

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Elektroforetické stanovení nízkomolekulárních organických
kyselin v moči s duální detekcí**

**Electrophoretic determination of low-molecular organic acids
in urine with dual detection**

Diplomová práce

Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Miriam Uhrová

Předmětová hesla: analytická chemie, separace, kapilární elektroforéza, biochemie organických kyselin

Klíčová slova: duální detekce, bezkontaktní vodivostní detekce, nízkomolekulární organické kyseliny, elektroosmóza, elektroforéza, vrozené poruchy metabolismu

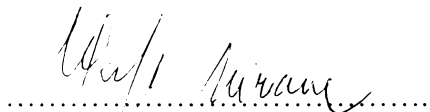
Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumných záměrů
MSM0021620857 a MSM0021620814.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením
školitele 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 1. května 2009.



Miriam Uhrová

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
ÚVOD.....	8
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1. Elektroforéza.....	10
1.1.1 Historický vývoj elektroforézy, cesta ke kapilární zónové elektroforéze (CZE).....	10
1.1.2 Elektromigrační separační metody.....	10
1.1.3 Princip CZE.....	11
1.1.4 Výhody CZE.....	13
1.2 Možnosti detekce u CZE.....	14
1.2.1 Duální detekce.....	17
1.3 Organické kyseliny jako bioukazatele.....	18
1.4 Využití CZE v diagnostice, aplikace CZE.....	26
1.5 Možnosti ovlivnění separace v CE.....	27
1.5.1 Výběr kapiláry.....	27
1.5.1.1 Modifikace kapilární stěny.....	28
1.5.2 Regulace teploty.....	29
1.5.3 Aplikace napětí.....	29
1.5.4 Dávkování.....	29
1.5.5 Doba analýzy, migrační čas.....	29
1.5.6 Volba pufru.....	30
1.5.7 Pufrová aditiva v CE.....	31
1.5.7.1 Surfaktanty.....	31
1.5.7.2 Chirální selektory.....	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
2.1 Chemikálie.....	33
2.2 Přístroje a materiály.....	34
2.3 Úprava vzorku moči pro CE analýzu.....	35
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
3.1 Optimalizace metody.....	36

3.2	Identifikace organických kyselin v moči.....	40
3.3	Kalibrační závislosti a limity detekce.....	44
3.3.1	Srovnání detekčních parametrů urátu a hippurátu při současném použití CCD a DAD detekce.....	50
3.4	Stanovení kyselin ve vzorku moči.....	51
4	ZÁVĚR.....	53
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
6	PODĚKOVÁNÍ.....	59

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BRIJ	polyoxyethylen-ether
CAPS	3-(cyklohexylamino)-propansulfonová kyselina
CCD	bezkontaktně vodivostní detektor
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium]-propansulfonát
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium]-2-hydroxypropansulfonát
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CIS	koordinace iontů pomocí spreje (u MS)
CITP	kapilární izotachoforéza
CL	chemiluminiscence
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	diode array detektor
ECD, EC	elektrochemická detekce
ECL	elektrochemiluminiscence
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FD	fluorescenční detekce
FEP	fluorovaný ethylen-propylen
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HEC	hydroxyethylcelulóza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP- β -CD	hydroxypropyl- β -cyklodextrin
ID	vnitřní průměr kapiláry
IEF	izoelektrická fokusace
LDR	lineární dynamický rozsah
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce

LOQ	limit stanovitelnosti
mAU	miliabsorpční jednotka
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	2-morfolinoethansulfonová kyselina
MMA	methylmalonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
MTAB	myristyltrimethylamonium bromid
NMR	nukleární magnetická rezonance
OD	vnější průměr kapiláry
PAA	polyakrylamid
PEG	polyethylenglykol
PVA	polyvinylalkohol
SDS	dodecylsulfonát sodný
SGE	gelová elektroforéza v plošném uspořádání
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TWEEN	polyoxyethylensorbitan
UV	ultrafialová oblast spektra

Poznámka k textu:

V této práci jsou používány triviální názvy organických kyselin a jejich aniontů, které jsou tolerovány IUPAC. Zde je uveden přehled těchto kyselin, v závorkách jsou jejich systematické názvy:

Kyselina mravenčí (methanová), kyselina octová (ethanová), kyselina šťavelová (ethandiová), kyselina mléčná (2-hydroxypropanová), kyselina jantarová (butandiová), kyselina acetoctová (3-oxobutanová), kyselina vinná (2,3-dihydroxybutandiová), kyselina glykolová (hydroxyethanová), kyselina hippurová (benzamoylethanová kyselina), kyselina jablečná (2-hydroxybutandiová), kyselina citronová (2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová), kyselina asparagová (2-aminobutandiová), kyselina močová (2,4,6-trioxopurin), kyselina salicylová (2-hydroxybenzoová), kyselina pyrohroznová (2-oxopropanová).

ÚVOD

Obrovský rozvoj moderní medicíny v posledních 50 - 100 letech byl z velké části umožněn vývojem nových analytických metod, které umožnily stanovovat široké spektrum metabolitu v tělních tekutinách i vzorcích tkání, a tím přinesly nové možnosti diagnózy nepřeberného množství nemocí a metabolických poruch. Mezi důležité metabolity, indikující některé vrozené poruchy metabolismu, ale i nemoc centrálního nervového systému, vznik neuroblastomu nebo ledvinových kamenů, patří nízkomolekulární organické kyseliny. Jejich analýza v tělních tekutinách má velký význam v diagnóze těchto onemocnění.

Nejvhodnější tělní tekutinou pro stanovování organických kyselin je moč, a to z několika důvodů: moč je nejsnáze získatelný vzorek k analýze, navíc neinvazivní cestou, organické kyseliny jsou v moči ve výrazně vyšších koncentracích než v krvi, virtuální nedostatek proteinů usnadňuje analýzu. Nejčastějšími metodami pro stanovení organických kyselin je plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS) a vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Mají ovšem několik nevýhod. Vyžadují náročné přípravy vzorků, dlouhý čas analýzy, velice drahé a náročné vybavení a také vysoce vzdělanou obsluhu.

Nový rozměr v tomto oboru přinesla kapilární elektroforéza (CE), která umožňuje provádět analýzy bez zdlouhavé přípravy vzorku, v kratším čase, což je v diagnóze závažnějších poruch významný faktor, navíc postačí velmi malé množství vzorku, což je v případě některých tělních tekutin nutností. Metodu lze optimalizovat díky použitím různých pufrů a dalších aditiv, a také použitím různých detektorů, jako je např. bezkontaktně vodivostní detektor (CCD), UV detektor, fluorescenční aj. Ve spojení s automatickými analyzátory tak kapilární elektroforéza poskytuje důležitou diagnostickou metodu v klinické praxi.

Použití duální detekce (UV spektrofotometrické a bezkontaktní vodivostní) navíc umožňuje stanovit širší spektrum látek během jedné analýzy a ještě tak rozšiřuje možnost využití kapilární elektroforézy v analýze tělních tekutin.

Tato diplomová práce si proto klade tyto cíle:

- vyvinout a optimalizovat metodu kapilární elektroforézy s duální detekcí pro stanovení důležitých organických kyselin v moči, využitelnou v diagnostice vrozených a získaných nemocí
- identifikovat tyto kyseliny ve vzorcích moči
- změřit kalibrační křivky těchto kyselin a určit parametry stanovení: limit detekce (*LOD*), limit stanovitelnosti (*LOQ*), lineární dynamický rozsah (*LDR*), citlivost stanovení

1 TEORETICKÁ ČÁST

1. 1 Elektroforéza

1. 1. 1 Historický vývoj elektroforézy, cesta k CZE

První teoretické základy elektroanalytických metod položil roku 1791 M. Faraday formulací svých zákonů elektrolýzy. V 19. století proběhly první pokusy o separaci látek v elektrickém poli, o vysvětlení pohybu částic v elektrickém poli se pokusil např. německý fyzik F. Kohlrausch.¹ K takové elektroforéze, v jaké podobě ji známe dnes, však vedla ještě dlouhá cesta.

Za zakladatele elektroforézy je považován švédský elektrochemik Arne Tiselius, který v roce 1930 ukázal, že ionizované molekuly lze rozdělit do ostrých zón ve skleněné trubici tvaru U působením elektrického napětí. Tuto metodu v dalších letech vylepšil, za své objevy na tomto poli pak získal v roce 1948 Nobelovu cenu.²

Během 50. let 20. století se začala rozvíjet zónová elektroforéza v plošném uspořádání, a to papírová elektroforéza, a později také elektroforéza na škrobovém a polyakrylamidovém gelu. V této době byla ale hlavní používanou metodou izotachoforéza.

V 60. letech Tiseliusův žák, Svensson (přejmenoval se později na H. Rilbe), publikoval teorii izoelektrické fokusace (IEF) a o několik let později O. Vesterberg aplikoval IEF na proteiny.¹

Teprve na konci 70. let a v 80. letech byla po několika modifikacích³ spočívajících např. v použití vysokého napětí a zavedení křemenných kapilár s malým vnitřním průměrem (< 100 μm) představena kapilární zónová elektroforéza (CZE).⁴

1. 1. 2 Elektromigrační separační metody

Kapilární zónovou elektroforézu řadíme do skupiny elektromigračních metod. Tyto metody mají celou řadu modifikací, jako je např. micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), kapilární elektrochromatografie (CEC) nebo kapilární izotachoforéza (CITP, ITP).

Všechny tyto metody (včetně CZE) využívají dvou elektrokinetických jevů, elektroforézy a elektroosmózy.⁵

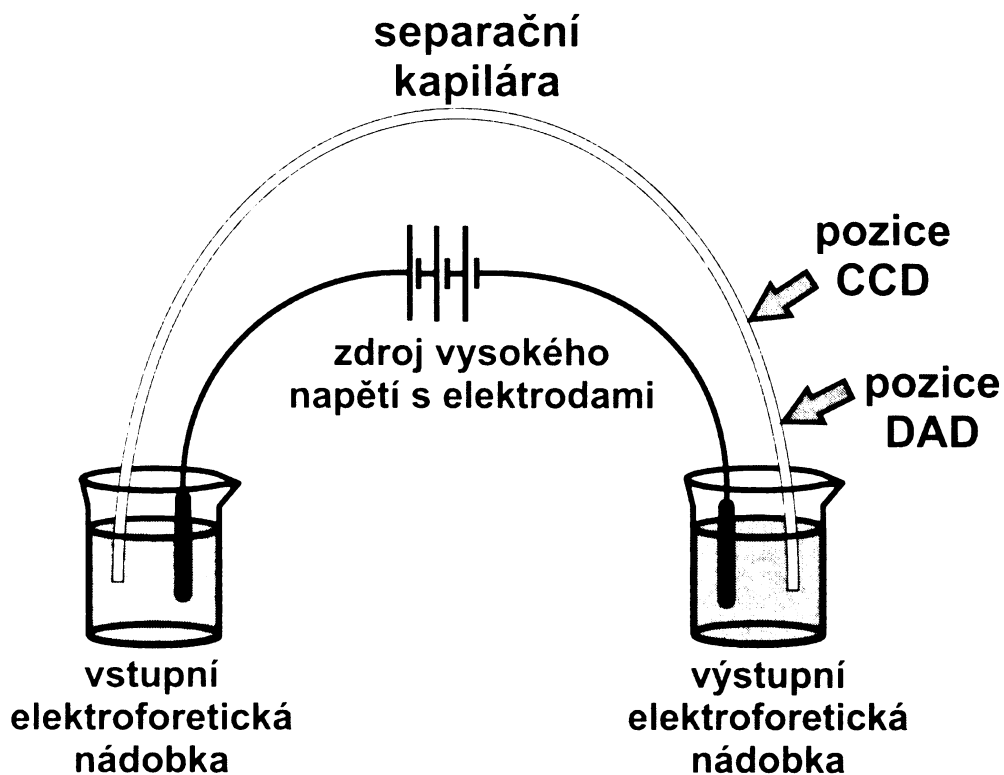
Elektroforéza neboli elektroforetický pohyb nastává po aplikaci napětí, kdy se nabitě částice začnou pohybovat k opačně nabitě elektrodě.

Elektroosmóza neboli elektroosmotický tok nastává tehdy, když vnitřní stěna kapiláry je v kontaktu se základním elektrolytem, tedy pufrům o určitém pH, jehož působením dochází k disociaci silanolových skupin (SiOH) křemenné kapiláry. Vnitřní stěna kapiláry získá záporný náboj, díky kterému je ke stěně přitahována vrstva kationtů z pufru. Tato vrstva kationtů je na rozdíl od pevné vrstvy disociovaných silanolových skupin kapiláry pohyblivá. Po vložení napětí se tak vrstva kationtů pohybuje směrem ke katodě spolu se silně hydratovanými kationty H^+ . Tok je tak silný, že vyvolá pohyb celého roztoku ke katodě (odtud elektroosmotický tok – EOF). Nejrychleji se pochopitelně pohybují kationty, neutrální částice se pohybují rychlostí EOF a anionty se pohybují nejpomaleji. Elektroosmotický tok se výrazně projeví při $pH > 4$.⁶

1. 1. 3 Princip CZE

Separace částic v kapilární zónové elektroforéze je založena na rozdílné pohyblivosti těchto nabitých částic v elektrickém poli. Tato metoda je proto aplikovatelná pouze na látky, které podléhají disociaci v roztoku.

Schéma kapilární elektroforézy je znázorněno na obrázku 1. Po nadávkování vzorku na vstupní konec separační kolony, kterou je křemenná kapilára o vnitřním průměru (ID) 20 - 100 μm a délce 30 - 100 cm, potažena polyimidovou vrstvou proti lámavosti, se oba konce kapiláry opět ponoří do zásobníků se separačním elektrolytem. Protože je pH separačního prostředí v kapiláře velmi důležitým činitelem separace, používá se proto již výše zmíněný pufr ve funkci separačního elektrolytu. V zásobnících jsou umístěny současně i elektrody z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (až 30 kV). Tím se nabitě částice začnou v kapiláře pohybovat směrem k detektoru, obvodem tak protéká elektrický proud. Jednotlivé částice se uspořádávají v kapiláře do jednotlivých zón podle své elektroforetické pohyblivosti. Nejrychlejší jsou nabitě částice s nejmenší velikostí a největším nábojem. Časový průběh odezvy detektoru na jednotlivé zóny analytu se nazývá elektroferogram.^{7,8}



Obrázek 1: Schematické znázornění kapilární elektroforézy.

V běžném uspořádání kapilární elektroforézy se vzorek dávkuje do vstupního konce kapiláry, který je u anody, detektor je umístěn na druhém katodovém konci kapiláry. Proto také elektroosmotický tok putuje od anody směrem ke katodě, která přitahuje pohybující se vrstvu kationtů z pufru (viz výše).⁹ Tudíž při separaci analytů s kationtovou povahou elektroosmotický tok urychluje separaci a zkracuje tak migrační časy analytů. Elektroosmotický tok je tedy žádoucí a uspořádání elektroforézy je v tzv. pozitivním módu. Na druhou stranu, jestliže separujeme anionty, pak dávkování probíhá na konci katodovém a detektor je u anody (tzv. negativní mód, obrácená polarita). To tedy znamená, že elektroosmotický tok se pohybuje proti směru separovaných aniontů, brzdí analýzu, je nežádoucím jevem.

S elektroosmotickým tokem je možné operovat. K tomuto účelu se přidává do základního elektrolytu povrchově aktivní látka (tzv. surfaktant), která se adsorbuje na stěnu kapiláry, a mimo jiné také omezí potenciální adsorpci ostatních látek. V závislosti na náboji této povrchově aktivní látky se elektroosmotický tok může zpomalit, zrychlit nebo obrátit, což je u negativního módu nutností. Látky obracející elektroosmotický tok

jsou např. cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) nebo polybren (hexadimethrin bromid).¹⁰ Mechanismus obrácení EOF je popsán dále – viz 1.5.7.1 - surfaktanty.

1. 1. 4 Výhody CZE

Jestliže srovnáme kapilární elektroforézu s jinými technikami, jako jsou např. plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie (TLC) nebo gelová elektroforéza v plošném uspořádání (SGE), má pak kapilární elektroforéza řadu výhod, které jsou důležitým přínosem nejen v klinické praxi, ale i v oblasti vědy, farmaceutického průmyslu a jiných odvětví chemie.

