

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Použití moderních analytických metod ke stanovení
biologicky aktivních látek**

Dizertační práce

Praha 2009

Alice Vránková

Prohlašuji, že všechny výsledky uvedené v dizertační práci jsou mé původní a publikaci jsem vypracovala samostatně. Relevantní literární prameny a informace, které jsem využila, jsou uvedeny v seznamu literatury. Uvedené výsledky jsem nepředložila k získání jiného akademického titulu.

Alice Vránková

Dizertaci jsem zpracovala v průběhu let 2001 až 2009. Výsledky v letech 2001 až 2004 jsem vypracovala na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Navazující experimentální práce probíhaly v laboratořích endokrinologie a metabolismu ÚKBLD a III. interní kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Ráda bych poděkovala všem, kdo podporovali moji snahu v průběhu zpracování této dizertační práce.

Zvláště děkuji svojí školitelce Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc., Prof. Ing. Karlovi Štulíkovi, DrSc., i ostatním členům katedry analytické chemie a rovněž svým kolegům z doktorského studia. Dále děkuji Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. z katedry biochemie PřF UK v Praze, Ing. Zdeňce Kučerové, CSc. z Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK v Praze a Mgr. Martinu Hrubému, Ph.D. z Ústavu Makromolekulární Chemie AV ČR v Praze.

Ráda bych také poděkovala svým současným kolegům, zaměstnancům III. interní kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, zejména děkuji všem zaměstnancům z laboratoří endokrinologie a metabolismu a lékařům z lůžkového oddělení B a C.

Všem moc děkuji za pomoc, ochotu, cenné rady, názory a připomínky.

Neméně děkuji svojí rodině a svým přátelům za podporu a povzbuzení.

Za finanční podporu děkujeme Grantové Agentuře České Republiky, grant č. 303/01/1216, Ministerstvu zdravotnictví České Republiky, grant č. NR/8155-5 a výzkumným záměrům Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky MSM 0021620807 a MSM 0021620808.

Seznam symbolů a zkratk

A	adrenalin
A	analyt (biologicky aktivní látka)
[A]	koncentrace analytu (biologicky aktivní látky)
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
AMK	aminokyselina
A~L	komplex analytu (biologicky aktivní látky) s ligandem
[A~L]	koncentrace komplexu analytu (biologicky aktivní látky) s ligandem
BOC	butoxykarbonyl
C	koncentrace
C_m	koncentrace solutu v mobilní fázi
C_s	koncentrace solutu ve stacionární fázi
CEC	kapilární elektrochromatografie
CE-MS	kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií
CGE	kapilární gelová elektroforéza
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CT	počítačová tomografie
CV	koeficient variace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
D	dopamin
DEAE	diethylaminoethyl
DIT	3,5-dijod-L-tyrozin
DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
<i>E</i>	intenzita elektrického pole
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EHPEA	3-ethoxy-4-hydroxyfenylethanolamin
EIA	enzymoimunoanalýza
ELISA	enzymoimunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent
EOF	elektroosmotický tok

F	Faradayova konstanta
F_m	objemová průtoková rychlost
FEO	feochromocytom
FNMN	6-fluornormetanefrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-EC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC-FLD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HMBA	4-hydroxy-3-methoxybenzylamin
i	proud
$i(t)$	proud v čase t
i_0	proud v nulovém čase
I	migrační vzdálenost k detektoru
IS	vnitřní standard
K_d	disociační konstanta
K_D	distribuční konstanta
k	koeficient přenosu hmoty
L	ligand
[L]	koncentrace ligandu
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
M_r	relativní molekulová hmotnost
MAO	monoamin oxidáza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MF	mobilní fáze
MN	metanefrin
MRI	magnetická rezonance

3-MT	3-methoxytyramin
MTHF	methylenetetrahydrofolát
n	látkové množství
NA	noradrenalin
NMN	normetanefrin
pH	záporný dekadický logaritmus molární koncentrace vodíkových iontů
pI	izoelektrický bod
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PGL	paragangliom
PVA	polyvinyl alkohol
Q	náboj
RIA	radioimunoanalýza
R^2	koeficient determinace
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce pevnou fází
t	čas
t	migrační čas ligandu v elektrolytu v přítomnosti nenulové koncentrace receptoru
t_m	migrační čas markeru elektroosmotického toku v elektrolytu v přítomnosti nenulové koncentrace receptoru
t_{m0}	migrační čas markeru elektroosmotického toku v elektrolytu v přítomnosti nulové koncentrace receptoru
t_0	migrační čas ligandu v elektrolytu v přítomnosti nulové koncentrace receptoru
TFA	kyselina trifluoroctová
UV detektor	detektor měřící v ultrafialové oblasti spektra
VMA	kyselina vanilmandlová
z	počet elektronů
$\Delta \mu$	změna pohyblivosti ligandu v elektrolytu v přítomnosti receptoru
$\Delta \mu_{\max}$	maximální změna pohyblivosti ligandu v elektrolytu v přítomnosti receptoru při nekonečném zředění

Obsah

Úvod.....	8
Volba metody.....	8
Zvolené analytické metody.....	9
- Chromatografie.....	9
- Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	9
- Afinity chromatografie.....	10
- Spojení HPLC s elektrochemickou detekcí.....	13
- Coulometrický detektor.....	14
- Kapilární elektroforéza.....	17
- Kapilární zónová elektroforéza.....	17
- Afinity kapilární elektroforéza.....	18
Sledované analyty.....	19
Důvod pro stanovení analytů.....	24
Metody stanovení analytů.....	25
Příprava stacionárních fází pro afinity HPLC s vázaným DIT.....	26
Příprava kapilár pro afinity kapilární elektroforézu s vázaným DIT.....	27
Příprava vzorku plazmy pro HPLC-EC stanovení.....	27
Validace provedená při převodu metody HPLC-EC a kontrola způsobilosti této metody.....	29
Stanovení fyziologických a patologických koncentračních rozmezí metanefrinů v plazmě.....	30
Výsledky.....	31
Testování stacionárních fází pro afinity HPLC s vázaným DIT.....	31
Stanovení lidského pepsinu.....	32
Testování kapilár pro afinity kapilární elektroforézu s vázaným DIT.....	32
Stanovení disociační konstanty K_d komplexu prasečího pepsinu A s DIT.....	33

Prezentace a porovnání získaných validačních parametrů metody HPLC-EC s publikovanými daty.....	36
Prezentace a porovnání změřených koncentračních rozmezí metanefrinů v plazmě s publikovanými daty.....	37
Závěr.....	38
Literatura.....	39

Přiložené publikace

- [1] T. Vařilová, A. Vránková, V. Pacáková, M. Tichá, K. Štulík, J. Chromatigr. A 1084 (2005) 207.
- [2] A. Vránková, T. Škramlíková, J. Widimský jr., T. Zelinka, O. Petrák, R. Holaj, B. Štrauch, J. Rosa, J. Škrha, Z. Jůzová, Chem. Listy, přijato (práce přijatá redakcí, dosud nepublikovaná).
- [3] T. Zelinka, B. Štrauch, O. Petrák, R. Holaj, A. Vránková, et al., J. Hypertension 23 (2005) 2033.
- [4] R. Holaj, T. Zelinka, O. Petrák, B. Štrauch, D. Wichterle, A. Vránková, et al., J. Human Hypertension (2008) 1.
- [5] J. Widimský jr, T. Zelinka, O. Petrák, B. Štrauch, L. Šafařík, M. Kasalický, A. Vránková, R. Holaj, Vnitřní lékařství, 53:4 (2007) 428.

