožňují stanovení síranů v krevní plazmě pacientů s poruchami metabolismu sirných aminokyselin. Většina těchto metod je založená na měření optických vlastností různých sraženin síranových iontů. Tyto metody jsou náročné na přípravu vzorku a zastaralé. Cílem této práce byl vývoj nové, jednodušší a rychlejší metody.

Stanovením síranu a dalších anorganických iontů kapilární zónovou elektroforézou se zabývá velké množství vědeckých prací. Většina z nich však popisuje úspěšné stanovení především ve vodných roztocích s jednoduchou matricí. Pro stanovení v biologickém materiálu se složitou matricí bylo nutné určit vhodné podmínky úpravy vzorku a optimalizovat podmínky měření. Pro srážení plazmatických proteinů byl vybrán acetonitril v poměru k plazmě 3:1 a jako vnitřní standard 500 μ M chlorečnany. Nejvhodnějším základním elektrolytem byla 0,4M kyselina mravenčí s 15mM chromanem draselným, který plnil funkci vizualizujícího ko-iontu. Separační napětí bylo -25 kV. Vzhledem k tomu, že při hydrodynamickém dávkování nebyl pík síranů v jejich fyziologické koncentraci detekovatelný, bylo zvoleno elektrokinetické dávkování napětím - 5 kV pod dobu 40 s.

Ke kvantifikaci byla použita metoda standardního přídatku. Při měření opakovatelnosti bylo po vztažení ploch píků na vnitřní standard dosaženo směrodatné odchylky 5,97 %. Bez využití vnitřního standardu to bylo 9,4 %, protože nebyl eliminován vliv složité matrice biologického materiálu.

5. Použitá literatura

- 1 Kolektiv autorů; Funkce buněk a lidského těla, Složky krevní plazmy, multimediální skripta dostupná z <http://fb.lt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/2-slozky-krevni-plazmy/>
- 2 Hoffer, L. J., Hamadeh, M. J., Robitaille, L. and Norwich, K. H.; Human sulfate kinetics, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289 (2005), 1372–1380.
- 3 Dent, C. E., Senior, B. and Walshe, J. M.; The Pathogenesis of Cystinuria. II. Polarographic Studies of the Metabolism of Sulphur-Containing Amino-Acids, *Journal of Clinical Investigation* 33 (1954), 1216–1226.
- 4 Nader, H. B. and Dietrich, C. P.; Determination of sulfate after chromatography and toluidine blue complex formation, *Analytical Biochemistry* 78 (1977), 112–118.
- 5 Dodgson, K. S.; Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters, *Biochem Journal* 78 (1961), 312–319.
- 6 Gaš, B.; Kapilární elektroforéza, *Vesmír* 80 (2001), 370–371.
- 7 Klouda, P.; *Moderní analytické metody*, 2. upravené a doplněné vydání, Ostrava, Pavel Klouda 2003.
- 8 Poole, C. F.; *The Essence of Chromatography*, 1. vydání, Amsterdam, Elsevier, 2003.
- 9 Kašička, V.; Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, *Chemické listy* 91 (1997), 320–329.
- 10 Heiger, D.; *High performance capillary electrophoresis*, Santa Clara, Agilent Technologies 2000. Dostupné z <http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Agilent%20CE%20Primer.pdf>.

- 11 Michalcová, L., Glatz, Z.; Nové směry ve studiu biomolekulárních interakcí pomocí kapilární elektroforézy, *Chemické listy* 110 (2016), 249–257.
- 12 Beck, W. and Engelhardt, H.; Capillary electrophoresis of organic and inorganic cations with indirect UV detection, *Chromatographia* 33 (1992), 313–316.
- 13 Schmitt-Kopplin, P.; *Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*, 1. vydání, New York, Springer Science & Business Media 2008.
- 14 Yang, W. and Zhang, Z.; Fast and Direct Determination of Small Anions in Proteinaceous Samples Using Low Voltage-Short Tube Capillary Zone Electrophoresis System, *Analytical Letters* 36 (2003), 465–477.
- 15 Wan, Q. J., Kubáň, P., Tanyanyiwa, J., Rainelli, A. and Hauser, P. C.; Determination of major inorganic ions in blood serum and urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Analytica Chimica Acta* 525 (2004), 11–16.
- 16 Whatley, H.; *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, 1. vydání, New York, Humana Press 2001.
- 17 Polson, C., Sarkar, P., Inceldon, B., Raguvaran, V., Grant, R.; Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 785 (2003), 263–275.
- 18 Jiang, L., He, L. and Fountoulakis, M.; Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, *Journal of Chromatography A* 1023 (2004), 317–320.
- 19 Malá, Z., Vespalec, R., Bocek, P.; Capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection in the visible range, *Electrophoresis* 15 (1994), 1526–1530.
- 20 Skoog, D. A., Holler, F. J. and Crouch, S. R.; *Principles of Instrumental Analysis*, 6. vydání, Belmont, Thomson Brooks/Cole 2007.

- 21 Solínová, V. and Kasicka, V.; Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis, *Journal of Separation Science* 29 (2006), 1743–1762.
- 22 Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D. and Bonn, G. K.; Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis, *Analytical Chemistry* 70 (1998), 563-567.
- 23 Carvalho, A. Z., Silva, J. A. F. da and Lago, C. L.; Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 24 (2003), 2138–2143.
- 24 Zemann, A. J.; Conductivity detection in capillary electrophoresis, *Trends in analytical chemistry* 20 (2001) 346-354.
- 25 Schmitt-Kopplin, P. and Englmann, M.; Capillary electrophoresis – mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003–2004, *Electrophoresis* 26 (2005), 1209–1220.
- 26 Marina, M. L., Rios, A., Valcarcel, M.; *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, 1. vydání, Amsterdam, Elsevier 2005.
- 27 de Macedo, A. N., Irfan Yasin Jiwa, M., Macri, J., Belostotsky, V., Hill, S. and Britz-McKibbin, P.; Strong Anion Determination in Biological Fluids by Capillary Electrophoresis for Clinical Diagnostics; *Analytical Chemistry* 85 (2013), 11112–11120.