Snad nejvýznamnější výhodou kapilární elektroforézy je její aplikovatelnost pro velmi širokou škálu analytů, a to od anorganických iontů, organických molekul a biologických makromolekul, chirálních léčiv, vitamínů, restričních fragmentů, až po nadmolekulární částice typu virů a buněčných struktur. A to všechno s použitím jednoho přístroje a jedné separační kolony, kde se pouze zaměňuje složení separačního pufru.³

Kapilární elektroforéza poskytuje ve srovnání s chromatografickými technikami vyšší separační účinnost. Díky velmi tenké separační kapiláře jsou zóny látek velmi úzké, a proto dochází k jejich snadnějšímu oddělení. Protože elektroosmotický tok je generován po celé délce kapiláry, je výsledkem stálý průtok v libovolném místě. Rychlostní profil je zde pístový, proto dochází k minimálnímu rozšiřování zóny. Laminární tok vyvolaný čerpadlem u HPLC má rychlostní profil parabolický, a proto molekuly složek mají v profilu kolony různé rychlosti, a tudíž se píky více rozšiřují.

Další výhodou CE je možnost využití této techniky v on-line spojení s jinými instrumentálními metodami, např. s HPLC, hmotnostní spektrometrií nebo nukleární magnetickou rezonancí (NMR).³

Co do množství spotřebovaných analytů je CE velmi nenáročná technika. Objem vzorku, který se dává do kapiláry, je v rozmezí několika desítek nanolitřů. Tato skutečnost je důležitá zejména při odběru biologického materiálu, kdy například při odběru mozkomíšního moku pacienta je odebíráno jen nepatrné množství vzorku. Malý vnitřní průměr separačních kapilár také umožňuje velmi malou spotřebu separačního elektrolytu.

Biologický materiál před vlastní elektroforetickou separací obvykle nevyžaduje tak složité úpravy jako při chromatografické analýze. Často stačí vzorek pouze naředit, v případě plazmy postačí odstranit nežádoucí proteiny centrifugací.⁷

Ani na čas není CE náročnou metodou. Analýza trvá obvykle jen několik minut v závislosti na složitosti vzorku a počtu stanovovaných látek. A ve spojení s automatizací zabudovanou uvnitř moderních přístrojů CE dává možnost stanovení velkých souborů vzorků, což je velmi důležitý požadavek v klinické praxi.

Z ekologického hlediska CE životnímu prostředí také neškodí. Odpadem bývají většinou jen vodné pufrы, někdy s malými přídávky organických modifikátorů, které však nejsou pro přírodu a životní prostředí nebezpečné.³

Kapilární elektroforéza se tak stala plnohodnotnou analytickou separační technikou s perspektivním výhledem do budoucích let.

1. 2 Možnosti detekce u CZE

Vzhledem k malému průměru kapilár musí být detektory velmi citlivé. Výběr detektoru pro stanovení daného analytu je ale poměrně složitou záležitostí. A tím více je složitější, stanovujeme-li větší soubor analytů najednou.

Detektor může být umístěn vzhledem ke kapiláře buď přímo na ní - detekce „on-column“, za kapilárou - detekce „post-column“ nebo na konci kapiláry - detekce „end-column“.

Spektrum použitelných detektorů je relativně široké, jedním z nejpoužívanějších je fotometrický detektor pracující v UV-VIS oblasti spektra. Fotometrická detekce v UV oblasti spektra je aplikovatelná na organické látky, které absorbují v ultrafialové oblasti elektromagnetického záření. Látky musí obsahovat tzv. chromofory, což jsou určitá uskupení atomů odpovědná za absorpci záření. Chromofory mohou být různé funkční skupiny, látky obsahující konjugované dvojně vazby, aromatické látky atd. K měření se dnes velmi často používá spektrofotometrický detektor s diodovým polem, tzv. diod array detektor (DAD). Je tvořen polem několikaset až tisíc fotodiod na jediném křemíkovém čipu. Elektromagnetické záření prošlé vzorkem je zde rozloženo monochromátorem a dopadá na diodové pole, kde je detekováno současně všemi

fotodiodami. Ty poskytují různě velký signál v závislosti na absorpci záření vzorkem při daných vlnových délkách. Získáme tak ihned celé spektrum těchto vlnových délek.⁸

Mnohem citlivější detekční technikou je detekce fluorescenční (FD), zvláště její varianta laserem indukovaná fluorescence (LIF). Také tato technika FD je ale závislá na přítomnosti tzv. fluoroforů ve struktuře analyzovaných látek. Jestliže fluorofor není přítomen, provede se derivatizace, tím se fluorofor (popř. chromofor) zabuduje do struktury látky a detekce může proběhnout. K tomuto účelu se používá mnoho derivatizačních činidel.¹¹ Derivatizací je dnes možné dosáhnout velmi nízkých hodnot limitů detekce (*LOD*), a to až v nanomolárních koncentracích. Velmi citlivou, ale také velmi drahou technikou je již zmíněná laserem indukovaná fluorescence. Laserový paprsek je úzký uspořádaný svazek světla s minimálním vychýlením, který směřujeme přímo do detekčního okénka kapiláry. Protože jsou lasery omezené určitou vlnovou délkou (např. laser HeNe pracuje při vlnové délce 543 nebo 632 nm), existuje velmi málo fluorogenních reagentů, které jsou vhodné pro LIF detekci.^{12, 13, 14}

Další detekce použitelná u CZE metody je detekce elektrochemická (ECD, EC). Principem je oxidace nebo redukce analytu na elektrodě (Pt, Au, uhlík). I v tomto případě lze neaktivní analyt převést derivatizací na jeho elektrochemicky aktivní deriváty. Elektrochemické detektory se ale více uplatňují ve spojení s kapalinovou chromatografií než s CE, nebývají proto standardními součástmi přístrojů CE. Laboratoře si je vyrábějí samy ke svým vlastním analýzám.^{15, 16} Je zde totiž možnost určitého rušivého vlivu silného separačního pole CE na signál elektrochemického detektoru.¹⁷

CE ve spojení s elektrochemiluminiscenční detekcí (ECL) je citlivá metoda, je však relativně nová, ještě před 5 lety byla málo rozšířená pro rutinní CE analýzy.¹⁸ V současné době je již spojení CE s ECL běžné, využívá se např. pro analýzy psychotropních látek.¹⁹

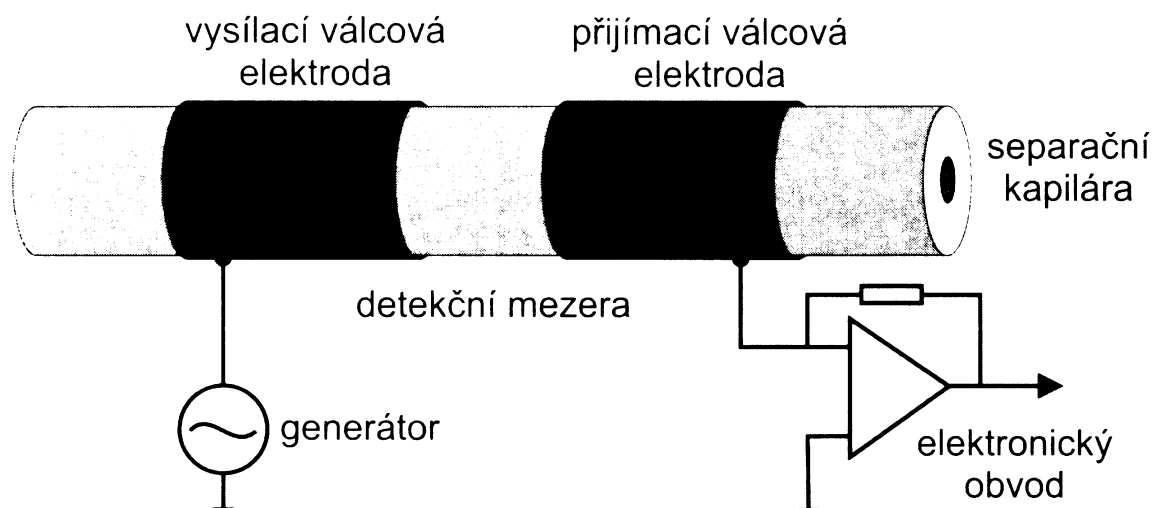
Nejčastější problém spektrofotometrických detekcí, a to nepřítomnost chromoforu ve struktuře stanovovaného analytu, můžeme vyřešit přidáním silně absorbující látky do separačního pufru. Tato látka ve funkci tzv. UV-absorbujícího koiontu musí mít alespoň jedno absorpční maximum v oblasti, kde stanovovaný ion absorbuje málo nebo vůbec.²⁰ Koiont má tedy stejné znaménko náboje jako stanovovaný analyt, a protože koncentrace tohoto koiontu v separačním prostoru elektrolytu je vyšší než v zónách migrujících

analytů, pak po průchodu těchto zón fotometrickým detektorem dojde ke snížení odezvy detektoru. Na elektroferogramu tedy vidíme záporný pík. Popsaná metoda nepřímé fotometrické detekce není ale vhodná ke stanovení látek v biologických tekutinách, které obsahují vysoký obsah vodivých anorganických solí. Detekce totiž požaduje málo koncentrované separační pufrů.¹¹

Mezi nepřiliš obvyklé možnosti detekce patří např. nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS). Ve srovnání se všemi výše zmíněnými možnostmi je detekce NMR velmi užitečná zvláště ve farmaceutickém průmyslu, protože ve spojení s CE poskytuje informace o struktuře neznámé stanovované komponenty. Za tuto informaci ovšem zaplatíme cenu v podobě nižší citlivosti a nutnosti relativně čistého vzorku, navíc tato metoda detekce vyžaduje větší množství vzorku.²¹ Vyvinuté metody využívající mnohonásobné elektromagnetické cívků přineslo zlepšení detekčních limitů na méně než 3 nmol.²² Vezmeme-li však v úvahu vysoké pořizovací náklady, je NMR detekce stále luxusní záležitostí.

Podobně luxusní je také využití MS detekce ve spojení s CZE. I tato metoda však nachází své uplatnění, o jejím vývoji v posledních letech pojednává práce.²³ Zmíněny jsou zde možnosti detekce s využitím ESI a CIS (coordination ion spray) ionizace. Z konkrétních stanovení využívajících MS detekci lze zmínit stanovení zbytků léčiv jako je např. diklofenak, ibuprofen, naproxen a další v povrchových vodách,²⁴ nebo stanovení penicilinu V ve vodném i nevodném prostředí pomocí MS-ESI detekce.²⁵

Další možností detekce je detekce vodivostní, která je založena na měření rozdílných elektrických vodivostí jednotlivých zón analytů. Původní přímá vodivostní detekce disponovala vysokou citlivostí, zejména pro ionty s velkou elektroforetickou pohyblivostí, analyty s pohyblivostí podobnou separačnímu pufru byly hůře detekovatelné.²⁰ Touto metodou byly stanovovány např. biogenní aminy ve vybraných vzorcích potravin.²⁶ Mnohem větší uplatnění však získala metoda bezkontaktní vodivostní detekce (CCD - contactless conductivity detection). Bezkontaktní vodivostní detektor je na obrázku 2. Na vnějším povrchu kapiláry jsou za sebou umístěny dvě tubulární kovové elektrody, mezi nimi je detekční mezera. Na jednu z elektrod je vkládán střídavý signál z generátoru, díky vodivosti zóny analytu přítomného v detekční mezeře je signál přenášen na druhou elektrodu a detekován.



Obrázek 2: Bezkontaktní vodivostní detektor

Toto uspořádání umožňuje měření vodivosti při nízkých frekvencích střídavého signálu (do 1 MHz), tím se značně zjednoduší zpracování elektrického signálu. Nespornou výhodou tohoto detektoru je skutečnost, že elektrody nejsou v přímém kontaktu s analyzovaným roztokem, tudíž nedochází k nežádoucím elektrodovým dějům (adsorpce analytu, pasivace elektrody, rozpouštění elektrody).¹¹

Univerzálnost této detekce demonstruje její využití pro analýzy širokého spektra analytů, různých alifatických aminů,²⁷ aminokyselin,^{28, 29, 30} heparinu v infuzních roztocích a plazmě,³¹ mono- a disacharidů,³² kyseliny valproové používané při léčbě epilepsie,³³ glukosaminu,³⁴ ale třeba také enzymaticky rozštěpených peptidů a proteinů.³⁵

1. 2. 1 Duální detekce

UV absorpční fotometrické detektory, nejběžněji používané u CE analýz, jsou často nedostačující k měření komplexních směsí anorganických a organických iontů. Separace tak musí být opakovány a výsledky kombinovány s použitím různých typů detekcí pro jednotlivé analyty. Tento problém byl ale vyřešen zavedením dvou různých detekcí do elektroforetického přístroje.³⁶ Rozmanité kombinace detektorů tak mohou významně zlepšit selektivitu metody,³⁷ měřit elektroaktivní a neelektroaktivní komponenty pomocí UV-EC detekce ve stejný čas³⁸ nebo např. získat dvojitou kontrolu analytů vzhledem k migračním časům díky detekci UV/CL.³⁹

Také kombinace bezkontaktní vodivostní a přímé fotometrické detekce, aplikovaná mimo jiné také v této diplomové práci (viz obrázek 1), se stává v současnosti populární. V roce 2004 byla úspěšně popsána metoda zabývající se zlepšením UV-CCD detekce založené na semitubulárních elektrodách v bezkontaktní vodivostní části a optické části zahrnující optické vlákno upevněné mezi elektrody, které přivádělo záření ze zdroje. Toto uspořádání tak úspěšně zajistilo jednoduchou výměnu separační kapiláry bez změny geometrie detekční cely, a tak umožnilo lepší využití této detekce v praxi.³⁶

1.3 Organické kyseliny jako bioukazatele

Výskyt organických kyselin v moči („organic aciduria“) patří do obsáhlé skupiny tzv. vrozených metabolických poruch („inborn errors of metabolism“, „congenital metabolic diseases“ nebo též „inherited metabolic diseases“). Vrozené metabolické poruchy představují širokou škálu nemocí z hlediska genetického. Příčinou bývá porucha určitého genu kódujícího většinou enzymy, které usnadňují přeměnu substrátů na produkty v biochemických pochodech organismu. Ve většině případů tak dochází k akumulaci určité látky v organismu, která se stává toxickou, je vyloučena do moče nebo stolice. Může nastat určitý zásah do normálních funkcí nebo dojde k snížení schopnosti syntetizovat esenciální látky.⁴⁰

Proto už novorozenecký screening organických kyselin v moči pro vrozené a získané nemoci je důležitý pro prevenci několika neurologických onemocnění, mentální retardace a jiných poškození.⁴¹ Akutně probíhající vrozená metabolická porucha u novorozenců a kojenců je však často diagnostikována se zpožděním, jelikož se na tento typ chorob obvykle nemyslí; klinické příznaky bývají často považovány za důsledek prenatální infekce nebo perinatálního poškození. Onemocnění připomínající sepsi, pneumonii nebo intoxikaci může probíhat jako akutní život ohrožující krize, která vyžaduje okamžitý zásah. Pozdní diagnostika a zahájení léčby mohou vést až k tragickým následkům.⁴²

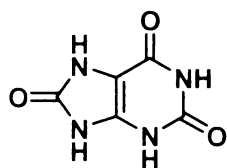
Organické kyseliny (s krátkým řetězcem) jsou ve vodě rozpustné sloučeniny obsahující jednu nebo více karboxylových skupin, případně i jiných funkčních skupin (ketoskupiny, hydroxylové skupiny a jiné). Patří sem například pyroglutamát obsahující

dušík nebo amino-konjugáty jako například hippurát (benzoylglycin) a další. Organické kyseliny jsou metabolickými meziprodukty všech hlavních skupin buněčných látek, a to aminokyselin, lipidů, sacharidů, nukleových kyselin a steroidů, proto se tyto kyseliny hromadí při poruchách jejich metabolismu.⁴³ V moči je pak u pacientů prokazatelné buď zvýšené množství organických kyselin, které se v moči vyskytují běžně, nebo se vyskytují abnormální organické kyseliny, které u zdravých lidí nenajdeme.⁴¹

Výskyt organických kyselin v moči souvisí také s poruchami vnitřního prostředí organismu. Například metabolická acidóza může souviset se zvýšenou koncentrací laktátu, ketolátek (acetoacetátu, 3-hydroxybutyrátu), nebo kyselin vzniklých metabolismem různých exogenních látek (např. při intoxikacích). Dále se také objevují hematologické příznaky, hyperamonemie, nebo například hypoglykemie v kombinaci se zvýšenými ketolátkami je typický nález právě při organické acidurii.⁴⁴