Úvod

Jak vyplývá z názvu této práce, předložená dizertace zahrnuje poměrně široké spektrum analytických technik. Společným rysem těchto technik je jejich využití ke stanovení biologicky aktivních látek. Všechny analyzované látky jsou přirozenou součástí těla savců a stanovení jejich patologických koncentrací hraje významnou roli v identifikaci určitých onemocnění [1,2]. Nesporný přínos stanovení těchto látek v medicíně je patrný z lékařských publikací uvedených v seznamu literatury [3–5].

Volba metody

Tématem této práce je využití metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), afinitní HPLC a afinitní kapilární elektroforézy (ACE) ke stanovení biologicky aktivních látek. Sledovanými analyty byly žaludeční enzymy pepsiny a plazmatické metanefriny.

Pro analýzu pepsinů byly vybrány afinitní HPLC a ACE. Techniky významně rozšiřují spektrum doposud užívaných metod [6–8]. V experimentech byla využita zvýšená afinita pepsinů k substrátům obsahujícím jodem substituované tyrozinové zbytky [9–11]. Této zvýšené afinity bylo využito k přípravě stacionárních fází pro afinitní HPLC a modifikovaných kapilár pro afinitní kapilární elektroforézu umožňujících selektivní adsorpci pepsinu.

Metodou zvolenou pro stanovení plazmatických metanefrinů byla HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-EC). Tato volba je méně nákladnou alternativou k používaným separačním technikám ve spojení s hmotnostní spektrometrií [12,13]. Coulometrický detektor použitý v této studii s unikátní konstrukcí měřících cel navíc zajišťuje detekci až 100 % dávkovaného analytu a tím nejvyšší možnou citlivost. Dále zaručuje vyšší selektivitu získanou použitím přídavných elektrochemických cel zařazených před analytickou celu. Tyto cely jsou schopné oxidovat (redukovat) složky, které by mohly koeluovat se stanovovanými látkami [14].

Zvolené analytické metody

Chromatografie

Během chromatografického stanovení dochází k rozdělení analyzovaných látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, a to pohyblivou – mobilní (MF) a nepohyblivou – stacionární (SF) na základě fyzikálně–chemických interakcí (např. adsorpce, rozpouštění, iontová výměna). Chromatografickým systémem protéká konstantní rychlostí MF, v níž jsou unášeny analyzované látky. Analyty z MF se pohybují podél SF umístěné v analytické koloně různou rychlostí, podle toho jak silně interagují se SF. Ty, které interagují silněji se pohybují pomaleji než ty, jejichž interakce jsou slabší. Míru interakce můžeme vyjádřit hodnotou rovnovážné nebo-li distribuční konstanty. Tímto způsobem dochází k rozdělení jednotlivých analytů na zóny složek.

$$K_D = C_s \cdot C_m^{-1}$$

K_D distribuční konstanta

C_s koncentrace solutu ve stacionární fázi

C_m koncentrace solutu v mobilní fázi

Více o chromatografii viz citace [15–17].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je použitelná pro separace velmi širokého spektra látek. Lze ji aplikovat na separace složitých směsí, látek netěkavých i teplotně nestabilních, látek rozdílné polaritě, nízko i vysokomolekulárních a iontů.

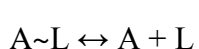
Vysoká účinnost metody je dosažena použitím malých, tvarově a velikostně pravidelných částic stacionární fáze. Průtok mobilní fáze systémem zajišťuje tlak o velikosti jednotek až desítek MPa. V konvenční HPLC se dávkuje velmi malá množství vzorků (řádově μl). Výhodou oproti plynové chromatografii je možnost ovlivnění separace složením mobilní fáze. Další výhodou metody je možnost využití pro preparativní účely.

Více o HPLC viz citace [15–18].

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je jedna z forem adsorpční chromatografie, pomocí níž může být sledována jakákoli molekula, která reaguje specificky a reversibilně s jinou molekulou (ligandem). Podstatou metody je tvorba stabilního a specifického komplexu mezi analytem a ligandem, nebo-li biologicky aktivní látkou a protilátkou. Ligandem může být látka vysokomolekulární i nízkomolekulární. Afinitní interakce jsou velmi silné. Patří sem např. vodíkové vazby, elektrostatické působení mezi analytem a ligandem nebo van der Waalsovy vazby [16]. Intenzitu afinitní interakce mezi oběma látkami lze vyjádřit pomocí disociační konstanty K_d . Optimální hodnota rovnovážné konstanty této interakce je udávána v rozmezí 10^{-8} – 10^{-4} mol·l⁻¹ [19,20].

Podmínkou je, aby vazebná interakce ligand–sledovaná bílkovina nebyla příliš slabá ani silná. Slabá vazba způsobuje snadnou eluci analytu, u velmi silné interakce může dojít k ireverzibilní vazbě v koloně.



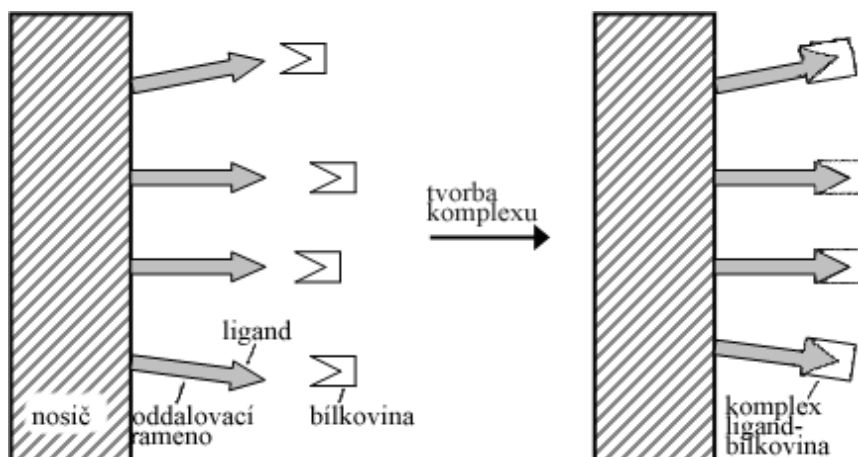
$$K_d = \frac{[A][L]}{[A \sim L]}$$

[A~L] koncentrace komplexu analytu s ligandem

[A] koncentrace analytu (biologicky aktivní látky)

[L] koncentrace ligandu

Při afinitní chromatografii je ligand imobilizovaný na vhodném chromatografickém nosiči.



Obr. 1. Tvorba specifického komplexu ligandu s bílkovinou

Nosiče pro afinitní chromatografii jsou komerčně dostupné a mohou obsahovat již navázaný ligand [21]. Pokud takové nosiče nejsou pro zamýšlenou aplikaci vyhovující, je možné zakoupit nosič pouze s aktivními funkčními skupinami, na které lze poté odpovídající ligand kovalentně navázat. Na komerčním trhu je rovněž možné získat nosič neaktivovaný a provést vlastní aktivaci. K aktivaci dochází navázáním požadovaných reaktivních funkčních skupin (např. bromkvanové, epoxy nebo divinylsulfonové skupiny) na funkční skupiny matrice. Až poté dojde k vazbě ligandu. Pro malé ligandy se často používá vazba na nosič přes delší řetězec funkčních skupin, tzv. oddalovací rameno. Tím se zabraňuje nežádoucím sterickým interakcím matrice s ligandem a také tím dochází k lepšímu zpřístupnění malého ligandu protilátce.

V případě přípravy vlastní SF je zapotřebí zvolit nosič, který splňuje určité požadavky. Matrice nosiče musí být např. chemicky a mechanicky stabilní, nesmí vykazovat tendenci k nespecifickým interakcím, musí být odolná vůči bakteriální kontaminaci a musí obsahovat velké množství aktivních míst pro vazbu ligandu.

Přehled nosičů	Příklad komerčního názvu	Stručný popis
<i>Přírodní matrice</i>		
Agarosa a její deriváty	Sepharosa	Dvě polysacharidové jednotky spojené glykosidickou vazbou
Celulosa		Lineární polysacharid složený z glukosových jednotek
Dextran	Sephadex, Superdex	Větvený polysacharid složený z glukosových jednotek
Silikagel		Na povrchu silikagelu jsou volné silanolové a siloxanové skupiny
Al ₂ O ₃ (alumina), TiO ₂ , Zr O ₂		Anorganické oxidy
<i>Syntetické matrice</i>		
Polyakrylamidové gely	Bio-Gel	Syntetické kopolymery na bázi akrylamidu
Methakryláty	HEMA, Toyopearl	HEMA: kopolymer 2-hydroxyethyl methakrylátu a ethylen dimethakrylátu Toyopearl: kopolymer oligoethylenglykolu, glycidylmethakrylátu a pentaerytrol-dimethakrylátu
Monolyty		Polymerace monomerů probíhá přímo v koloně (kompaktní vyplnění prostoru)
Vtištěné polymery		Polymerace monomerů v přítomnosti ligandu, který vytváří svůj „otisk“ a tím vazebný prostor pro ligand

Tab. 1. Přehled nosičů pro afinitní chromatografii

Po kovalentním navázání ligandu je důležité zablokovat nezreagované aktivní funkční skupiny nosiče, nebo-li všechny reaktivní funkční skupiny, na kterých není vázaný ligand. Blokaci aktivních míst je možné provést například navázáním glycinu nebo jiné nereaktivní látky, která neovlivňuje analýzu. Tím se omezí nežádoucí nespecifické interakce.

K určení množství kovalentně navázaného ligandu na nosiči se používá celá řada metod. Například pomocí elementární analýzy lze určit množství přítomného prvku, nejčastěji dusíku, síry nebo halogenu a tím i množství ligandu obsahujícího daný prvek.

Na začátku analýzy je nezbytné ustálit startovací podmínky, nebo-li promýt SF pomocí MF (startovacího pufru) a nechat ustálit základní linii. Poté může dojít k nadávkování vzorku. V mrtvém čase každé analýzy je detekován pík odpovídající látkám, které neinteragují s ligandem, a proto se na nosič neváží. Sledovaná látka, která je na nosiči afinitně vázaná, se do toku MF uvolní např. změnou pH nebo iontové síly pufru. Slabě vázané látky je možné eluovat izokraticky, většinou se však postupuje za pomoci gradientu. Strmost gradientu má vliv na šířku koncentračního profilu analytu, proto je nutné tento parametr optimalizovat [22].

Experimentální práce metodou afinitní chromatografie lze provádět v režimu HPLC, v klasickém nízkotlakém uspořádání nebo např. i vsádkově (viz výše) [23].

Spojení HPLC s elektrochemickou detekcí

V HPLC se k detekci analytů používá řada detektorů, mezi ně patří také elektrochemické detektory. Mohou být založené na měření elektrických vlastností roztoků, aniž by docházelo k chemické přeměně analytu (např. konduktometrie či vysokofrekvenční měření impedance) nebo se jedná o metody elektrolytické, při nichž k přeměně dochází (voltametrie, coulometrie, potenciometrie).

Detektory měřící elektrické vlastnosti roztoků bez jejich chemické přeměny jsou buď prakticky universální (impedanční cely), nebo alespoň reagují na rozsáhlé skupiny látek (konduktometrická měření s odezvou na veškeré elektricky nabitě složky roztoku). Oproti tomu detektory využívající elektrolýzy jsou selektivní (pro látky schopné elektrolytické přeměny) a měří elektrolytický proud (popř. napětí), který definovaným způsobem závisí na koncentraci sledovaného analytu. Podle podmínek měření se elektrolytické metody rozdělují na potenciostatické, kdy se měří při konstantním potenciálu pracovní elektrody a na metody ampérostatické, kdy měření probíhá za konstantního proudu.

Selektivní elektrochemická detekce je používána relativně často. Na rtuťové elektrodě, která je vhodná především pro oblast negativních potenciálů, se nejčastěji sleduje redukce analytů. Detektory, které mají pracovní elektrodu uhlíkovou, zlatou, stříbrnou, měděnou apod. a polarizují se především pozitivními potenciály, se uplatňují zejména při sledování oxidace látek. Zvláštní skupinu mohou tvořit elektrody vhodné jak pro oblast pozitivních, tak negativních potenciálů (např. diamantová). Nejširší uplatnění postupně získávají detektory coulometrické, které lze využít jak pro redukci, tak i pro oxidaci na pracovní elektrodě [17].

Podle běžně uznávané definice jsou elektrochemické detektory cely se speciální konstrukcí obsahující příslušný elektrodový systém. Voltametrické cely se používají při ampérometrických měřeních, pro měření coulometrická se používají speciální cely coulometrické (viz níže).

Ampérometrické detektory měří proud způsobený oxidací, nebo redukcí látky procházející detektorem. Tyto detektory většinou obsahují tuhé pracovní elektrody, zhotovené nejčastěji ze

skelného uhlíku, grafitových vláken, diamantu nebo např. z ušlechtilého kovu. Povrch těchto materiálů se postupně pasivuje produkty oxidace či redukce a nečistotami z MF nebo ze vzorku a vyžaduje čištění. Elektrochemické reakce probíhají jen v tenké vrstvě u povrchu elektrody a během pobytu zóny analytu v detekční cele přibližně 10 % z celkového množství analytu v MF dosáhne povrchu elektrody. Na druhou stranu je nutné uvést, že MF částečně odnáší z elektrodového povrchu zmíněné nečistoty či reakční produkty a tím je povrch neustále do určité míry obnovován a čištěn. Reprodukovatelnost měření je z tohoto důvodu po určitou dobu zachována, avšak elektrochemické nebo i mechanické čisticí postupy musí být periodicky opakovány. Citlivost elektrochemické reakce je limitována difúzí elektroaktivní látky k povrchu elektrody a rovněž rychlostí průtoku MF.