Interpretace koncentrací organických kyselin pro diagnostické účely závisí na typu abnormalit, protože vzestup jediné komponenty nemusí znamenat nemoc nebo konkrétní diagnózu.⁴⁵ Je nutno brát v úvahu celý komplex metabolických pochodů a občas i nález zavádějících příznaku.⁴⁴ Některé nemoci, jako například propionová acidemie, methylmalonová acidemie, pyroglutamová acidemie nebo glutarová acidemie, mohou být spolehlivě diagnostikovány z organických kyselin v moči, protože jsou zde patrné stejně vysoké vzestupy charakteristických kyselin.⁴⁵

Kyselina močová (aniont urát) – (2,6,8-trioxopurin) je u člověka konečným

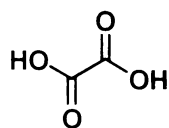


metabolitem purinových látek – adeninu a guaninu, jež jsou součástí nukleových kyselin a řady koenzymů. Kyselina močová je špatně rozpustná ve vodě, při vyšších koncentracích tak může vytvářet krystaly v okolí kloubů (nemoc dna) nebo konkrémenty ve formě

urátů v močových cestách (urolitiáza) při kyselé moči. Zvýšené vylučování kyseliny močové do moči – tzv. hyperurikosurie – může být dáno jednak zvýšenou filtrační náloží při hyperurikémii (zvýšení kyseliny v krvi) např. při dně, leukémii nebo hladovění, dále zábranou zpětné resorpce v tubulech ledvin (např. účinkem urikosurik) nebo při tzv. hyperurikosurické kalciumoxalátové lithiáze.⁴⁶ Normální hodnoty kyseliny močové v moči jsou 1,5 - 4,5 mmol/24 h, přičemž toto rozmezí ovlivňuje věk pacienta (s věkem hodnota stoupá), alkohol, dieta, kouření a jiné faktory. Stanovení kyseliny

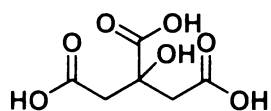
močové se nejčastěji provádí jako součást vyšetření dědičných poruch metabolismu, dny a ledvin.⁴⁷ Před analýzou je nutno pH moči upravit na hodnotu vyšší než 8. Vyloučené množství urátu závisí na obsahu purinů v dietě, proto je vhodné zaznamenat jídelníček pacienta v době sběru moče.⁴⁸

Kyselina šťavelová (aniont oxalát, šťavelan) – je dvouhlíkatá dikarboxylová



kyselina. V organismu vznikají oxaláty endogenní biosyntézou při oxidaci glyoxalátu (vzniká při odbourávání glycinu a serinu). Je také součástí klíčové sloučeniny – oxalacetátu - v citrátovém cyklu uskutečňovaném v mitochondriích živočišných buněk.⁴⁹ Zvýšené vylučování kyseliny šťavelové do moči, tzv. hyperoxalurie, může být příčinou vzniku konkrementů tvořených šťavelanem vápenatým, což může být často doprovázeno hyperkalcemií. Těžká hyperoxalurie s hodnotami v moči nad 1 mmol/l je způsobena většinou dědičnými metabolickými poruchami kyseliny šťavelové, kdy také mimo jiné dochází k ukládání kyseliny šťavelové ve tkáních (tzv. oxalóza). Toto onemocnění tak způsobuje celkové poškození organismu včetně renální insuficience. Kyselina šťavelová v moči pochází jen z 10 % z potravy, 30 % je z přeměny kyseliny askorbové a 60 % tvoří endogenní kyselina šťavelová vzniklá při metabolismu aminokyselin. Normální obsah kyseliny šťavelové v moči je < 0,45 mmol/den, index oxalát/kreatinin < 0,3 mmol/mol,⁵⁰ který je používán tehdy, pokud jde o vzorek bez celodenního sběru a pokud je i u nasbírané moči podezření na nedostatečné ledvinové funkce. Při vyšetření moči při podezření na hyperoxalurii je nutné moč nejdříve okyselit (na pH < 2), aby byly rozpuštěny krystaly šťavelanu vápenatého.⁴⁶

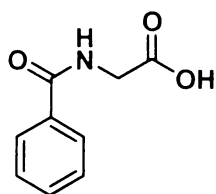
Kyselina citronová (aniont citrát) – je 6 uhlíkatá trikarboxylová kyselina. Citrát



vzniká v organismu v citrátovém cyklu, který poskytuje substráty pro dýchací řetězec, hraje však roli i v procesech glukoneogeneze, transaminace, deaminace a syntézy mastných kyselin. Při podávání kyseliny citronové *per os* se tato kyselina rychle oxiduje a moči se vyloučí pouze 1 - 2 % z přijatého množství. Kyselina citronová je považována za významný inhibitor krystalizace kalciumoxalátu v moči. pH moči značně ovlivňuje citraturii - při alkalizaci moči stoupá, u kyselé moče klesá. V moči dospělých zdravých osob se obvykle citraturie pohybuje mezi 2 - 5 mmol/24hod. Citraturie koreluje u zdravých jedinců pozitivně s věkem, podobně stoupá i se zvýšenou diurézou. Ke stanovení

citraturie se běžně v klinických laboratořích používá fotometrická detekce (340 nm). Stanovení citraturie se využívá k odhadu rizika krystalizace moče, respektive rizika vzniku urolitiázy, společně se stanovením dalších inhibitorů (hořčiku, nefrokalcinu) a promotorů krystalizace (například oxalátu, cystinu, síranů, vápníku, kyseliny močové, fosfátu a jiných) v moči.⁵¹

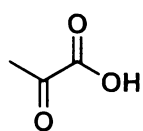
Kyselina hippurová (aniont hippurát) - vzniká v organismu konjugací kyseliny



benzoové s glycinem, přičemž kyselina benzoová pochází buď z přirozených složek potravy, nebo z toluenu vnikajícího do organismu při profesionální expozici či při zneužívání organických rozpouštědel. Stanovení kyseliny hippurové v moči se tedy používá

především v rámci biologických expozičních testů k monitoringu expozice toluenu při profesionální zátěži nebo při zneužívání toluenu fetováním. Fyziologické vylučování kyseliny hippurové do moči je způsobeno především metabolizací rostlinné potravy; za 24 hodin je vyloučeno 2,8 - 5,6 mmol kyseliny hippurové, přičemž záleží nejen na skladbě potravy, ale také na životosprávě (kouření a alkohol zvyšuje také množství kyseliny hippurové v moči).⁵² Normální koncentrace kyseliny v moči neexponovaných osob může být do 10 mmol/l, koncentrace již do 100 mmol/l jsou známky silného fetování. Nejběžněji se kyselina hippurová v moči stanovuje fotometricky, silně absorbuje v UV oblasti (maximum leží při 230 nm), nebo metodami kapalinové a plynové chromatografie.

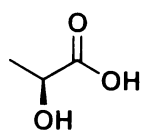
Kyselina pyrohroznová (aniont pyruvát) – pyruvát je produktem aerobní



glykolýzy, metabolitem alkoholového i mléčného kvašení a je také konečným produktem katabolismu uhlikatého řetězce alaninu, cysteinu, serinu, glycinu a threoninu. Z pyruvátu je také alanin syntetizován

transaminací. Enzymatickou reakcí je pyruvát metabolizován na kyselinu oxaloctovou nebo acetylkoenzym-A a vstupuje tak do citrátového cyklu. Redukcí pyruvátu působením laktátdehydrogenasy vzniká laktát při anaerobním metabolismu glukosy (viz dále laktát). V praxi se stanovuje v krvi látkový poměr laktát/pyruvát, který je obvykle menší než 10:1, může se však zvýšit při excesivní produkci laktátu, např. u tkáňové hypoxie. V moči se stanovuje látkový poměr pyruvát/kreatinin v jednotkách mmol/mol kreatininu, horní referenční mez u dospělé osoby se blíží k hodnotě 19 mmol/mol kreatininu.⁵³

Kyselina mléčná (aniont laktát) – je hydroxykyselina. Laktát je konečný

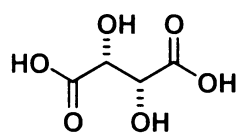


produkt anaerobního metabolismu glukosy; tvoří se redukcí pyruvátu působením laktátdehydrogenasy. Pyruvát může být zpět oxidován na laktát za katalýzy stejného enzymu. Hladina laktátu v krvi je dána poměrem mezi

jeho tvorbou, především ve svalech a erythrocytech, a jeho metabolizací v játrech. Laktátová acidóza je relativně častou příčinou metabolické acidózy. Vzniká buď z nadprodukce, nebo z nedostatečné utilizace laktátu. Laktátová acidóza se objevuje například u těchto dědičných poruch metabolismu: glykogenóza - typu I, methylmalonátová acidurie, mitochondriální myopatie s laktátovou acidózou (zvýšený laktát i pyruvát), subakutní nekrotizující encefalopatie u kojenců (Leighův syndrom), nedostatečnost pyruvát-karboxylázy a další. Denní fyziologická produkce laktátu je asi 1300 mmol. Vznikající laktát je transportován krví jednak do jater, kde je použit ke glukoneogenezi (Coriho cyklus), menší část laktátu je využita ledvinou (pro glukoneogenezi i pro vyloučení moči), zbytek metabolizuje myokard a další orgány. Referenční meze laktátu v plazmě se pohybují od 0,2 do 2,2 mmol/l, kritická hodnota je nad 10 mmol/l (respirační nedostatečnost, šok, otrava CO, kyanidy, diabetické kóma, intoxikace ethanolem, sepse, leukemie, toxická hepatopatie, methylmalonátová acidurie a další).⁵⁴

Klinický význam má také vyšší hladina laktátu v mozkomíšním moku, kdy je možné rozlišit bakteriální meningitidu od virové. Při bakteriální meningitidě jsou hodnoty v mozkomíšním moku kolem 7 mmol/l (byly nalezeny i hodnoty kolem 24 mmol/l). Vyšší hladina laktátu v likvoru je také spojena s anoxií, hypoxií, edémem mozku, epileptickým záchvatem, subarachnoidálním krvácením a dalšími. Fyziologické hodnoty laktátu v likvoru jsou 1,2 - 2,1 mmol/l.⁴⁶

Kyselina vinná (aniont tartarát) - zdrojem kyseliny vinné jsou kvasinky. Proces



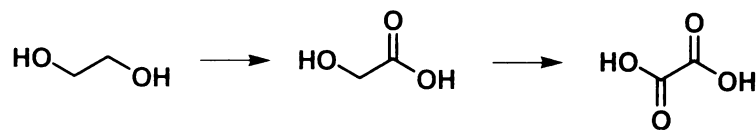
v těle je podobný kvašení vína, kde kyselina vinná musí být odstraněna z konečného produktu. Člověk sám o sobě tuto látku nevytváří. Avšak když je kvasinkám ve střevním traktu dodáván

cukr z potravy, produkují kyselinu vinnou – právě jako to dělají kvasinky při výrobě vína.⁵⁵ Ve střevech se však vyskytují i různé bakterie, které kyselinu vinnou naopak spotřebovávají.⁵⁶

Kyselina vinná je extrémně zvýšená u mnoha pacientů s fibromyalgií, onemocněním podpurných tkání a pohybového aparátu s bolestmi a projevy ve svalech, vazech a šlachách. Kyselina vinná je analogická (chemicky příbuzná) kyselině jablečné, která je klíčovým produktem citrátového cyklu. Kyselina vinná je zde pravděpodobně toxická, protože inhibuje enzym fumarázu, tím zpomaluje biochemickou produkci kyseliny jablečné, a tedy pokračování citrátového cyklu. Také u pacientů trpících autismem, zvláště dětí, kdy se mimo jiné vyskytuje určité narušení imunitního systému, bylo prokázáno extrémně zvýšené množství kyseliny vinné v moči.⁵⁵

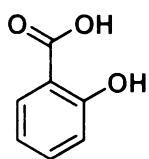
Kyselina jablečná (aniont malát) – je dikarboxylová kyselina vyskytující se jako meziprodukt v citrátovém cyklu. V moči je zvýšená koncentrace při metabolických poruchách, např. při D-2-hydroxyglutarové acidurii (deficit D-2-hydroxy-glutarátdehydrogenázy) společně s dalšími intermediáty energetického metabolismu, např. laktátem, sukcinátem, 2-oxoglutarátem.⁵⁷

Kyselina glykolová (aniont glykolát) – také stanovení kyseliny glykolové je součástí vyšetření spektra organických kyselin v moči.⁵⁸ Její zvýšení v moči může být důsledkem vrozené metabolické poruchy hyperoxalurie typu I, jestliže je také současně zvýšena i kyselina šťavelová. Zvýšená koncentrace glykolové kyseliny bez zvýšení kyseliny šťavelové v moči bývá nejpravděpodobněji způsobeno přítomností množící se kvasinkové infekce.⁵⁵ Kyselina glykolová je také meziproduktem oxidace ethylenglykolu, hlavní složky Fridexu. Ethylenglykol je v organismu odbouráván oxidací přes kyselinu glykolovou až na kyselinu šťavelovou, které jsou vylučovány močí. Při intoxikaci ethylenglykolem se objeví metabolická acidóza a jsou zvýšené hladiny těchto kyselin v moči (viz obr. 3).



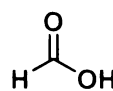
Obr. 3: Postupná oxidace ethylenglykolu přes kyselinu glykolovou až na kyselinu šťavelovou.

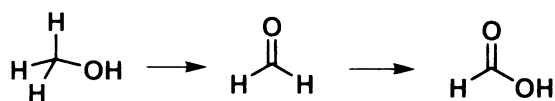
Kyselina salicylová (aniont salicylát) – kyselina salicylová se v těle vyskytuje během léčby aspirinem, jehož účinnou složkou je kyselina acetylsalicylová, což je analgetikum a antipyretikum s protizánětlivým účinkem. 70 – 90 % metabolicky aktivní kyseliny salicylové se váže na plazmatické proteiny



a poté se metabolizuje konjugací s glukuronovou kyselinou a glycinem na kyselinu salicylurovou, vzniká metabolicky aktivní kyselina gentisová. Glukuronidace má pro salicyláty limitovanou kapacitu. Salicyláty se absorbují tubulárními buňkami z kyselé moče, takže alkalická diuréza zvyšuje renální eliminaci salicylátů. Terapeutické meze v plazmě jsou do 0,1 g/l (u analgezie) a do 0,3 g/l (protizánětlivý efekt). Toxické příznaky lze pozorovat v moči od hladiny 0,6 g/l.⁵⁹

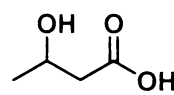
Kyselina mravenčí (aniont formiát) – nejjednodušší karboxylová kyselina, je

 obsažena v mravenčím jedu a kopřivách, také se používá jako přídavná látka do potravin pod označením E 236.⁶⁰ Stanovuje se v moči při podezření na intoxikaci methanolem nebo formaldehydem,⁶¹ (viz obr. 4).

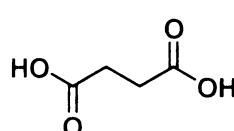


Obr. 4: Detoxikační reakce methanolu - oxidace přes formaldehyd na kyselinu mravenčí.

Kyselina 3-hydroxybutanová (aniont 3-hydroxybutyrát) – spolu s aceto-

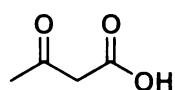
 acetátem patří mezi ketolátky, které při nedostatku sacharidů slouží jako zdroj energie pro extrahepatální tkáň. Ketolátky vznikají v játrech při hladovění, kdy se ve zvýšené míře odbourávají mastné kyseliny uvolněné z triacylglycerolů z tukových zásob. Slouží jako alternativní zdroj energie, odbourávají se pouze extrahepatálně v buňkách s aerobním mechanismem. 3-hydroxybutyrát se přemění na acetoacetát, ten dále na acetoacetylkoenzym A, který se štěpí na dva acetylkoenzymy A, ty pak vstupují do citrátového cyklu. Jeho zvýšená hladina v moči je tedy patrná při hladovění, diabetu, při dietách na tuky nebo při některých metabolických poruchách. Jeho stanovení v moči je nevhodnější provádět z 12 hodinového, případně 24 hodinového sběru moče, přičemž může být součástí vyšetření spektra organických kyselin. V moči se 3-hydroxybutyrát stanovuje spektrofotometricky, chromatograficky (GC-MS), nebo izotachoforeticky v krevní plazmě. Referenční meze v plazmě se pohybují od 0,04 do 0,2 mmol/l.⁶²

Kyselina jantarová (aniont sukcinát) – sukcinát patří mezi dikarboxylové

 kyseliny a je to jeden z významných metabolitů citrátového cyklu, kde je sukcinát oxidován na fumarát. Sukcinát vzniká ze

sukeinylkoenzymu A substrátovou fosforylací a jako jediný metabolit Krebsova cyklu předává své atomy vodíku v dýchacím řetězci prostřednictvím flavoproteinů. Sukcinát je také produktem anaplerotického glyoxylátového cyklu. Sukcinát se stanovuje v moči jako součást vyšetření spektra organických kyselin; jeho stanovení je nejvhodnější provádět z 12 hodinového, popřípadě 24 hodinového sběru moče. Většinou se stanovuje plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.⁶³ Hodnoty sukcinátu v moči mohou být zvýšeny kvůli nedostatku riboflavinu (vitamin B₂) nebo koenzymu Q10. Hodnoty sukcinátu větší než 50 mmol/mol kreatininu mohou znamenat metabolickou poruchu nebo například bakteriální přeměnu aminokyseliny glutaminu na kyselinu jantarovou v gastrointestinálním traktu.⁵⁵ Hromadění *L*-argininojantarové kyseliny (arginino-sukcinát) v moči patří mezi vrozené poruchy metabolismu aminokyselin a nazývá se argininojantarová acidurie. Podkladem je deficit enzymu argininosukcinázy, který hraje důležitou roli v močovinovém cyklu.