Selektivní elektrochemické detektory jsou velmi citlivé, mají velmi nízké meze detekce a široký lineární dynamický rozsah. Pořizovací náklady nejsou vysoké. Nevýhodou je závislost signálu na složení a rychlosti průtoku MF a tím omezené možnosti použití gradientu MF. Vyšší nároky jsou také kladeny na čistotu a důkladné odplynění MF. Tyto podmínky je nezbytné dodržet pro dosažení stabilní základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Použití elektrochemických detektorů je rovněž podmíněno vodivostí MF, s co nejnižším obsahem organické složky ve vodně – organických MF. Tím prakticky dochází k vyloučení použití těchto typů detektorů v normálních fázích. Další nevýhodou je možnost pasivace pracovní elektrody adsorpcí analytů nebo složek MF [20].

Coulometrický detektor

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k úplné oxidaci nebo redukci analytu při jeho průtoku měrnou celou. Předpokládá se, že na pracovní elektrodě probíhá jediná elektrochemická reakce se 100% proudovou účinností. Analyt v důsledku elektrolýzy kvantitativně zreaguje na této elektrodě. Podle Faradayových zákonů je množství látky vyloučené na elektrodě přímo úměrné elektrickému náboji, který prošel článkem.

$$Q = z n F$$

Q celkový přeměněný náboj [C]

z počet elektronů vyměněných při elektrodové reakci

n	látkové množství [mol]
F	Faradayova konstanta ($F = 96\,485,31 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Je-li proud zaznamenáván jako funkce času, lze celkový náboj rovněž vyjádřit takto:

$$Q = \int i \cdot dt = \text{plocha píku}$$

i	proud [A]
t	čas [s]

Za ustáleného stavu na pracovní elektrodě pak platí:

$$i = z F C F_m$$

C	koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$]
F_m	objemová rychlost MF [$\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}$]

Coulometrické detektory mohou pracovat potenciostaticky nebo ampérostaticky (coulometrické titrace).

Při potenciostatickém způsobu detekce dochází k oxidaci, nebo redukci analytu na pracovní elektrodě, jejíž potenciál je udržován konstantní vzhledem k referentní elektrodě. S úbytkem reaktantu na pracovní elektrodě dochází k exponenciálnímu poklesu proudu podle rovnice:

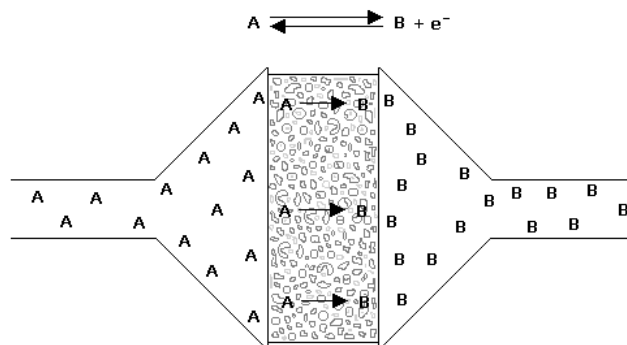
$$i(t) = i_0 \cdot 10^{-kt}$$

$i(t)$	proud v čase t
i_0	počáteční proud
k	koeficient přenosu hmoty

Z uvedeného je zřejmé, že mezi hodnotami proudu a koncentrací analyzované látky existuje přímá úměrnost. Velikost proudu se s rostoucím časem asymptoticky blíží k nule, které dosáhne v nekonečném čase. V praxi se elektrolýza ukončí, když proud dosáhne předem určené zanedbatelné hodnoty [24].

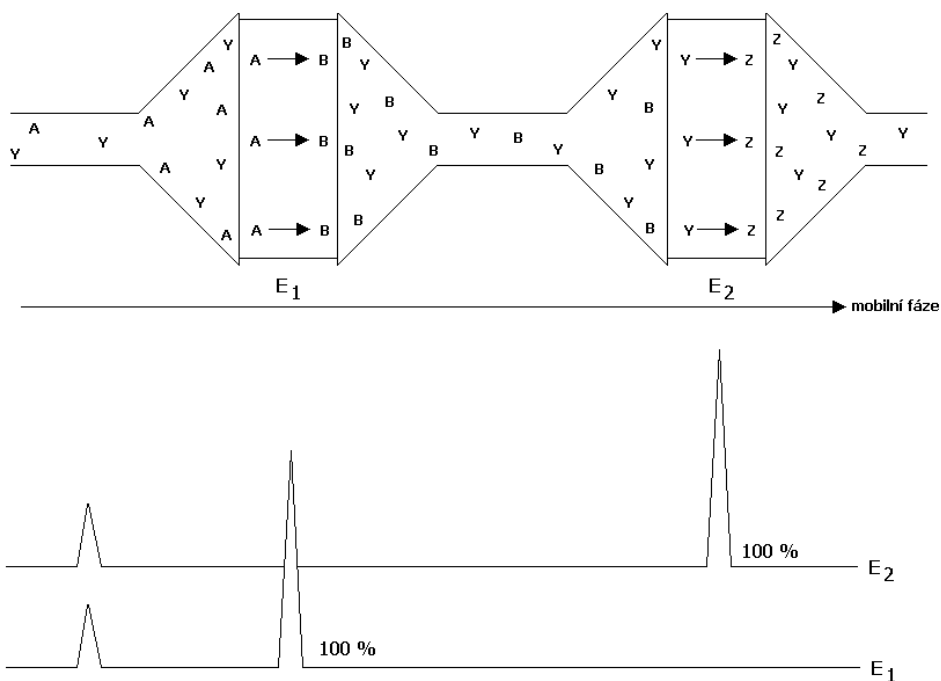
V porovnání s ampérometrickou měřicí celou, která může oxidovat nebo redukovat přibližně 0,1 – 15 % elektroaktivní látky, coulometrická cela je schopna prakticky úplné konverze analytu. Pokud je účinnost elektrochemické reakce zvýšena použitím elektrody fritového typu (např.

obr. 2), protéká MF porézní (např. grafitovou) pracovní elektrodou a oxidačně–redukční reakci na povrchu elektrody pak podléhá téměř 100 % reaktantu [14,25,26].



Obr. 2. Porézní grafitová pracovní elektroda fritového typu (firma Esa, Inc., USA) [27]

Další výhodou je možnost sériového zapojení několika pracovních elektrod při různých potenciálech. Na každé z elektrod pak může dojít ke kompletní elektrolyze elektroaktivních látek lišících se pólvalnovým potenciálem a tím k jejich rozlišení.



Obr. 3. Princip rozlišení dvou elektroaktivních látek lišících se pólvalnovým potenciálem [27]

K odstranění elektroaktivních interferencí z mobilní fáze lze využít předřazenou pomocnou („guarding“) celu. To je rovněž porézní grafitová elektroda, na kterou se vloží odpovídající napětí a která zajišťuje odstranění elektroaktivních nečistot před vstupem na analytickou celu [14,27].

Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza se řadí mezi kapilární elektromigrační separační metody, které jsou založené na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Separace probíhají v tenkých kapilárách (vnitřní průměr řádově desítky μm). Materiálem pro výrobu kapilár je převážně tavený oxid křemičitý. Miniaturizace separačního prostoru umožňuje provedení separací s velmi vysokou účinností, dovoluje dávkovat malá množství vzorku a zajišťuje rychlost analýz.

Společným názvem kapilární elektroforéza se označují metody kapilární zónová elektroforéza (CZE) a kapilární gelová elektroforéza (CGE), které umožňují separace iontů. Rovněž sem můžeme zařadit micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC) a kapilární elektrochromatografii (CEC), metody, které kromě iontů dovolují separaci neutrálních molekul [28,29].

Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je metoda vhodná pouze pro separaci iontů. Ionty se mohou lišit molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Během jedné analýzy lze separovat kladné i záporné ionty současně.

K rozdělení iontů uvnitř kapiláry dochází na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Elektroforetickou mobilitou rozumíme pohyb iontů v elektrickém poli, který je způsoben elektrostatickým přitahováním elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě.

Dalším transportním jevem probíhajícím v kapiláře je elektroosmotický tok separačního pufru EOF. Tento jev vzniká sledem několika událostí. Po naplnění křemenné kapiláry roztokem elektrolytu dochází k disociaci silanolových skupin na jejím vnitřním povrchu. Tím se vytváří záporně nabitá vrstva pokrývající tento povrch. Následnou adsorpcí vodíkových iontů z roztoku

na záporně nabitou vrstvu vzniká kladně nabitá vnější vrstva. Po vložení elektrického napětí dochází k pohybu vnější vrstvy spolu s molekulami vody ke katodě a tím i k proudění celého roztoku tímto směrem. Elektroosmotický tok unáší všechny ionty (kladné i záporné) k detektoru (ke katodě). Neutrální molekuly (částice bez náboje) se také pohybují pomocí EOF ke katodě, ale neseperují se. Ionty zároveň v roztoku migrují svými vlastními konstantními elektroforetickými rychlostmi a tím se separují [28,30].

Afinitní kapilární elektroforéza

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE) rovněž patří mezi kapilární elektromigrační separační metody. Je založena na specifickém rozpoznávání biologicky aktivních látek stejně jako afinitní chromatografie.

Existují dvě možnosti uspořádání ACE analýzy. V prvním případě reakce ligandu i receptoru probíhá v homogenním roztoku (CZE uspořádání). Principem této metody je tvorba komplexu mezi dvěma molekulami migrujícími uvnitř pufru různou elektroforetickou rychlostí. Elektroforetická mobilita vzniklého komplexu se liší od elektroforetických mobilit samostatných molekul.

Ve druhém případě je ligand nebo receptor imobilizovaný na stěně kapiláry, v gelu (CGE) nebo na chromatografickém nosiči (CEC). Tomuto typu uspořádání říkáme analýza založená na imobilizaci ligandu. Imobilizovaný ligand (receptor) selektivně interaguje s komplementárními molekulami.

Podle rychlosti rozpadu vzniklého komplexu rozdělujeme ACE analýzy v CZE uspořádání na dva druhy. V prvním z nich je rychlost rozpadu komplexu pomalá vzhledem k době analýzy a vzniklý komplex lze detegovat. Experiment pak nazýváme analýza rovnovážných směsí. Disociace vzniklého komplexu musí být v tomto případě zanedbatelná.

Rozpadá-li se komplex rychle, a proto jej detekovat nelze, hovoříme o analýze založené na změně mobilit [30]. Při tomto typu analýz dochází ke změnám v mobilitě analytu vzhledem k markeru elektroosmotického toku. Jako marker elektroosmózy se používá neutrální látka, která putuje k detektoru pouze rychlostí elektroosmotického toku a tím nám určuje jeho rychlost.

Intenzitu afinitní interakce komplexu lze také, stejně jako u afinitní chromatografie, vyjádřit disociační konstantou K_d [31].

Sledované analyty

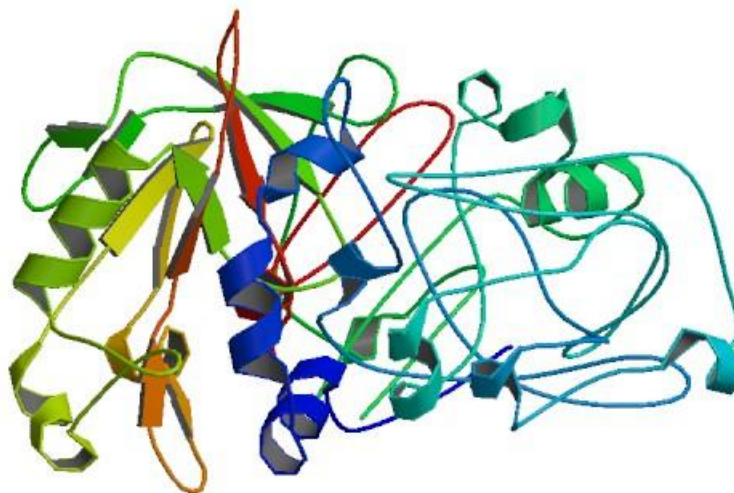
První skupinou sledovaných látek byly lidské a prasečí žaludeční enzymy pepsiny. Prasečí pepsiny byly využity jako modelové vzorky pro stanovení lidských pepsinů vzhledem k jejich velmi podobným vlastnostem (M_r , pI). Viz tab. 2, 3 a obr. 4.

Typ pepsinu	Lidský pepsin A	Prasečí pepsin A	Lidský pepsin C
Název celého proteinu	Pepsinogen A~prekurzor pepsinu A		Pepsinogen C~prekurzor gastriksinu
Označení proteinu	EC 3.4.23.1		EC 3.4.23.3
Relativní molekulová hmotnost M_r	34628,21	34622,99	35461,29
Izoelektrický bod pI	3,36	3,24	3,59

Tab. 2. Porovnání M_r a pI prasečího pepsinu A a lidského pepsinu A a C [32–34]

Aminokyselinová sekvence:	Signální peptid	Propeptid (aktivační peptid)	Pepsin A
Lidský pepsinogen A (388 AMK)	1–15	16–62	63–388
Prasečí pepsinogen A (385 AMK)	1–15	16–59	60–385
Lidský pepsinogen C (388 AMK)	1–16	17–59	60–388

Tab. 3. Porovnání délky aminokyselinového (AMK) řetězce prasečího pepsinogenu A, lidského pepsinogenu A, C a jednotlivých úseků jejich řetězce [32–34]