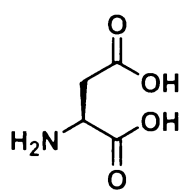
Kyselina acetocetová (aniont acetoacetát) - patří mezi ketolátky, které při



nedostatku sacharidů slouží jako zdroj energie pro extrahepatální tkáň.

Jeho redukcí vzniká 3-hydroxybutyrát, jeho spontánní dekarboxylací vzniká aceton. Acetoacetát je produktem β -oxidace mastných kyselin, vzniká také při odbourávání ketogenních aminokyselin (leucin, fenylalanin, tyrozin, lysin); acetoacetát se odbourává na acetylkoenzym A, který vstupuje do citrátového cyklu. Stanovuje se tedy v rámci stanovení ketolátek v moči, zejména pro včasné rozpoznání metabolické dekompenzace u diabetiků. Ketóza se vyskytuje také při hladovění, horečnatých onemocněních, graviditě nebo pooperačních stavech. Acetoacetát je také součástí vyšetření spektra organických kyselin v moči. V moči se stanovuje většinou chromatograficky (GC-MS), v séru například spektrofotometricky, elektroforeticky nebo izotachoforeticky. Referenční meze acetoacetátu v séru jsou 0,05 - 0,115 mmol/l. Stanovuje se též látkový poměr v přepočtu na kreatinin v moči, přičemž horní referenční mez acetoacetátu je do 17 mmol/mol kreatininu.⁶⁴

Kyselina asparagová (aniont aspartát) – patří mezi neesenciální glukogenní



aminokyseliny. Aspartát je důležitý při formování prostorové struktury bílkovin díky existenci záporných nábojů v postranním řetězci a účastní se přenosu aminoskupin v organismu. Zároveň se významně podílí na biosyntéze purinových a pyrimidinových nukleotidů. Aspartát je také

zapojen do močovinového cyklu tím, že přenáší aminoskupinu pro vznik argininu z citrulinu. V nervovém systému slouží také jako neurotransmitter. Aspartát je syntetizován jednostupňovou přeměnou oxalacetátu; jde o transaminační reakci s pyridoxalfosfátem jako kofaktorem a glutamátem jako zdrojem aminoskupiny. Je používán jako součást ochucovadel potravin, konzervačních a antioxidačních přípravků. Vysoký podíl aspartátu je v erythrocytech a leukocytech. Patologické vylučování aspartátu močí je známkou dikarboxylové acidurie a deficitu ledvinného transportu dikarboxylových kyselin. Referenční meze aspartátu v moči jsou u obou pohlaví různé, pro ženy je rozmezí 12 - 98 $\mu\text{mol/l}$, u mužů 7 - 40 $\mu\text{mol/l}$. Stanovení se provádí chromatograficky (HPLC, IEC, TLC). Aspartát se stanovuje také v séru, plasmě a likvoru.⁶⁵

1. 4 Využití CE v diagnostice, aplikace CE

Od uvedení komerčních přístrojů CE v 80. letech 20. století se zájem o tuto separační techniku začal rozvíjet v řadách výzkumných skupin, které se ve svých publikacích zabývaly separací sérových proteinů v kapiláře naplněné tekutinou. Srovnáním s konvenčními a ještě oficiálně používanými technikami elektroforézy na agarózovém gelu nebo celulóze tyto výsledky CZE separací demonstrovaly vyšší rozlišení, a tedy přínosné a podrobnější diagnostické informace.⁴

Dnes je CE perspektivním analytickým nástrojem nahrazujícím mnoho konvenčních laboratorních metod v klinické praxi. Pro řadu již zmiňovaných výhod CE bylo vyvinuto mnoho metod stanovení klinicky důležitých analytů v biologických tekutinách. Stanovení jsou prováděna především v séru, plasmě, moči, slinách, mozkomíšním moku, tekutině získané drenáží, hemodialyzátu, potu, lyzátech buněk a jiných.⁴

Už v letech 1994 - 1996 bylo vyvinuto několik důležitých metod CE pro klinickou praxi, některé z nich mohou diagnostikovat různé metabolické poruchy, jako např. artritidu (kvantitativní analýza hyaluronanu v lidské synoviální tekutině), neurologické a neuropsychiatrické poruchy (kyselina močová v mozkomíšní tekutině), výskyt organických kyselin v moči jako důsledek různých nemocí (viz. 3. kapitola), fenyلكetonurii (výskyt fenyلpyruvátu, 2-hydroxyfenylacetátu, fenyللaktátu a fenyلacetátu

v moči pacientu), uremii (zvýšené hodnoty hypoxantinu, pseudouridinu, kyseliny hippurové a močové u chronického selhání ledvin), xantinurii (zvýšený hypoxantin a xantin v moči) a jiné. Další metody mohou sloužit k DNA a RNA analýze, např. identifikaci CFTR genu (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) pacientů s cystickou fibrózou, k PCR analýze (polymerase chain reaction) produktu viru hepatitidy B, přímé kvantifikaci RNA lidského imunodeficientního viru typu HIV-1 v plazmě nebo k analýze tumor supresorového genu p53 a dalším analýzám. Také analýza proteinů pomocí CE může poukazovat na některé poruchy, např. redukce proteinu synaptotagminu, což je jeden z membránových proteinů synaptické vezikuly,⁶⁶ v mozkomíšním moku pacientů s Alzheimerovou poruchou v jejím raném stadiu, dále např. analýza semenné plazmy podle určitých elektroforetických vzorců, což může značit jisté poruchy plodnosti, a to například astenozoospermie (sníženou pohyblivost spermií), azoospermie (nepřítomnost zralých spermií), oligozoospermie (snížení počtu spermií) a další. Také standardní analýza sérových proteinů jako např. imunoglobulinů G, komplementu C₃, transferinu, α₂-makroglobulinu, haptoglobinu, α₁-antitrypsinu, albuminu nebo prealbuminu přináší řadu poznatků a souvislostí, pomocí kterých lze stanovit diagnózu. Také známé stanovení tzv. paraproteinu metodou elektroforézy na agarovém gelu, ale i metodou CE, bylo vyvinuto pro biochemické laboratoře. Bence Jonesova bílkovina a albumin v moči nebo myoglobin extrahovaný ze svalů mohou též ukazovat na některé poruchy.⁶⁷

Kromě výše uvedených příkladů jsou další aplikace v přehledových člancích.^{4,68}

Velmi zajímavou a také přínosnou aplikací CE je tzv. terapeutické monitorování léků (TDM - therapeutic drug monitoring), které pomáhá kontrolovat účinky podávaných léků. O přehledu elektromigračních metod včetně CE zabývajících se TDM pojednává článek.^{69,70}

1. 5 Možnosti ovlivnění separace v CE

1. 5. 1 Výběr kapiláry

Ideálními vlastnostmi materiálu kapiláry jsou chemická a elektrická inertnost, UV-optická průhlednost, pružnost a pevnost, a také levné pořizovací náklady. Dnes se

většinou kapiláry vyrábějí z taveného křemene a na povrchu bývají potaženy ochrannou polyimidovou vrstvou. Pro detekci je nutné část polyimidové vrstvy vypálit nebo vyškrabat ostřím žiletky pro vytvoření tzv. detekčního okénka. Jiným materiálem, ne tak často užívaným v CE analýzách, je teflon. A protože propouští UV záření, není nutné zde vytvářet detekční okénko.⁶

V CE se nejčastěji používají křemenné kapiláry o vnitřním průměru (ID) 20 - 100 μm , vnějším průměru (OD) 350 - 400 μm a délce 30 - 100 cm.^{6,7}

1. 5. 1. 1 Modifikace kapilární stěny

Reakce analytů s vnitřním povrchem kapiláry během analýzy jsou příčinou snižování účinnosti. Tyto interakce jsou buď iontové nebo hydrofóbní. Existují proto dva základní mechanismy, které zabrání těmto nežádoucím adsorpčním vzorku.

Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Používají se např. fluorovaný ethylen-propylen (FEP, neboli teflon-FEP), polyakrylamid (PAA), myristyltrimethylamonium bromid (MTAB), polyvinylalkohol (PVA)⁷¹ nebo polysacharidy aj. Po silylaci následuje deaktivace vhodnými funkčními skupinami těchto látek. V závislosti na deaktivaci je také zároveň EOF buď eliminován (PAA, PEG-neutrální deaktivátory), nebo obrácen (kationické deaktivátory). EOF také mohou obracet amfoterní látky jako např. proteiny nebo aminokyseliny. Takto modifikované kapiláry musí být stabilní vůči častému promývání proplachovacími roztoky a vůči hydrodynamickému toku. Bohužel tato stabilita je omezena.⁶

Druhým mechanismem modifikace kapilární stěny je tzv. dynamická deaktivace. Výhodou je zde stabilita, protože modifikátor je průběžně přidáván přímo do separačního pufru. K tomu se používají např. hydrofilní polymery (alkylcelulóza, PVA, dextransy), surfaktanty (viz dále) nebo amoniové soli. Podobně jako v prvním případě, modifikátory interagují se stěnou kapiláry, mění její náboj a mění hydrofobicitu roztoku, což může být nevýhodné. Další nevýhodou je delší čas potřebný k získání reprodukovatelné podoby povrchu kapiláry a konstantního pH.⁶

1. 5. 2 Regulace teploty

Regulace teploty kapiláry je důležitá pro reprodukovatelnost metody. Teplota může být regulována vysokorychlostním proudem vzduchu nebo kapalnou chladicí směsí. Ačkoli chlazení kapalinou je účinnější systém, přesto se ale více používá chlazení vzduchem, což je instrumentálně jednodušší.⁶

1. 5. 3 Aplikace napětí

Napětí mezi elektrodami může dosáhnout až 30 kV. Stabilní regulace napětí je podmínkou pro reprodukovatelnost migračního času. V případě obrácení EOF je nutné také obrátit polaritu elektrod (viz výše – negativní mód). Protože vstupní a výstupní konce kapiláry jsou obvykle předem určeny geometrií detektoru, přepínání polarity elektrod tak musí být provedeno ve zdroji napětí.⁶

1. 5. 4 Dávkování

Malé objemy dávkovaných vzorků jsou pochopitelně úměrné malým průměrům kapilár. Délka nadávkované zóny vzorku by neměla přesáhnout 2 % celkové délky kapiláry, což odpovídá několika milimetrům zóny, to je asi 1 - 50 nanolitřů vzorku. Přesná délka zóny vzorku závisí na difúzním koeficientu analytů v roztoku a na době analýzy. Dvě nejběžnější metody dávkování jsou hydrodynamické a elektrokinetické. U obou metod obvykle neznáme přesný objem nadávkovaného vzorku, lze jej ale vypočítat. Používanější je dávkování hydrodynamické, u něhož je množství zavedeného vzorku téměř nezávislé na jeho matici.⁶

1. 5. 5 Doba analýzy, migrační čas

Doba analýzy je čas potřebný k získání analýzy celé směsi analytů v jednom vzorku, u CE se pohybuje řádově v minutách.

Čas, který analyt potřebuje k elektromigraci z místa dávkování do místa detekce, je migrační čas. Reprodukovatelnost migračního času ovlivňují různé faktory, jako např. změna teploty kapiláry, adsorpce látek na kapilární stěnu, hystereze (tj. závislost stavu

na stavech předchozích) náboje na vnitřní stěně kapiláry, změny ve složení pufru, změny napětí, různý obsah silanolových skupin ve vnitřní stěně kapiláry aj.⁶

1. 5. 6 Volba pufru

K úspěšnosti CE separace je volba pufru extrémně důležitým krokem. Pufr by měl mít následující vlastnosti:

- ✓ dobrou pufrovací kapacitu ve zvolené oblasti pH
- ✓ nízkou absorpční při vlnové délce, při které je prováděna detekce
- ✓ nízkou mobilitu k minimalizaci generovaného proudu (minimálně nabité ionty).

Pufrační systém je efektivní v rozpětí přibližně dvou jednotek pH kolem jeho pK_a . Tzv. „dobré biologické pufrů“ (Good's buffers) jsou nejvhodnější, protože obsahují velké ionty a mohou být použity ve vysokých koncentracích. Jejich nevýhodou je však to, že silně absorbují v UV světle. Mezi tyto pufrů patří např. Tris (Tris(hydroxymethyl)aminoethan), jehož systematický název je 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol), borátový pufr, histidin, CAPS (3-(cyklohexylamino)-propansulfonová kyselina) a jiné.⁶

1. 5. 7 Pufrová aditiva v CE

Přehled nejčastěji používaných aditiv je v tabulce 1.⁶

Tabulka 1: Přehled používaných aditiv v CE.

Aditivum	Příklad aditiva	Použití
surfaktant	SDS, CTAB, BRIJ, TWEEN	modifikace EOF, rozpouštění hydrofóbních látek v roztoku
obojetný ion	MES, Tris, CHAPS, CHAPSO	nízká vodivost
lineární hydrofilní polymer	methyl-celuloza, polyakrylamid, PEG, PVA	redukce EOF, minimalizace adsorpce vzorku na stěnu
organický modifikátor	methanol, acetonitril, TFA	redukce EOF
chirální selektor	cyklodextriny, crown-ethery, žlučové soli	chirální separace, rozpouštění hydrofóbních látek v roztoku
kovový ion	K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Li^+	ovlivnění migračního času a selektivity analytů v CE ⁷²
čínidlo rozrušující vodíkovou vazbu	močovina	rozpletení řetězců DNA, rozpouštění proteinů
komplexační pufr	borátový pufr	separace sacharidů a katecholu

1. 5. 7. 1 Surfaktanty

Surfaktanty, neboli povrchově aktivní látky, jsou nejvíce používaná aditiva v CE. Surfaktanty mohou být povahy kationtové, aniontové a neutrální. Interakce monomerní molekuly surfaktantu s analyzovaným roztokem mohou být dvojího typu. Jsou to

jednak iontové interakce s nabitým koncem surfaktantu a/nebo hydrofóbní interakce mezi alkylovými řetězci a hydrofóbní částí roztoku. Surfaktanty ovlivňují EOF. Jeho obrácení můžeme dosáhnout přidáním např. kationického surfaktantu - CTAB - (cetyltrimethylamonium bromidu) do základního pufru. Monomery CTAB tak adherují svými pozitivně nabitými konci na stěnu kapiláry, která má díky disociaci silanolových skupin negativní náboj. Výsledný celkový pozitivní náboj na stěně je důsledkem hydrofóbních interakcí volných alkylových konců molekul CTAB.⁶

1. 5. 7. 2 Chirální selektory

V praxi je často nutné provádět separace a analýzy chirálních látek, popř. racemických směsí.⁷³ U chromatografických technik se za tímto účelem používají velice nákladné kolony s chirální stacionární fází.⁷⁴ V CZE tyto kolony nejsou potřeba, analýzy chirálních látek probíhají v pufru s přídavkem různých aditiv umožňující jejich separaci. Nejčastějšími takovými aditivy jsou cyklodextriny, crown-ethery nebo komplexy aspartátu a měďnatých iontů. Analyt vytvoří s aditivem komplex na základě hydrofóbních interakcí s vnitřní nepolární částí molekuly aditiva. Vzniklý komplex bývá ještě stabilizován např. vodíkovou vazbou. Takto vzniklé komplexy lze pak na koloně oddělit a identifikovat.⁶

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. 1 Chemikálie

V průběhu optimalizace metody, identifikace a stanovení organických kyselin v moči byly používány tyto chemikálie (daných stupňů čistoty p.a.):

chlorid sodný (p.a.; Lachema n. p. Brno)

síran amonný (p.a.; PENTA)

kyselina mravenčí (99,7 %; Lachema n. p. Brno)

kyselina vinná – dihydrát sodné soli (99,5 %; Fluka)

kyselina jablečná (99 %; Fluka)

kyselina citronová – monosodná sůl (99 %; Aldrich)

kyselina jantarová (99,5 %; Fluka)

kyselina pyrohroznová (98 %; Fluka)

kyselina glykolová (99 %; Aldrich)

kyselina octová (99,5 %; Fluka)

kyselina mléčná (90 %; Fluka)

dihydrogenfosforečnan sodný - monohydrát (98 + ; Aldrich)

kyselina acetoctová (> 90 %; Fluka)

kyselina salicylová (čistá; Lachema n. p. Brno)

kyselina 3-hydroxybutanová (98 %; Aldrich)

kyselina asparagová (99 %; Fluka)

kyselina hippurová – hydrát sodné soli (99 %; Aldrich)

kyselina močová (98 %; Fluka)

acetonitril (99,9 %, Fluka)

hydroxyethylcelulóza (HEC; Sigma)

hexadimethrinbromid (polybren; 95 %; Aldrich)

2-morfolinoethansulfonová kyselina – monohydrát (MES; 99,5 %; Aldrich)

Tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris; 99 %; Fluka)

methanol (p.a.; PENTA)

polyethylenglykol 8 000 (PEG; čistý; Fluka)

hydroxid sodný (98 %; Fluka)

cetyltrimethylamonium bromid (CTAB; \geq 99 %; Fluka)

polyethylenglykol *p*-(1.1.3.3-tetramethylbutyl)-fenylether (TRITON X-100; Aldrich)
hydroxypropyl- β -cyklodextrin (HP- β -CD; Aldrich)
polyvinylalkohol (PVA: 99+; Aldrich)

Z pevných (popřípadě kapalných) substancí byly připraveny standardní roztoky kyselin a anorganických iontů o koncentracích 10 mmol/l, které byly použity pro identifikaci a kvantifikaci jednotlivých látek v moči.

Při optimalizaci metody byly testovány tyto separační pufrů:

- 60 mM MES/NaOH + 0,001% polybren (pH = 6,1)
- 20 mM MES/NaOH + 0,1% HEC + 0,001% polybren (pH = 6,1)
- 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB+ 10% CH₃OH (pH = 6,1)
- 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH + 0,2% TRITON X-100 (pH = 6,1)

Pro přípravu vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore, Bedford, USA). Zásobní roztoky pufrů a standardů byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C. Všechny roztoky separačních pufrů byly před elektroforetickou analýzou filtrovány přes 0,45 μ m membránový filtr (TESSEK, Česká republika).

2. 2 Přístroje a materiály

Všechna elektroforetická měření byla provedena na přístroji HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveném diod - array detektorem (DAD) a laboratorně vyrobeným bezkontaktním vodivostním detektorem (CCD). CCD byl zhotoven ve spolupráci s Katedrou fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy⁷⁵ a má tyto parametry: délka vodivostních elektrod 2 mm, detekční mezera 1,2 mm, frekvence střídavého signálu 1,8 MHz, amplituda střídavého signálu 50 V. DAD i CCD jsou umístěny společně se separační kapilárou v termostatované kazetě elektroforetického přístroje. Pozice detektorů vzhledem k separační kapiláře: CCD je umístěn ve vzdálenosti 77 cm od dávkovacího konce kapiláry a DAD ve vzdálenosti 82 cm.

Všechny elektroforetické separace byly provedeny s jednou křemennou kapilárou pokrytou vnější ochrannou vrstvou polyimidu (Composite Metal Services, UK) o celkové délce 90 cm, vnitřním průměru 75 μm a vnějším průměru 363 μm . Před každým použitím nového pufru byla kapilára nejdříve promyta po dobu 15 - 20 minut 0,1 M roztokem NaOH, poté deionizovanou vodou (10 minut) a nakonec pufrům (20 min). Mezi jednotlivými analýzami vzorků moči byla kapilára promývána roztokem NaOH (2 min), deionizovanou vodou (2 min) a pak pufrům (5 min). V případě potřeby navázání povrchově aktivní látky na stěnu kapiláry byl ponechán pufr v kapiláře po dobu 20 minut. Všechny analýzy byly prováděny při kontrolované teplotě 25 °C.

Vzorky byly dávkovány do kapiláry hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 3 - 30 s (konkrétní doby dávkování jsou uvedeny u jednotlivých elektroferogramů, viz výsledky a diskuse). Elektroforetická separace nízkomolekulárních kyselin byla prováděna při negativním napětí -15 až -30 kV (viz výsledky a diskuse); kdy jednotlivé kyseliny migrují jako aniony od dávkovacího konce kapiláry směrem k detektoru.

Pro měření a nastavení přesného pH roztoků jednotlivých pufrů byl používán pH metr (pMX 3000, Wissenschaft-lichen-Technischen-Werstätten, Germany).

2.3 Úprava vzorku moči pro CE analýzu

Přídavek acetonitrilu do vzorku biologického materiálu se používá jako deproteinizační činidlo,⁷⁶ aby se zabránilo adsorpci proteinů na stěnu kapiláry. V případě zdravé lidské moči, kdy nejsou poškozeny ledviny, není přítomen zánět či krvácení z močových cest nebo jiné poruchy související s proteinurií, se v moči nachází jen nepatrné procento bílkovin (do 0,15 g/24 hodin), a to převážně albuminu.⁴⁶ V tomto případě byl acetonitril přidáván za účelem elektroforetického zaostření v důsledku potlačení vodivosti zóny vzorku. Tímto jednoduchým způsobem lze zvýšit citlivost elektroforetického stanovení.²⁸ Tato metoda byla dříve použita např. při stanovení aminokyselin v krevní plazmě a alantoické tekutině – matricích, které obsahují vysokou koncentraci anorganických solí.

Vzorky moči získané od zdravých jedinců byly po odběru zamrazeny a dlouhodobě uchovávány při teplotě -20 °C. Po rozmražení bylo ke 100 μl moči přidáno 400 μl deionizované vody a 500 μl acetonitrilu. Takto upravený vzorek byl použit v CE analýze.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3. 1 *Optimalizace metody*

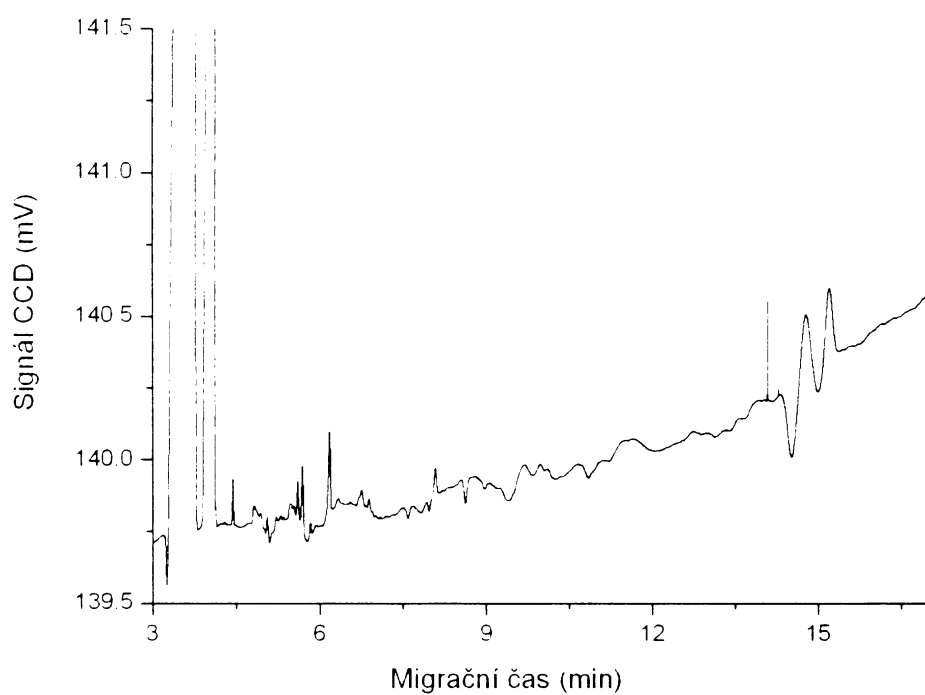
Prvním cílem této práce bylo nalezení optimálních separačních podmínek pro elektroforetické stanovení nízkomolekulárních organických kyselin ve vzorcích moči. Jako separační pufr byl použit MES/NaOH (pH 6,1). Tento pufr je často používán při CE stanovení kationů i anionů. MES je organická kyselina s nízkou hodnotou mobility a proto tento pufr vykazuje nízkou elektrickou vodivost. Z tohoto důvodu je možné provádět CE separaci při vysokých koncentracích pufru, aniž by docházelo k výraznému uvolňování nežádoucího Jouleova tepla, které by zničilo separaci. Při pH 6,1 jsou prakticky všechny sledované organické kyseliny plně disociovány (pK_A konstanty organických kyselin jsou v rozmezí 3 až 5) a v roztoku se vyskytují ve formě aniontů. CE stanovení anionu lze s výhodou provádět v negativním elektroforetickém módu s obrácenou polaritou (ve výstupní elektroforetické nádobce je anoda a ve vstupní katoda). Pro obrácení elektroosmotického toku byl v první fázi použit 0,001 % polybren.

Složení separačního pufru bylo optimalizováno studiem:

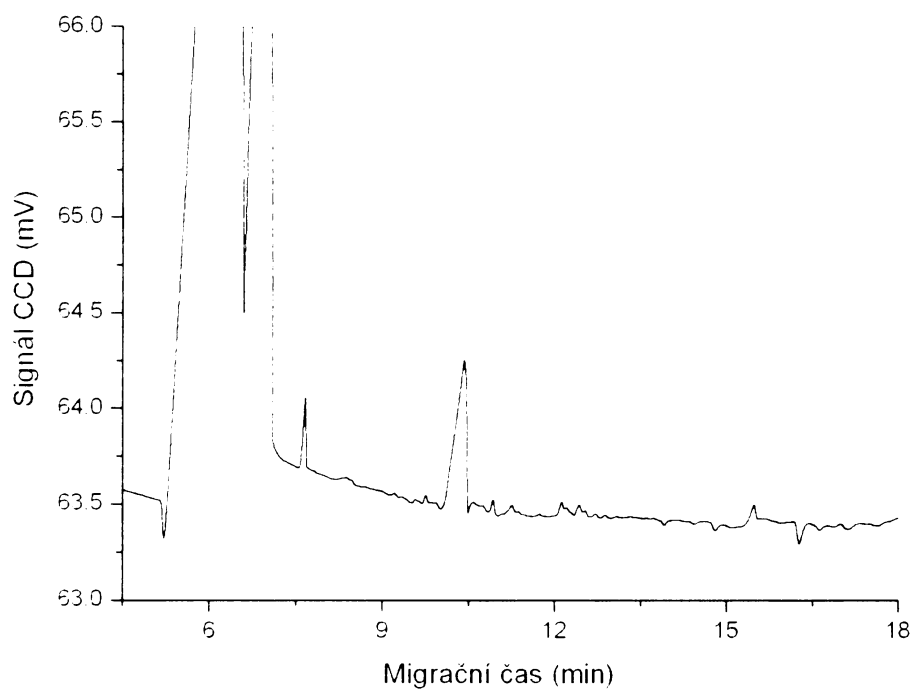
- a) vlivu koncentrace separačního pufru
- b) vlivu přídavku povrchově aktivní látky a organického rozpouštědla
- c) vlivu dávkovaného množství vzorku

a) Optimalizace koncentrace separačního pufru:

Při použití separačního pufru 60 mM MES/NaOH + 0,001% polybren (pH 6,1) základní linie CCD značně kolísá (viz obr. 5). Za těchto podmínek není možné odlišit píky analytu od vln na základní linii. Pro potlačení tohoto nežádoucího efektu byla snížena koncentrace MES na 20 mmol/l a do separačního pufru byl přidán neutrální hydrofilní polymer hydroxyethylcelulóza (HEC) (obr. 6). HEC se sorbuje na vnitřní povrch kapiláry, a tím potlačuje a stabilizuje elektroosmotický tok. Výsledkem je stabilizace odezvy CCD, která umožňuje identifikaci píků jednotlivých látek v moči.



Obrázek 5: Elektroferogram vzorku moče s CCD. Separační pufr: 60 mM MES/NaOH + 0,001% polybren (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování 250 mbar·s; separační napětí -30 kV.



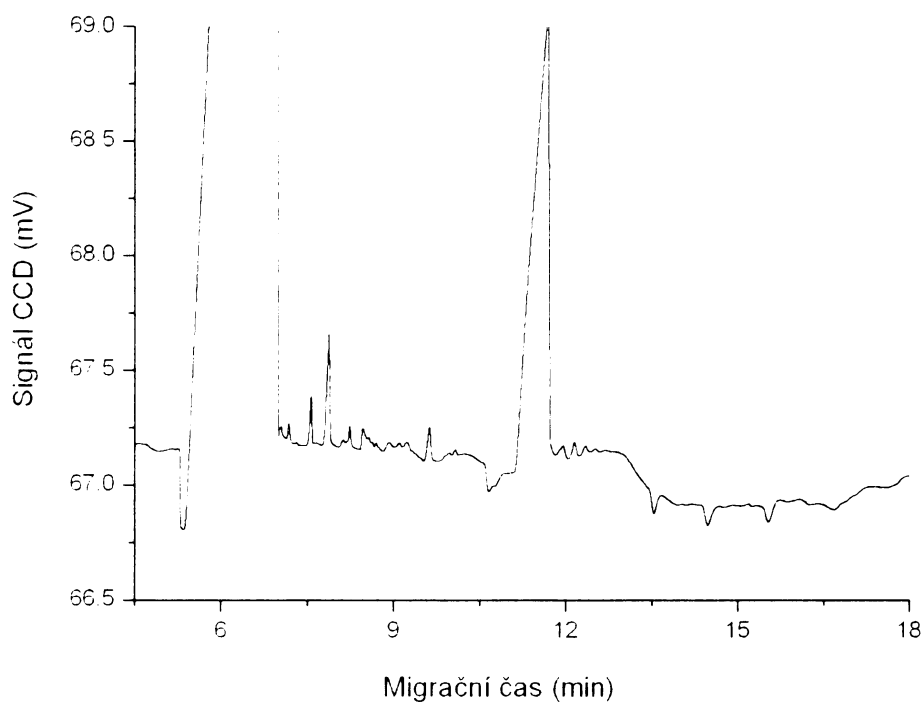
Obrázek 6: Elektroferogram vzorku moče s CCD. Separační pufr: 20 mM MES/NaOH + 0,1% HEC + 0,001% polybren (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování 250 mbar·s; separační napětí -20kV.

b) Vliv použité povrchově aktivní látky a přídavku organického rozpouštědla:

Kromě HEC byl testován jiný neutrální hydrofilní polymer polyethylenglykol (PEG), který podobně jako HEC potlačuje a stabilizuje elektroosmotický tok. Efekt HEC i PEG je velmi podobný a ve všech dalších experimentech byl používán výhradně PEG.

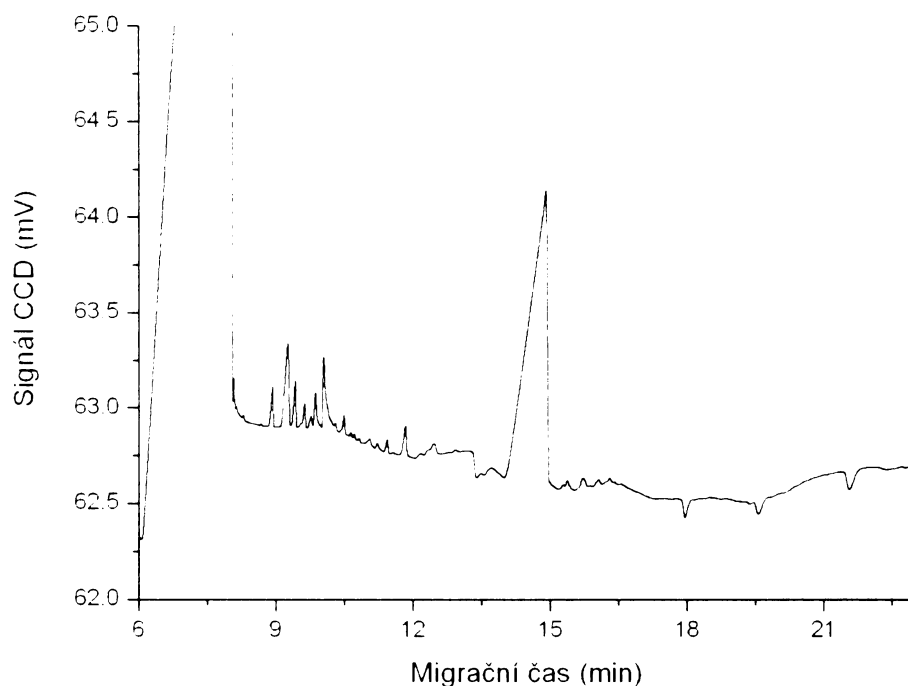
Kationogenní povrchově aktivní látka polybren, která obrací elektroosmotický tok, byla nahrazena cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB). 0,1 mM roztok CTAB účinně a reprodukovatelně obrací elektroosmotický tok, jak je patrné z obr. 7.