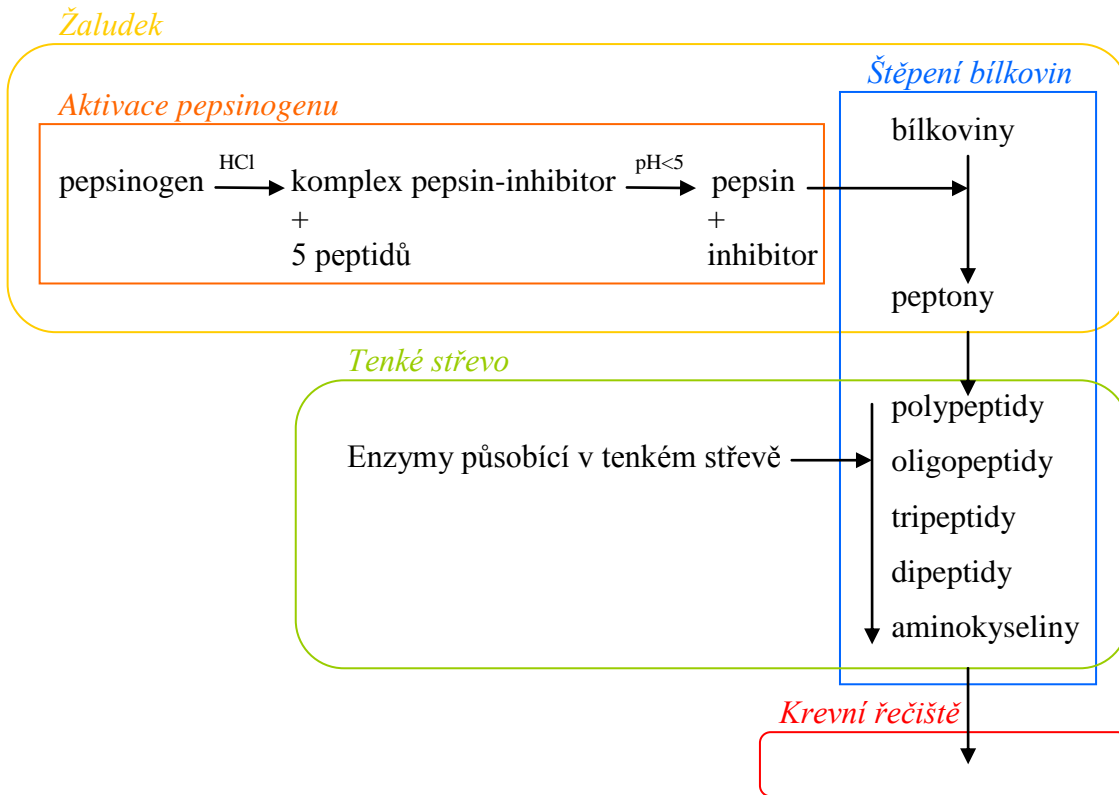


Obr. 4. Krystalová struktura prasečího pepsinogenu A (úsek řetězce AMK 16–385) [35]

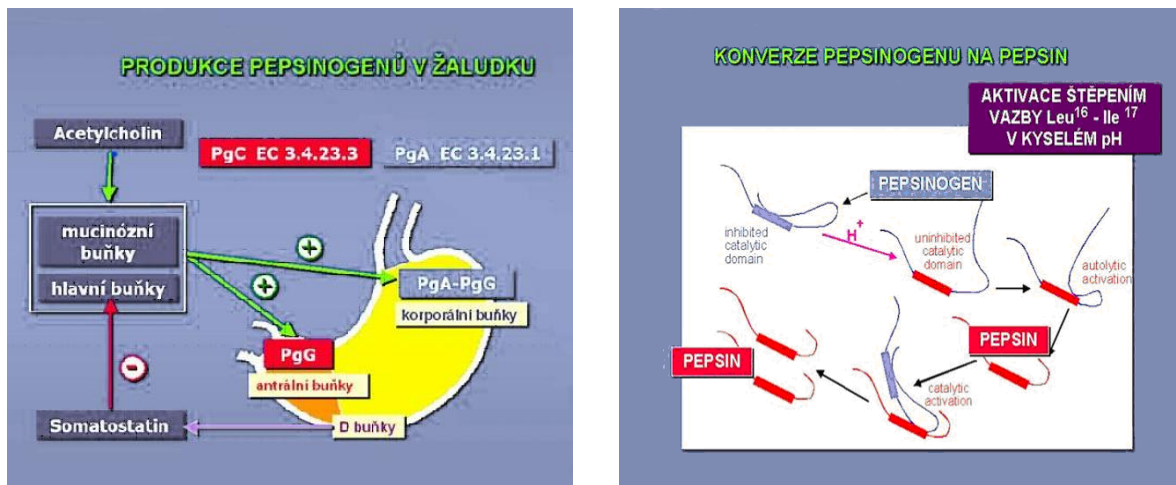
Pepsiny náleží mezi aspartátové proteasy (kyselé proteasy) s pH optimem v kyselé oblasti pH a jsou produkovány buňkami žaludeční sliznice obratlovců. Aspartátové proteasy se řadí mezi proteolytické enzymy, C-N hydrolázy, katalyzující hydrolytické štěpení proteinů [36].

Pepsin resp. pepsinogen je obecné označení pro řadu proteas (pepsin A, B, C – EC 3. 4. 23. 1, 2, 3) a jejich prekurzory (proenzymy). Aktivace pepsinogenu na pepsin probíhá v kyselém prostředí. V organismu k aktivaci dochází v žaludku, působením žaludečních kyselin. Zde působením pepsinu na bílkoviny vzniká směs peptidů obsahujících 3 – 30 aminokyselinových zbytků, které jsou následně dále odbourávány [37].

Je známo, že sekrece pepsinogenu probíhá paralelně se sekrecí žaludečních kyselin. Zároveň hladina pepsinogenu v moči a v séru u člověka odpovídá jeho hladině v žaludku. Tam je ovšem pepsinogen přítomen pouze ve formě pepsinu díky kyselému prostředí žaludečních šťáv [38].



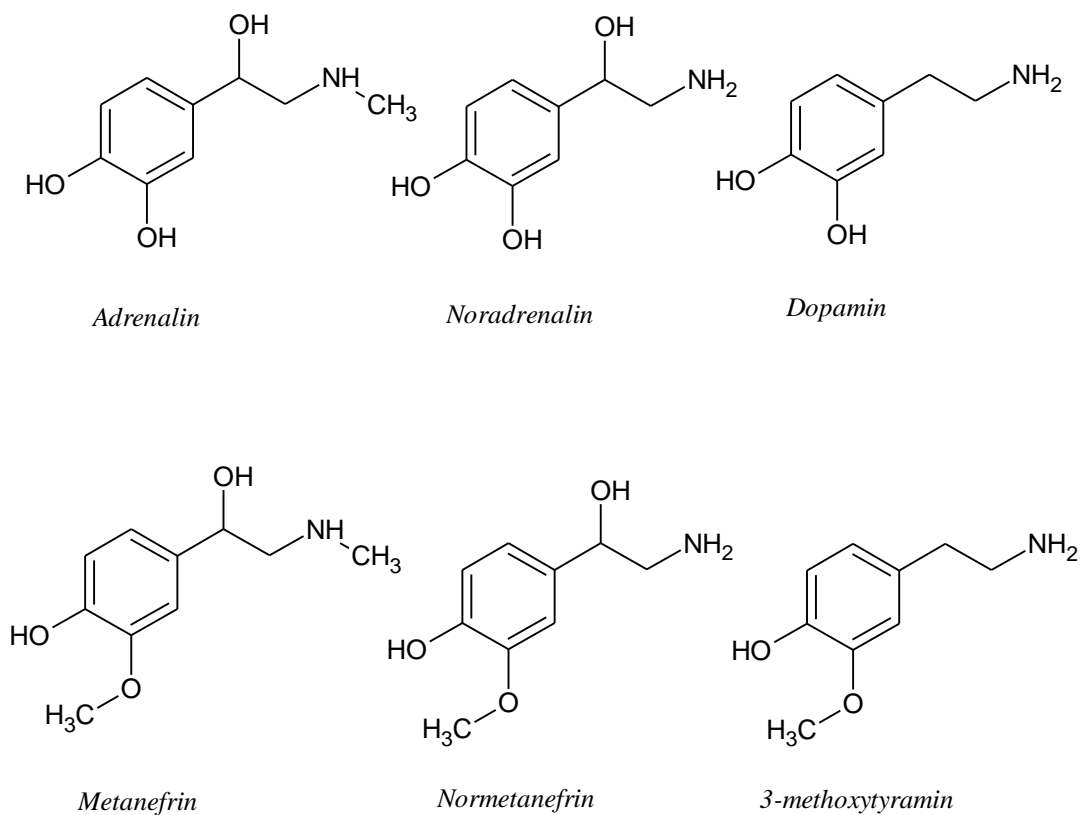
Obr. 5. Schéma aktivace pepsinogenu a jeho následného působení na bílkoviny [37]



Obr. 6. Schéma produkce pepsinogenu v žaludku a jeho následné konverze na pepsin [39]

Druhou skupinou stanovovaných biologicky aktivních látek byly plazmatické metanefriny nebo-li O-methyl metabolity katecholaminů. Zatímco katecholaminy je společný název pro skupinu látek zahrnující adrenalin (A), noradrenalin (NA) a dopamin (D), mezi metanefriny můžeme zařadit metanefrin (MN), normetanefrin (NMN) a 3-methoxytyramin (3-MT).