Pro lepší oddělení jednotlivých látek v moči byl do separačního pufru přidáván methanol v koncentraci 10%. Přídavek methanolu potlačí vodivost separačního pufru a tím se prodlouží migrační časy jednotlivých kyselin. Konečným důsledkem je lepší oddělení jednotlivých složek moči (viz obr. 7).



Obrázek 7: Elektroferogram vzorku moče s CCD. Separační pufr : 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování 1000 mbar.s; separační napětí -30 kV.

Další zlepšení stability základní linie CCD přinesl přídavek povrchově aktivní látky TRITON X-100 v množství 0,2% do separačního pufru. Na obrázku 8 jsou patrné ostré piky jednotlivých kyselin přítomných v moči a tento optimalizovaný separační elektrolyt byl používán při všech dalších analýzách uváděných v této práci.

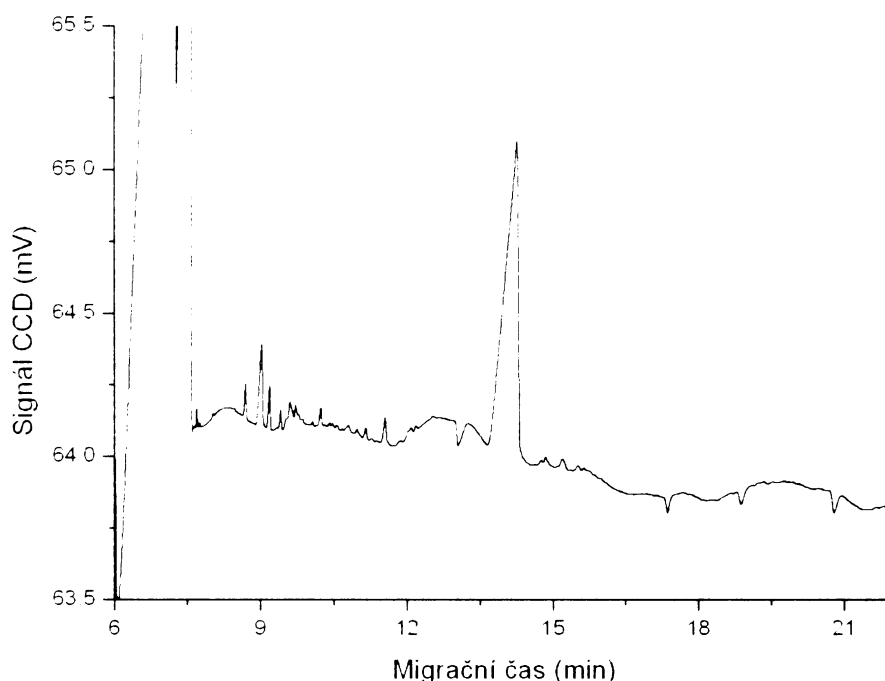


Obrázek 8: Elektroferogram vzorku moče s CCD. Separační pufr: 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH + 0,2% TRITON X-100 (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování 1000 mbar·s; separační napětí -30 kV.

c) Vliv dávkovaného množství vzorku:

Optimalizace metody byla dokončena úpravou dávkovaného množství vzorku do kapiláry. Dávkované množství vzorku bylo sníženo z původních 1000 mbar·s (viz obr. 8) na 500 mbar·s (obr. 9). Při nižším dávkování jsou zóny jednotlivých kyselin kratší a snáze od sebe oddělitelné, což se projeví lepší elektroforetickou separací.

Další pokusy o optimalizaci již nebyly příliš úspěšné, např. zvýšení koncentrace acetonitrilu při přípravě vzorku, přidávání cyklodextrinu do pufru nebo přídavek polyvinylalkoholu (PVA) do pufru za účelem ovlivnění EOF.



Obrázek 9: Elektroferogram vzorku moče s CCD. Separační pufr: 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH + 0,2% TRITON X-100 (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování 500 mbar·s; separační napětí -30kV.

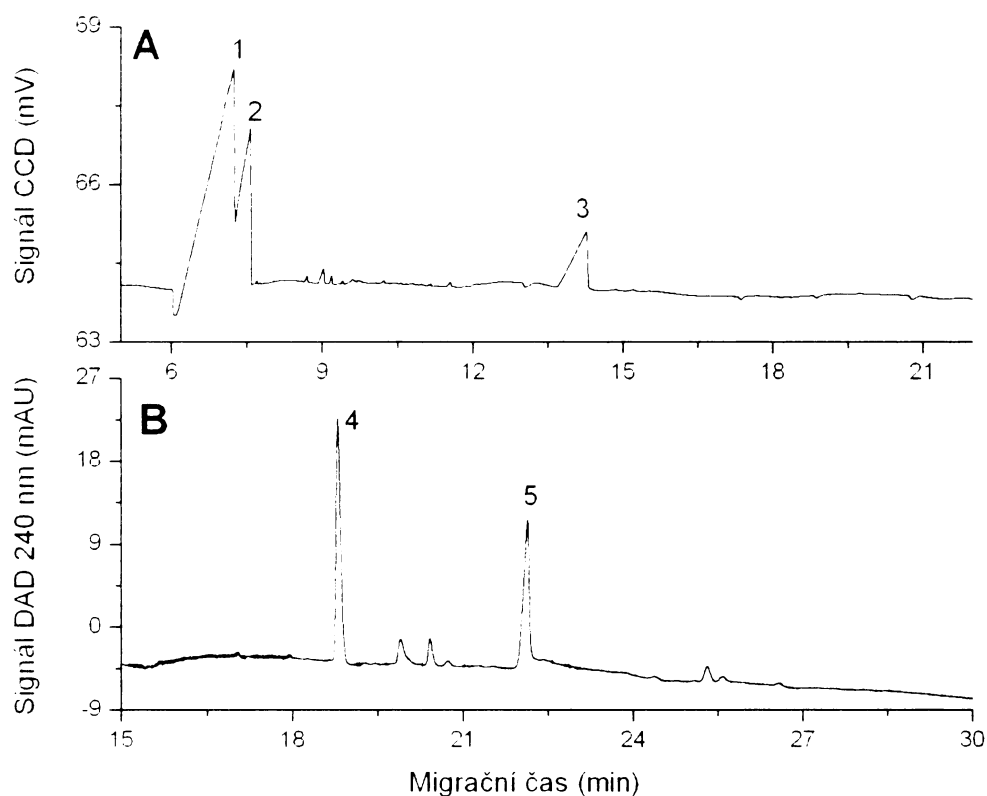
Výsledné experimentální podmínky pro elektroforetickou separaci

nízkomolekulárních kyselin v moči s CCD jsou:

- 1. separační pufr: 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH + 0,2% TRITON X-100 (pH = 6,1)**
- 2. dávkování vzorku: tlakem 50 mbar po dobu 10 s (500 mbar·s)**
- 3. separační napětí: -30 kV**
- 4. úprava vzorku moče: 100 µl moče smícháno s 400 µl vody a 500 µl acetonitrilu.**

3. 2 Identifikace organických kyselin v moči

Identifikace organických kyselin ve vzorku moči byla provedena postupným přidáváním 10 mM roztoků standardů jednotlivých kyselin k vzorku upravené moči v množství 2 až 5 µl. Z nárůstu výšky píku byly identifikovány jednotlivé kyseliny. Detekce byla prováděna současně pomocí CCD detektoru a DAD detektoru při 240 nm. Záznamy z obou detektorů jsou na obrázku 10.

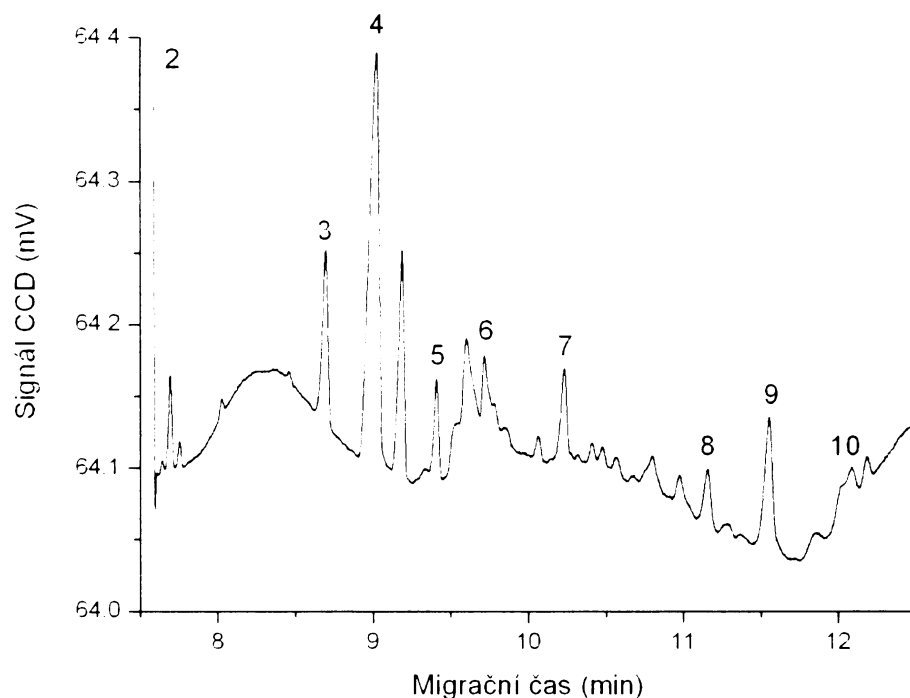


Obrázek 10: CE analýza vzorku moče s CCD (A) a DAD při 240 nm (B). Experimentální podmínky: separační pufr 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH + 0,2% TRITON X-100 (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování vzorku 500 mbar·s; separační napětí -30 kV. Vzorek moče 10× zředěn v 50% acetonitrilu. Identifikace piků: 1 - chloridy; 2 - oxalát; 3 – laktát; 4 – hippurát; 5 – urát.

Na obrázku 10 je znázorněn kompletní elektroferogram vzorku moči s CCD i DAD při vlnové délce 240 nm. Na záznamu z CCD jsou označeny píky majoritních složek moči: chloridy, oxalát a laktát. Bylo zjištěno, že pík laktátu zahrnuje i fosforečnanů a acetoacetát, protože mají podobnou mobilitu jako laktát při zvolených experimentálních podmínkách. Koncentrace fosforečnanů i acetoacetátu v moči je ovšem zanedbatelná vzhledem k výskytu laktátu. Přítomnost chloridů je zcela běžná ve všech vzorcích moči a plazmy.

Ze záznamu DAD při vlnové délce 240 nm (obr. 10 B) lze dobře identifikovat kyselinu hippurovou a kyselinu močovou. Tyto dvě kyseliny silně absorbují v UV oblasti spektra a DAD je pro ně vhodnější detekční technikou než univerzální detekce vodivostní.

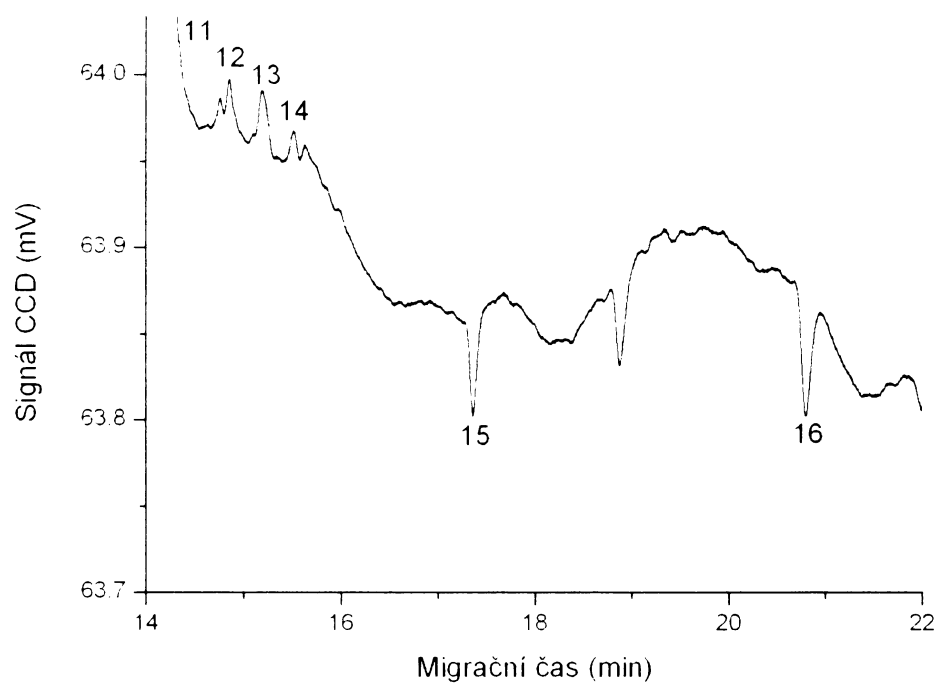
V detailním záznamu z CCD lze ovšem identifikovat nejen majoritní anionty moči, ale celou řadu dalších biochemicky důležitých látek. Na obrázku 11 je zvětšený úsek záznamu CCD (viz obr. 10 A) mezi píkem oxalátu a laktátu.



Obrázek 11: Detail elektroferogramu CE/CCD analýzy moče (obr. 10 A) mezi píkem oxalátu a laktátu. Experimentální podmínky shodné jako obr. 10. Identifikace píků: 2 - oxalát; 3 - formiát; 4 - tartarát; 5 - malát; 6 - citrát; 7 - sukcinát; 8 - pyruvát; 9 - glykolát; 10 - acetát.

V této oblasti se podařilo identifikovat dalších 8 kyselin: formiát, tartarát, malát, citrát, sukcinát, pyruvát, glykolát a acetát. V druhém detailním záznamu z CCD pořízeném za píkem laktátu (obr. 12) byly identifikovány tyto látky: salicylát, 3-hydroxybutyrát, aspartát, hippurát a urát.

Hippurát a urát poskytují v CCD záporné píky. Tento efekt je dán nízkou hodnotou mobility obou aniontů, která je nižší než mobilita koiontu separačního pufru MES. Anionty, které mají vyšší mobilitu než MES, poskytují v CCD pozitivní píky.



Obrázek 12: Detail elektroferogramu CE/CCD analýzy moče (obr. 10 A) za píkem laktátu. Experimentální podmínky shodné jako obr. 10. Identifikace píku: 11 - laktát; 12 - salicylát; 13 - hydroxybutyrát; 14 - aspartát; 15 - hippurát; 16 - urát.

3. 3 Kalibrační závislosti a limity detekce

Metoda kalibrační přímky je jedním z nejčastějších způsobů stanovení koncentrací analytu. Metoda je založena na sledování závislosti odezvy detektoru (plochy nebo výšky píku) na koncentraci dávkovaného analytu. Tuto závislost lze vyjádřit obecně platným vztahem:

$$S = a + b \cdot c^i,$$

kde S je signál detektoru měřený jako výška píku (v jednotkách [μV] pro CCD a v [mAU] pro DAD) nebo jako plocha píku (v jednotkách [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$] pro CCD a v [mAU $\cdot\text{s}$] pro DAD). Člen a je konstanta závislosti (tzv. intercept), který má tytéž jednotky jako signál S . b je citlivost, která může být určena z výšky píku v jednotkách [$\mu\text{V}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$] nebo z jeho plochy v jednotkách [$\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$]. i je faktor linearity a c je koncentrace analytu [$\mu\text{mol l}$]. Faktor linearity i je směrnice závislosti $\log(S - a)$, která je vynášena proti $\log c$.

Lineární dynamický rozsah (LDR) je oblast koncentrací, kde je signál detektoru lineárně závislý na koncentraci analytu. Pro tuto oblast platí: $0,98 < i < 1,02$.

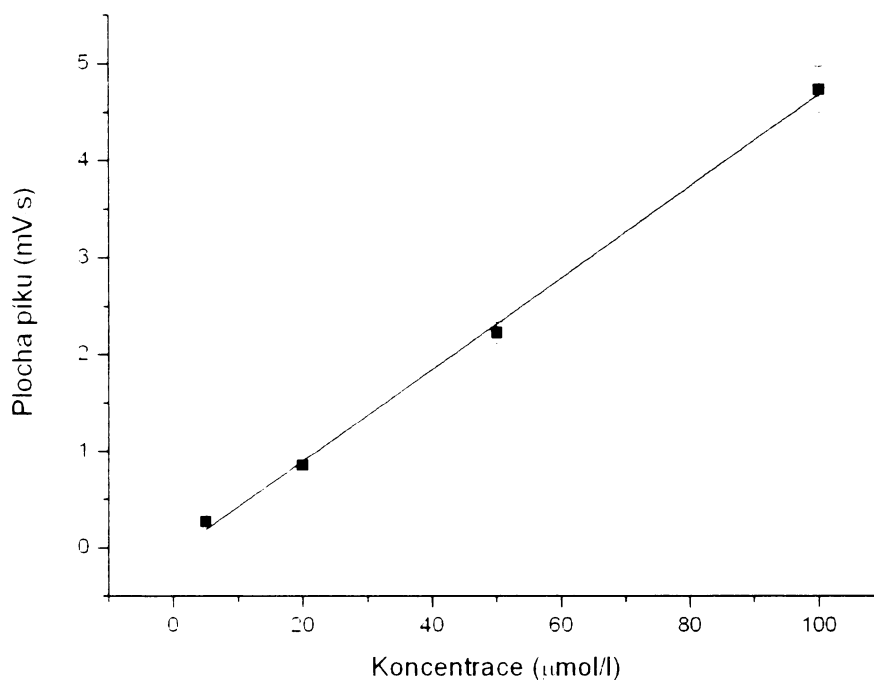
Limit detekce (LOD) je taková koncentrace látky, která je statisticky významně odlišná od šumu detektoru. V praxi se vyjadřuje jako koncentrace látky, která odpovídá trojnásobku šumu základní linie detektoru. Limit detekce se vypočítá ze vztahu $LOD = 3 \cdot \text{šum} / b$, kde b je citlivost určená z výšky píku.

Limit stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší koncentrace látky, kterou jsme schopni určit s dostatečnou přesností umožňující kvantitativní vyhodnocení. V praxi se vyjadřuje jako desetinásobek šumu základní linie. LOQ byl vypočítán ze vztahu $LOQ = 10 \cdot \text{šum} / b$, kde b je citlivost určená z výšky píku. LOD i LOQ byly stanoveny ze závislosti výšky píku na koncentraci stanovovaného analytu. Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé kyseliny jsou uvedeny v tabulce 3.

Kalibrační závislosti byly graficky zpracovány a statisticky vyhodnoceny pomocí programu Origin. Ukázka kalibrační závislosti pro plochu píku na koncentraci sukcinátu je na obrázku 13 a příslušná závislost pro výšku píku je na obrázku 14 (obě závislosti vychází ze záznamu CCD). Závislost plochy píku na koncentraci sukcinátu lze v testovaném intervalu koncentrací 5 – 100 $\mu\text{mol/l}$ popsat rovnicí:

$$S [\mu\text{V}\cdot\text{s}] = 47,4 (1,4) \cdot c [\mu\text{mol/l}] - 54,3 (78,0)$$

s koeficientem determinace $R^2 = 0,997$. V závorkách jsou uvedeny hodnoty směrodatných odchylek.

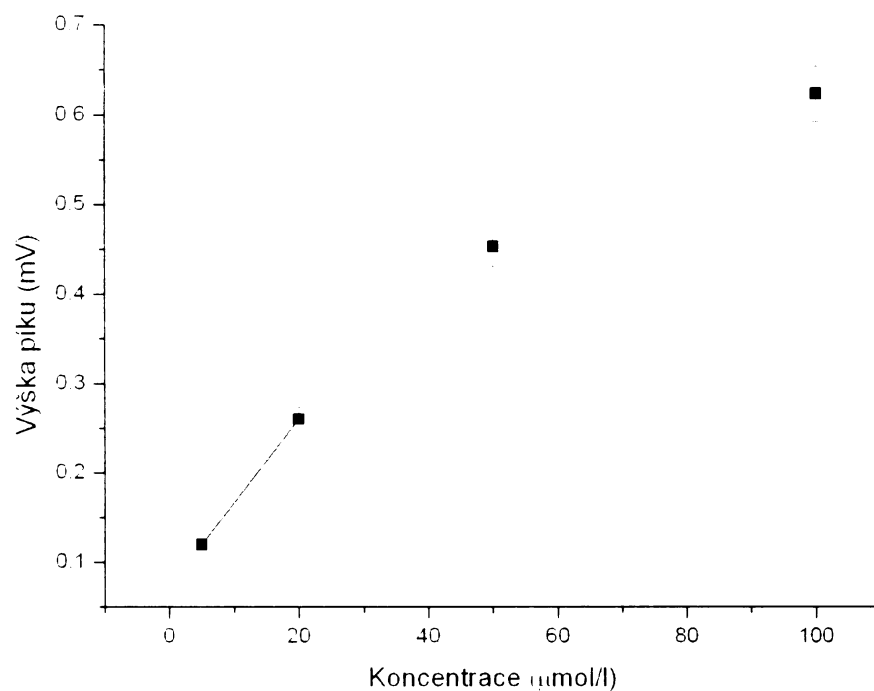


Obrázek 13: Závislost plochy píku na koncentraci sukcinátu pro CE/CCD analýzu. Experimentální podmínky viz popis obr. 10.

Závislost výšky píku na koncentraci sukcinátu lze v intervalu koncentrací 5 - 50 $\mu\text{mol/l}$ popsat vztahem:

$$S [\mu\text{V}] = 7,3 (0,7) \cdot c [\mu\text{mol/l}] + 96,1 (22,4)$$

s koeficientem determinace $R^2 = 0,981$. V závorkách jsou uvedeny hodnoty směrodatných odchylek.



Obrázek 14: Závislost výšky píku na koncentraci sukcinátu pro CE/CCD analýzu. Experimentální podmínky viz popis obr. 10.

Parametry kalibračních závislostí z CCD jsou pro všechny sledované látky shrnuty v tabulkách 2 a 3. Zatímco kalibrační závislosti určené z ploch píků jsou lineární v celém testovaném intervalu koncentrací (R^2 se pohybuje v rozmezí 0,991 - 0,999), tento závěr neplatí pro kalibrační závislosti výšek píků. Takzvané stáčení kalibrační závislosti pro výšku píku při vyšších koncentracích analytu je charakteristické pro kapilární elektroforézu a není způsobeno vlivem CCD. Důvodem tohoto stáčení je rozmývání zóny stanovované látky vlivem elektrodisperze. Z tohoto důvodu byl *LOD* a *LOQ* určován na základě kalibrační závislosti z úzkého intervalu koncentrace 5 – 20 μmol/l. Kalibrační závislosti pro ostatní anionty kyselin mají podobný průběh jako pro sukcinát a příslušné parametry těchto závislostí jsou shrnuty v tab. 2 a 3.

Tabulka 2: Parametry kalibračních závislostí ploch píků na koncentracích stanovovaných analytu v modelové směsi kyselin s použitím CCD. Hodnota šumu detektoru měla hodnotu 0.001 mV. Testované koncentrační rozmezí bylo 5 – 100 $\mu\text{mol/l}$ (5, 20, 50, 100 $\mu\text{mol/l}$); každá koncentrace byla měřena třikrát. V závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek. Experimentální podmínky viz obr. 10.

sloučenina	migrační čas [min]	LDR [$\mu\text{mol/l}$]	citlivost [$\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$]	úsek [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	R^2	i
oxalát	5,57	5 - 100	32,8 (1,1)	-13,5 (62,7)	0,997	1,01
formiát	6,46	20 - 100	26,8 (0,7)	129,2 (42,3)	0,999	0,98
tartarát	6,50	5 - 100	49,5 (1,3)	-59,1 (75,1)	0,998	1,00
malát	6,87	5 - 100	49,2 (0,8)	-70,8 (46,4)	0,999	1,00
citrát	7,11	20 - 100	53,0 (2,9)	-783,6 (189,7)	0,994	1,02
sukcinát	7,58	5 - 100	47,4 (1,4)	-54,3 (78,0)	0,997	1,00
pyruvát	8,30	5 - 50	7,1 (0,3)	5,5 (7,7)	0,998	0,98
glykolát	8,60	5 - 100	11,8 (0,6)	-33,1 (34,3)	0,992	1,01
acetát	9,14	20 - 100	20,9 (0,2)	144,5 (13,4)	0,999	0,98
laktát	9,97	20 - 100	16,4 (1,1)	-56,9 (73,6)	0,991	1,02
3-hydroxybutyrát	11,67	5 - 100	10,0 (0,1)	-2,6 (7,2)	0,999	0,99
aspartát	11,76	5 - 100	6,8 (0,1)	6,2 (7,9)	0,999	0,99
hippurát	13,33	20 - 100	-0,7 (0)	1,5 (2,1)	0,996	0,99
urát	15,79	20 - 100	-2,9 (0)	-4,2 (0,7)	0,999	1,01

Lineární dynamický rozsah je pro většinu stanovovaných analytů od 5 do 100 $\mu\text{mol/l}$, pro některé jen od 20 do 100 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty korelačního koeficientu R^2 jsou pro všechny analyty větší než 0,99. Z tabulky vyplývá, že citlivost jednotlivých stanovení je vyšší pro kyseliny s vyšší elektroforetickou pohyblivostí, např. oxalát nebo tartarát. Citlivost CCD také roste s nábojem stanovovaného iontu. Velký rozdíl je tak např. mezi oxalátem (32,8 $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$), aniontem kyseliny šťavelové, dvouhlíkaté dikarboxylové kyseliny, a hippurátem (0,7 $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$), aniontem kyseliny hippurové, která je jednosytná a má vyšší molekulovou hmotnost (poměr citlivostí 32,8/0,7 = 46,9).

Hippurát je tak aniontem, který má jednoznačně nejnižší citlivost stanovení v CCD detektoru.

Rozdíl v citlivostech je i u strukturně velice podobných, jednoduchých kyselin – mravenčí a octové. Citlivost stanovení formiátu ($26,8 \mu\text{V}\cdot\text{s}/\mu\text{mol}$) je vyšší, než citlivost stanovení méně pohyblivého acetátu ($20,9 \mu\text{V}\cdot\text{s}/\mu\text{mol}$); poměr jejich citlivostí je $26,8/20,9 = 1,3$.

Aniontem s nejvyšší citlivostí tak je citrát ($53,01 \mu\text{V}\cdot\text{s}/\mu\text{mol}$), aniont trikarboxylové kyseliny citronové.

Limity detekce a limity stanovení byly vyhodnoceny ze závislosti výšky piků na koncentraci jednotlivých kyselin, výsledky jsou uvedeny v tab. 3.

Tabulka 3: Parametry kalibračních závislostí výšek piků na koncentracích stanovovaných analytu v modelové směsi kyselin s použitím CCD. Hodnota šumu detektoru měla hodnotu 0.001 mV. Testované koncentrační rozmezí bylo 5 – 20 $\mu\text{mol/l}$ (pro citrát, hippurát a urát 20 - 50 $\mu\text{mol/l}$); každá koncentrace byla měřena třikrát. Experimentální podmínky viz obr. 10.

sloučenina	<i>LDR</i> [$\mu\text{mol/l}$]	citlivost [$\mu\text{V}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$]	úsek [μV]	<i>LOD</i> [$\mu\text{mol/l}$]	<i>LOQ</i> [$\mu\text{mol/l}$]
oxalát	5 - 20	21,7	58,3	0,1	0,3
formiát	5 - 20	5,1	147,3	0,6	2,0
tartarát	5 - 20	11,1	87,3	0,3	1,0
malát	5 - 20	13,3	53,3	0,2	0,7
citrát	20 - 50	16,7	-292,0	0,2	0,7
sukeinát	5 - 20	9,33	73,3	0,3	1,0
pyruvát	5 - 20	2,2	10,0	1,4	4,7
glykolát	5 - 20	3,87	1,67	0,8	2,7
acetát	5 - 20	1,1	141,7	2,8	9,3
laktát	5 - 20	1,1	76,7	2,8	9,3
3-hydroxy-butyrát	5 - 20	2,5	5,3	1,2	4,0
aspartát	5 - 20	1,7	6,3	1,7	5,7
hippurát	20 - 50	0,2	1,67	18,0	60,0
urát	20 - 50	0,5	1,0	6,0	20,0

Ze čtrnácti stanovovaných kyselin má limit detekce menší než 1 $\mu\text{mol/l}$ sedm kyselin, další 3 kyseliny mají limit detekce do 2 $\mu\text{mol/l}$ a 2 kyseliny do 3 $\mu\text{mol/l}$. Z těchto hodnot vybočují pouze hippurát a urát, jejichž limity detekce v CCD jsou výrazně vyšší. To je způsobeno vodivostí podobnou separačnímu pufru (MES), pro obě kyseliny je CCD málo citlivá.

V tabulce 4 jsou uvedeny parametry stanovení hippurátu a urátu pomocí DAD detektoru, detekce byla prováděna při 220 nm. Rozdíl v migračních časech získaných v CCD (viz tabulka 2) a DAD odpovídá umístění detektorů vzhledem ke kapiláře. CCD je umístěn jako první, 77 cm od dávkovacího konce, a DAD za ním 82 cm od dávkovacího konce.

Tabulka 4: Parametry závislosti ploch pík a výšek pík na koncentracích urátu a hippurátu v modelové směsi s použitím DAD (při 220 nm). Hodnota šumu detektoru měla hodnotu 0.07 mAU. Testované koncentrační rozmezí bylo 5 – 100 $\mu\text{mol/l}$ a 5 – 20 $\mu\text{mol/l}$; každá koncentrace byla měřena třikrát. V závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek. Experimentální podmínky viz obr. 10.

plocha píku						
sloučenina	migrační čas [min]	LDR [$\mu\text{mol/l}$]	citlivost [$\text{mAU}\cdot\text{s}/\mu\text{mol}$]	úsek [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	R^2	i
hippurát	14.60	5 - 100	74.7 (4.4)	609,0 (250,5)	0,989	0,98
urát	17.27	5 - 100	517.4 (2.2)	1440,2 (125,0)	0,999	0,99

výška píku						
sloučenina	migrační čas [min]	LDR [$\mu\text{mol/l}$]	citlivost [$\text{mAU}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$]	úsek [mAU]	LOD	LOQ
hippurát	14.60	5 – 20	0.2	0.07	1,2	4,0
urát	17.27	5 – 20	0.1	0.3	2,3	7,7

3. 3. 1 Srovnání detekčních parametrů urátu a hippurátu při současném použití CCD a DAD detekce

Kyseliny hippurová a močová obsahují ve své molekule chromofory odpovědné za jejich absorpci UV záření. Anionty těchto kyselin byly proto stanovovány také UV detekcí. Srovnání parametrů stanovením na CCD a DAD detektoru je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Parametry závislosti výšek píku na koncentracích stanovovaných analytů v modelové směsi s použitím CCD a DAD (při vlnové délce 220 nm). Hodnoty šumů detektorů byly pro DAD 0,07 mAU; pro CCD 0,001mV. Testované koncentrační rozmezí bylo 5 - 20 $\mu\text{mol/l}$ a 20 - 50 $\mu\text{mol/l}$; každá koncentrace byla měřena třikrát. Experimentální podmínky viz obr. 10.

CCD					
sloučenina	LDR [$\mu\text{mol/l}$]	citlivost [$\mu\text{V}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$]	úsek [μV]	LOD [$\mu\text{mol/l}$]	LOQ [$\mu\text{mol/l}$]
hippurát	20 - 50	0,2	1,67	18,0	60,0
urát	20 - 50	0,5	1,0	6,0	20,0
DAD (220 nm)					
sloučenina	LDR [$\mu\text{mol/l}$]	citlivost [mAU·l/ μmol]	úsek [mAU]	LOD [$\mu\text{mol/l}$]	LOQ [$\mu\text{mol/l}$]
hippurát	5 - 20	0,2	0,07	1,2	4,0
urát	5 - 20	0,1	0,3	2,3	7,7

V tabulce 5 jsou vidět rozdíly limitů detekce UV aktivních kyselin hippurové a močové, resp. jejich aniontů, na obou používaných detektorech, vodivostním a DAD. V případě hippurátu se limit detekce snížil z 18,0 $\mu\text{mol/l}$ pro CCD detektor na 1,2 $\mu\text{mol/l}$ v případě použití DAD detekce při 220 nm, to znamená až 15 \times . V případě urátu bylo snížení limitu detekce méně výrazné, limit detekce se snížil z 6,0 $\mu\text{mol/l}$ na 2,3 $\mu\text{mol/l}$, tedy přibližně 3 \times . Lze tedy shrnout, že pro hippurát a urát je CCD málo citlivá, jelikož tyto anionty kyselin mají podobné mobility s kyselinou MES jako složkou pufru.