Katecholaminy v organismu fungují jako nervové přenašeče a rovněž jako hormony dřeně nadledvin. Chemicky jsou to alkylamino deriváty O-dihydroxybenzenu [40].



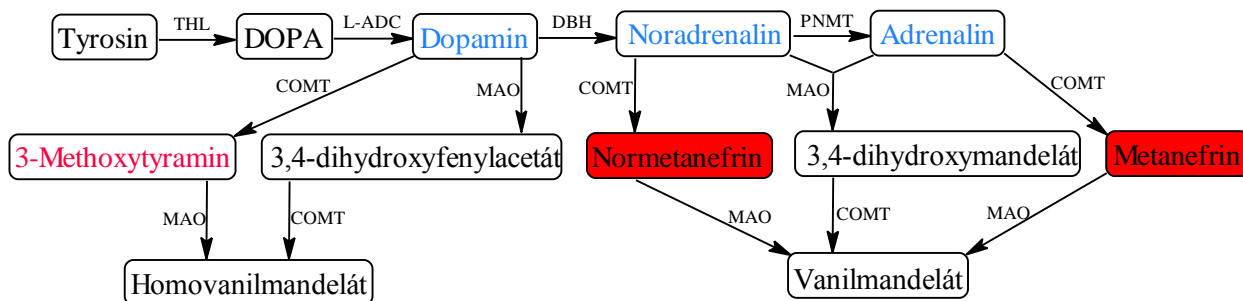
Obr. 7. Strukturní vzorce katecholaminů (výše) a metanefrinů [40]

Biosyntéza katecholaminů probíhá v mozku, dřeni nadledvin (adrenální chromafinní tkáni), extraadrenální chromafinní tkáni (mimo dřen nadledvin) a sympatických nervových zakončeních. Proces začíná konverzí tyrosinu, neesenciální proteinové aminokyseliny, na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) enzymem tyrosin hydroxylázou. DOPA je poté

metabolizován na dopamin za účasti dekarboxylázy aromatických aminokyselin (L-aminoacid dekarboxylázy). Následně je dopamin hydroxylován na noradrenalin za přítomnosti β -hydroxylázy. Na závěr enzym fenyletanolamin N-methyltransferáza přenáší methylovou skupinu na noradrenalin a způsobuje vznik adrenalinu.

Konverzi katecholaminů na jejich metabolické produkty zajišťují převážně enzymy monoamin oxidáza (MAO), katechol-O-methyltransferáza (COMT) a sulfotransferáza. Methylace katecholaminů na sledované metanefriny se účastní zejména COMT [41].

Katecholaminy jsou metabolizovány rozdílně v neuronálním a extraneuronálním kompartmentu.



Obr. 8. Metabolismus katecholaminů [41]

Z metanefrinů byla nejvyšší pozornost věnována volnému plazmatickému metanefrinu a normetanefrinu, které jsou uváděny jako nejprůkaznější markery onemocnění nádorem dřeně nadledvin [42,43]. Volné plazmatické NMN a MN jsou produkovány působením COMT převážně extraneuronálně, a to chromafinními buňkami tumoru (u nemocných pacientů) a rovněž adrenálními chromafinními buňkami [42].

Kromě favorizovaných plazmatických metanefrinů je vzhledem k diagnostice feochromocytomu často sledován i obsah katecholaminů v moči a v plazmě. Dalšími běžně sledovanými metabolity jsou kyselina vanilmandlová (VMA) a homovanilmandlová (HVA) v moči, které jsou konečným produktem metabolismu normetanefrinu a metanefrinu, resp. dopaminu u člověka [43–48]. Tyto metabolity pocházejí spíše ze zdrojů neuronálních [42].

Důvod pro stanovení analytů

V souvislosti se stanovením pepsinů má klinický význam především stanovení sérové hladiny pepsinogenů A a C. Pepsinogen A je markerem slizniční atrofie a také je používán jako marker vředové choroby. Nízká koncentrace pepsinogenu A v séru je považována za ukazatel rakoviny žaludku a podobně jeho nižší obsah vzhledem k pepsinogenu C [49–51]. Pepsinogen C se používá především jako marker stavu žaludeční sliznice [52,53].

Uvedená studie rozšiřuje možnosti stanovení pepsinu tím, že popisuje přípravu stacionárních fází pro afinitní HPLC a modifikovaných kapilár pro afinitní kapilární elektroforézu. Navíc byla určena disociační konstanta K_d komplexu prasečí pepsin A-DIT (3,5-dijod-L-tyrozin) ze změn v elektroforetické mobilitě na nepokryté křemenné kapiláře.

Důvodem studia volných plazmatických metanefrinů byla zjištěná souvislost mezi zvýšeným obsahem metanefrinů, zejména metanefrinu a normetanefrinu, v plazmě a výskytem tumorů pocházejících z chromafinní tkáně sympatického nebo parasympatického nervového systému [42]. Vědecké studie z poslední doby, zabývající se touto problematikou, stanovení volných metanefrinů v plazmě vyzdvihují a považují jej za nejcitlivější stanovení vzhledem k diagnostice uvedených nádorů [5,42,43,54].

Tyto nádory syntetizují, ukládají a metabolizují katecholaminy a většinou je také sekretují. Proto je možné zvýšenou koncentraci katecholaminů a jejich metabolických produktů v moči a v plazmě využít jako diagnostické markery uvedených nádorů [43–48].

Klasifikace nádorů dřeně nadledvin produkujících katecholaminy vychází z histopatologického dělení s ohledem na mateřskou buňku, z níž nádor vznikl. Dělí se na feochromocytom (FEO), ganglioneurom, ganglioneuroblastom, sympatoblastom a neuroblastom. Tyto nádory nejsou časté a vyskytují se převážně u osob se zvýšeným krevním tlakem, tzn. méně než u 1 % hypertonických pacientů. Nejčastěji se jedná o FEO [3-5]. Existuje více různých druhů (fenotypů) FEO. Fenotyp adrenergní produkující převážně A, resp. MN, fenotyp noradrenergní, produkující převážně NA, resp. NMN a fenotyp smíšený sekretující ve zvýšené míře oba analyty současně. V případě adrenergního fenotypu FEO mívají pacienti spíše hypotenzi (nízký krevní tlak), případně normotenzi (normální krevní tlak) a k výkyvům tlaku do vysokých hodnot dochází záchvatovitě [55].