Použití duální detekce tedy umožňuje současné stanovení neabsorbujících kyselin, pro které je citlivá vodivostní detekce, i látek absorbujících (hippurát a urát), které poskytují signál v DAD se srovnatelnými limity detekce a vyšší citlivostí spolu

s ostatními organickými kyselinami. Při použití pouze CCD detekce by to nebylo možné.

3. 4 Stanovení kyselin ve vzorku moči

S využitím změřených kalibračních křivek byla stanovena koncentrace organických kyselin v reálném vzorku moči. Vyhodnocení ploch piků bylo provedeno pomocí softwaru ChemStation. Zde je uveden příklad výpočtu koncentrace formiátu:

$$c = \frac{S - a}{b} = \frac{300 [\mu V \cdot s] - 129 [\mu V \cdot s]}{26,8 [\mu V \cdot s \cdot l / \mu mol]} = 6,4 \mu mol / l$$

Výsledky jsou shrnuty v tab. 6. Stanovení koncentrací kyselin bylo provedeno v náhodném vzorku moči získaném jednorázovým odběrem. V praxi se organické kyseliny stanovují ve 24 hodinových sběrech moči a určuje se jejich celková denní produkce. Důvod sběru je opodstatněný v řadě případů, kdy se exkrece analytu v průběhu dne mění, řídí se tzv. diurnálním rytmem.⁷⁷ Často jsou také hodnoty kyselin v moči přepočítávány na 1 mmol kreatininu, chybí-li sběr moči nebo pokud je u nasbírané moči podezření na nedostatečné ledvinové funkce.^{46, 78} Z těchto důvodů je stanovení kyselin provedené v této práci pouze orientační, bylo uskutečněno za účelem ověření použitelnosti vyvinuté metody. Tato práce je pilotní částí rozsáhlejšího projektu, stanovení kyselin využitelné v klinické praxi bude součástí navazujících prací.

Pro stanovení urátu a hippurátu byly využity kalibrační křivky získané pomocí DAD detektoru (při 220 nm), který vykázal větší citlivost a nižší limit detekce a stanovitelnosti. Výsledky byly získány analogickým postupem jako v předchozím případě, výsledky uvádí tab. 6.

Tabulka 6: Stanovené hodnoty koncentrací organických kyselin ve vzorku moči s použitím CCD. Hodnoty koncentrací urátu a hippurátu s použitím DAD (při 220nm). Experimentální podmínky viz obr. 10.

CCD				
sloučenina	S [mV·s]	c_{vzorek} [μmol/l]	c_{moč} [μmol/l]	c_{moč} [mmol/l]
oxalát	42,55	1298	12 980	12,98
formiát	0,30	16	160	0,16
tartarát	1,23	26	260	0,26
malát	0,15	4	40	0,04
citrát	0,13	17	170	0,17
sukcinát	0,16	5	50	0,05
pyruvát	0,12	18	180	0,18
glykolát	0,34	32	320	0,32
acetát	0,08	11	110	0,11
laktát	19,91	1220	12 200	12,20
3-hydroxy-butyrate	0,22	22	220	0,22
aspartát	0,07	11	110	0,11
DAD (při 220 nm)				
sloučenina	S [mAU·s]	c_{vzorek} [μmol/l]	c_{moč} [μmol/l]	c_{moč} [mmol/l]
hippurát	149,46	929	9 290	9,29
urát	128,83	1503	15 030	15,03

4 ZÁVĚR

- Podařilo se optimalizovat metodu pro stanovení daných organických kyselin ve vzorcích moči. Nejlepší elektroforetické separace s CCD bylo dosaženo za těchto experimentálních podmínek: separační pufr 20 mM MES/NaOH + 2% PEG 8 000 + 0,1 mM CTAB + 10% CH₃OH + 0,2% TRITON X-100 (pH = 6,1); hydrodynamické dávkování vzorku 500 mbar·s; separační napětí -30 kV. Vzorek moče byl 10× zředěn v 50% acetonitrilu.
- Ve vzorku moči se podařilo identifikovat tyto anionty kyselin: oxalát, formiát, tartarát, malát, citrát, sukcinát, pyruvát, glykolát, acetát, laktát, salicylát, 3-hydroxybutyrát, aspartát, hippurát a urát.
- Pro uvedené kyseliny byly naměřeny kalibrační závislosti ploch resp. výšek píků na koncentraci příslušného analytu. Pro získání kalibračních závislostí ke stanovení koncentrace byly využity závislosti ploch píků na koncentraci. Pro každou kyselinu byla určena citlivost stanovení a úsek na ose *y* včetně standardních odchylek, hodnota korelačního koeficientu R^2 , lineární dynamický rozsah a faktor linearit *i*. Ze závislostí výšek píků na koncentraci byl dále pro každou kyselinu určen limit detekce a limit stanovitelnosti.
- *LOD* z CCD se pohybují v rozmezí 0,1 – 2,8 μmol/l s výjimkou hippurátu (18,0 μmol/l) a urátu (6,0 μmol/l).
- Bylo zjištěno, že pro stanovení hippurátu a urátu je vhodnější využití DAD detektoru, který je pro tyto analyty výrazně citlivější a umožňuje nižší limit detekce (*LOD* pro hippurát 1,2 μmol/l a urát 2,3 μmol/l) a stanovitelnosti než CCD.
- Duální detekce tak umožňuje současné stanovení neabsorbujících organických kyselin pomocí CCD a absorbujících kyselin pomocí DAD v jedné elektroforetické analýze.
- Bylo provedeno orientační stanovení kyselin v reálném vzorku moči.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vesterberg, O.: *Electrophoresis* **14**, 1243 (1993).
2. Gaš, B.: *Vesmír* **80**, 370 (2001).
3. Isaaq, H. J.: *Electrophoresis* **21**, 1921 (2000).
4. Lehmann, R.; Voelter, W.; Liebich, H. M.: *J. Chromatogr. B* **697**, 3 (1997).
5. Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava, nakl. Pavel Klouda 2003.
6. Heiger, D.: *High performance capillary electrophoresis*. Německo, Agilent Technologies 2000.
7. Tůma, P.; Samcová, E.: *Časopis lékařů českých* **146**, 593 (2007).
8. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2003.
9. Shirao, M.; Furuta, R.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Fujita, S.; Maruyama, T.: *J.Chromatogr. A* **680**, 247 (1994).
10. Heiger, D.: *High performance capillary electrophoresis*. Německo, Agilent Technologies 2000, s. 52
11. Tůma, P.; Samcová, E.: *Chem. Listy* **101**, 200 (2007).
12. Schneede, J.; Mortensen, J. H.; Kvalheim, G.; Ueland, P. M.: *J.Chromatogr. A* **669**, 185 (1994).
13. Amankva, L. N.; Albin, M.; Kuhr, W.G.: *Trends Anal. Chem.* **11**, 114 (1992).
14. Zuriguél, V.; Caussé, E.; Bounéry, J. D.; Nouadje, G.; Siméon, N.; Nertz, M.; Salvayre, R.; Couderc, F.: *J. Chromatogr. A* **781**, 233 (1997).
15. Novotný, M.; Quaiserová-Mocko, V.; Wehrwein, E. A.; Kreulen, D. L.; Swain, G.M.: *J. Neurosci. Methods* **163**, 52 (2007).
16. Chu, Q. C.; Lin, M.; Geng, C. H.; Ye, J. N.: *Chromatographia* **65**, 179 (2007).
17. Kappes, T.; Hauser, P.C.: *Electroanalysis* **12**, 165 (2000).
18. Liu, J.; Yang, X.; Wang, E.: *Electrophoresis* **24**, 3131 (2003).
19. Li, J.; Zhao, F.; Ju, H.: *Analytica Chimica Acta* **575**, 57 (2006).
20. Klampf, Ch. W.; Katzmayer, M. U.; Buchberger, W.: *Electrophoresis* **19**, 2459 (1998).

21. Wu, N.; Peck, T. L.; Webb, A. G.; Magin, R. L.; Sweedler, J. V.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7929 (1994).
22. Wolters, A. M.; Jayawickrama, D. A.; Webb, A. G.; Sweedler, J. V.: *Anal. Chem.* **74**, 5550 (2002).
23. Brocke, A. V.; Nicholson, G.; Bayer, E.: *Electrophoresis* **22**, 1251 (2001).
24. Ahrer, W.; Scherwenk, E.; Buchberger, W.: *J. Chromatography A* **910**, 69 (2001).
25. Hilder, E. F.; Klampfl, Ch. W.; Buchberger, W.; Haddad, P. R.: *Electrophoresis* **23**, 414 (2002).
26. Kvasnička, F.; Voldřich, M.: *J. Chromatography A* **1103**, 145 (2006).
27. Gong, X. Y.; Hauser, P. C.: *Electrophoresis* **27**, 468 (2006).
28. Tůma, P.; Samcová, E.; Andělová, K.: *J. Chromatogr. B* **839**, 12 (2006).
29. Samcová, E.; Tůma, P.: *Electroanalysis* **18**, 152 (2006).
30. Zikmundová, J.; Tůma, P.; Opekar, F.: *J. Sep. Sci.* **31**, 353 (2008).
31. Tůma, P.; Samcová, E.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun* **73**, 187 (2008).
32. Carvalho, A. Z.; da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L.: *Electrophoresis* **24**, 2138 (2003).
33. Belin, G. K.; Krähenbühl, S.; Hauser, P. C.: *J. Chromatogr. B* **847**, 205 (2007).
34. Jáč, P.; Los, P.; Spáčil, Z.; Pospíšilová, M.; Polášek, M.: *Electrophoresis* **29**, 3511 (2008).
35. Schuchert-Shi, A.; Hauser, P. C.: *Analytical Biochemistry* **387**, 202 (2009).
36. Novotný, M.; Opekar, F.; Jelínek, I.; Štulík, K.: *Anal. Chim. Acta* **525**, 17 (2004).
37. Capote, F. P.; Rodríguez, J. M. L.; de Castro, M. D. L.: *J. Chromatogr. A* **1139**, 301 (2007).
38. Chicharro, M.; Bermejo, E.; Ongay, S.; Zapardiel, A.: *Electroanalysis* **20**, 534 (2008).
39. Tsukagoshi, K.; Sawanoi, K.; Nakajima R.: *J. Chromatogr. A* **1143**, 288 (2007).
40. Wikimedia foundation, Wikipedia, The Free Encyclopedia, Inborn error of metabolism. http://en.wikipedia.org/wiki/Metabolic_disorder [cit.22.4.2009].
41. Jariego, C. M.; Hernanz, A.: *Clin. Chem.* **42**, 477 (1996).
42. Zschocke, J.; Hoffmann, G. F.: *Vademecum metabolicum*. Manual of Metabolic Pediatrics. Milupa, Schattauer, 1999.

43. García, A.; Barbas, C.: *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 755 (2003).
44. Marklová, E.: *Strategie diagnostiky a léčby vrozených metabolických poruch s akutním průběhem*. http://www.lfhk.cuni.cz/detske/vmp/vmp_hypertext.htm [cit.27.4.2009]
45. García, A.; Coral, B.; Aguilar, R.; Castro, M.: *Clin. Chem.* **44**, 1905 (1998).
46. Racek, J. et al.: *Klinická biochemie*, Praha, Galén a Karolinum 1999.
47. Pears Health Cyber 2009, Databáze laboratorních hodnot. <http://www.ordinace.cz/laboratorni-hodnoty/150/> [cit.27.4.2009].
48. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVAEV.htm [cit.28.4.2009].
49. Kolektiv autorů (Sofrová, D.; Tichá, M.; Barthová, J.; Entlicher, G.; Stiborová, M.; Novák, F.; Hudeček, J.; Hladík, J.; Krajhanzl, A.): *Biochemie, základní kurz*. Praha, Karolinum 2005.
50. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJBJM.htm [cit.28.4.2009].
51. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/DAACF.htm [cit.28.4.2009].
52. Yeshvandra, B. V.; Rana, S. V. S.: *J. Ecophysiol. Occup. Health* **2**, 127 (2002).
53. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/_KOMP_200903170556PYRUVCR.htm [cit.28.4.2009].
54. Masopust, J.: *Klinická biochemie*, zdravcentra.cz <https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035> [cit.28.4.2009].
55. The Great Plains Laboratory. Health, metabolism & Nutrition. <http://www.greatplainslaboratory.com/home/eng/home.asp> [cit.28.4.2009].
56. Lord, R. S.; Burdette, Ch. K.; Bralley, J. A.: *Clin. Chem.* **51**, 672 (2005).
57. MedicaBaze.cz, lékařské repertorium online. http://www.medicabaze.cz/?sec=term_detail [cit.2.5.2009].
58. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6. http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/200920/hypertext/_KOMP_200903170556GLYCOLAT.htm#_TAB_U_GLYCOLAT_HVEZDA [cit.28.4.2009].

59. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6.
http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJAKP.htm [cit.28.4.2009].
60. Wikimedia foundation. Wikipedia. The Free Encyclopedia. *Kyselina mravenčí*.
61. Zentiva, k.s., zdravotna.cz.
https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_3314.html [cit.29.4.2009].
62. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6.
http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/200920/hypertext/_KOMP_2009031705563OHBUTYR.htm#_TAB_U_3OHBUTYR_HVEZDA [cit.28.4.2009].
63. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6.
http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/200920/hypertext/_KOMP_200903170556SUCC.htm [cit.29.4.2009].
64. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6.
http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/200920/hypertext/_KOMP_200903170556ACAC.htm#_TAB_U_ACAC_HVEZDA
65. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ISBN 80-238-9775-6.
http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/200920/hypertext/_KOMP_200903170556ASP.htm [cit.29.4.2009].
66. Vokurka, M.; Hugo, J. a kol.: *Velký lékařský slovník*. 5. vydání, Praha, v edici Jessenius vydal MAXDORF 2005.
67. Anderson, D. J.; Guo, B.; Xu, Y.; Ng, L. M.; Kricka, L. J.; Skogerboe, K. J.; Hage, D. S.; Schoeff, L.; Wang, J.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W.; Ward, K. M.; Davis, K. A.: *Anal. Chem.* **69**, 165 (1997).
68. Jabeen, R.; Payne, D.; Wiktorowicz, J.; Mohammad, A.; Petersen, J.: *Electrophoresis* **27**, 2413 (2006).
69. Shihabi, Z. K.: *J. Chromatogr. A* **807**, 27 (1998).
70. Pavlíková, L.; Brozmanová, H.; Kvasnička, F.; Grundmann, M.: *Klin. Farmakol. Farm.* **21**, 79 (2007).
71. Galli, V.; García, A.; Saavedra, L.; Barbas, C.: *Electrophoresis* **24**, 1951 (2003).
72. Chiari, M.; Dell'Orto, N.; Casella, L.: *J. Chromatogr. A* **745**, 93 (1996).
73. Chankvetadze, B.; Burjanadze, N.; Crommen, J.; Blaschke, G.: *Chromatographia* **53**, (Suppl.) 296 (2001).
74. Wätzig, H.; Günter, S.: *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 724 (2003).

75. Gaš, B.; Zuska, J.; Coufal, P.; van de Goor, T.: *Electrophoresis* **23**, 3520 (2000).
76. Shafaati, A.; Clark, Brian J.: *J. Pharm. Res.* **1**, 43 (2002).
77. Bořil, P.: *Laboratorní příručka, Přehled laboratorních vyšetření, referenčních mezí a doporučení*. Medicentrum Beroun s. r. o., biochemická laboratoř 2008.
78. Terán-García, M.; Ibarra, I.; Velázquez, A.: *Pediatr. Res.* **44**, 386 (1998).

6 PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni při vypracování této práce.

Na prvním místě tímto děkuji mému školiteli, Ing. RNDr. Petru Tůmovi, Ph.D., za zajímavé téma mé práce a za trpělivost, a kolektivu 3. LF UK Oddělení biochemie, buněčné a molekulární biologie, za ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Velké dík také patří mému příteli za odbornou pomoc s názvy a vzorci organických sloučenin a za velkou podporu v psaní mé diplomové práce.

Také bych velmi ráda poděkovala rodině, zvláště mým rodičům, nejen za povzbuzení a trpělivost, ale také za finanční podporu při mých tak dlouhých studiích.