Dalším nádorem produkujícím katecholaminy je paragangliom (PGL). PGL nevychází z chromafinních buněk dřeně nadledvin, ale chromafinní tkáň sympatického nebo parasympatického nervového systému [56,57].

Jedním z důvodů preference stanovení volných plazmatických metanefrinů je fakt, že katecholaminy jsou nádorovou buňkou produkovány jen periodicky. Naopak metanefriny jsou produkovány uvnitř chromafinní buňky kontinuálně a nezávisle na produkci katecholaminů [56]. Také je zapotřebí si uvědomit, že katecholaminy jsou normálně produkovány sympatoadrenomedulárním systémem a nejsou tedy specifické pro FEO. Rovněž některé typy FEO jsou sekrečně němé, tzn. že neprodukují katecholaminy vůbec nebo sporadicky [56,58]. U nemocných s FEO pochází nad 94 % zvýšené plazmatické koncentrace NMN a MN z metabolismu katecholaminů za účasti COMT z chromafinních buněk adrenální dřeně, nikoli z tumoru. Tím jsou NMN a MN v případě nesekretujících FEO rozhodně konzistentnějším ukazatelem [42].

Metoda stanovení volných plazmatických metanefrinů HPLC-EC byla validována a rovněž byly určeny parametry prokazující schopnost metody správně zařadit pacienty s nádorem a bez nádoru. Těmito parametry byly diagnostická senzitivita a specifická. Senzitivita je definována jako pravděpodobnost, že výsledek stanovení bude metodou zařazen jako pozitivní u nemocných, specifická jako pravděpodobnost, že výsledek bude negativní u osob bez nemoci [59]. Výsledky stanovení byly porovnány s jinou metodou, která se rovněž používá k zachytu FEO. Srovnávací metodou byla HPLC-FLD používaná ke stanovení volných katecholaminů v moči. Vyšetřením zmíněných analytických parametrů byl získán velmi cenný pohled na metodiku s možností jejího využití v klinické praxi.

Metody stanovení analytů

Pro izolaci a analýzu pepsinů a pepsinogenů se používají převážně afinitní chromatografické a elektroforetické techniky [52,53,60–62]. V souvislosti s izolací pepsinogenů je rovněž zmiňována gelová filtrace v kombinaci s výše uvedenými technikami [63] nebo například CE – MS [64]. Další možností pro stanovení pepsinů a pepsinogenů jsou imunochemické metody založené na reakci se značenými protilátkami. Jedná se o radioimunoanalýzu RIA (protilátka je

značena radioaktivním prvkem), enzymoimunoanalýzu EIA (imunochemická reakce s enzymatickou detekcí) a speciální druh EIA metody ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [65–67]. Vzhledem k tomu, že zmíněné látky vykazují zvýšenou afinitu k jodem substituovaným tyrozinovým zbytkům, této vlastnosti je využíváno k přípravě afinitních nosičů pro selektivní adsorpci pepsinu. V literatuře se ovšem hovoří o nosičích určených pouze pro nízkotlakou chromatografii. Příprava nosičů pro vysokotlakou chromatografii a modifikovaných kapilár pro ACE diskutovaná v této dizertaci významně rozšiřuje možnosti stanovení pepsinu [1].

Nejvíce používanou metodou pro stanovení NMN a MN v plazmě je HPLC s elektrochemickou detekcí (EC) [13,68–70]. Tato technika je méně nákladnou alternativou k používaným separačním technikám ve spojení s hmotnostní spektrometrií [12,13,71]. Metanefriny se rovněž stanovují imunochemickými metodami RIA, EIA a ELISA [12,72,73]. V této práci jsme se zaměřili na ověření validačních parametrů metody stanovení plazmatických metanefrinů pomocí HPLC – EC, dále na určení koncentračního rozmezí metanefrinů u pacientů bez nádoru a nalezení koncentrační hranice, nad níž se nacházejí pacienti s FEO. Rovněž jsme posuzovali schopnost metody správně zařadit pacienty (s nádorem, bez nádoru) [2].

Příprava stacionárních fází pro afinitní HPLC s vázaným 3,5-dijodo-L-tyrozinem (DIT)

Pro přípravu stacionárních fází s navázaným DIT byly použity komerční nosiče s vázanou epoxy skupinou a rovněž se skupinou vinylsulfonovou (HEMA BIO E, EPOXY TOYOPEARL, HEMA BIO VS). Suspenze těchto nosičů v destilované vodě byla smíchána s DIT rozpuštěným v karbonátovém pufru o odpovídajícím pH. Poté byla směs třepána, promývána a nakonec byla provedena elementární analýza pro zjištění obsahu vázaného jodu. Ze zjištěného množství jodu byl vypočítán obsah navázaného DIT. Nezareagované aktivní skupiny nosiče byly blokovány pomocí glycinu rozpuštěného v karbonátovém pufru o vhodném pH, podrobněji viz publikace [1].

Příprava kapilár pro afinitní kapilární elektroforézu s vázaným DIT

Nepokryté křemenné kapiláry byly nejdříve promyty řadou rozpouštědel a vysušeny proudem vzduchu. Poté byl jejich vnitřní povrch aktivován roztokem 3-aminopropyltriethoxy silanu a kapiláry byly opět promyty. Na aminoskupiny takto vzniklé na vnitřním povrchu kapiláry byl poté navázán DIT. Navázání bylo provedeno dvěma způsoby.

Prvním způsobem byl navázán L-tyrozin a následně jodován. L-tyrozin byl navázán ve formě BOC-L-tyrozin hydroxysukcinimidesteru, poté byla kapilára důkladně promyta a pomocí bezvodé kyseliny trifluoroctové (TFA) byl odstraněn BOC. Navázaný L-tyrozin byl jodován směsí jodidu draselného a chloraminu B ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS). Reakce byla zastavena roztokem pyrosiřičitanu sodného v PBS a kapiláry promyty.

Druhým způsobem byl navázán přímo DIT na aktivovaný vnitřní povrch kapilár. Roztok BOC-dijod-L-tyrozinu a dicyklohexylkarbodiimidu v dimethylformamidu byl ponechán v kapilárách a poté byl vymyt organickými rozpouštědly. Nakonec byly kapiláry ošetřeny roztokem TFA v dichlormethanu, opět promyty a vysušeny proudem vzduchu, podrobněji viz publikace [1].

Příprava vzorku plazmy pro HPLC-EC stanovení

Aby bylo možné analyty obsažené v plazmě chromatograficky stanovit, je nutné nejdříve biologický vzorek zbavit všech příměsí a získat jej ve formě aplikovatelné na kolonu HPLC.

Krev pro stanovení plazmatických metanefrinů je odebírána na lačno, pomocí kanyly a po předchozí dietě. Omezení určitých potravin a léků je zapotřebí z důvodu možné interference na chromatografickém záznamu. Odběr krve se provádí vleže nebo vsedě, pacientovi se zavede kanyla a po patnácti minutovém klidu se přistupuje k odběru. Tím nedochází ke zvyšování hodnot analytů stresem. Po odběru je nutné co nejrychleji oddělit krvinky od plazmy centrifugací, aby nedošlo k degradaci sledovaných látek. Jako stabilizátor je používán heparin a plazma se uchovává při -80 °C do dalšího zpracování.

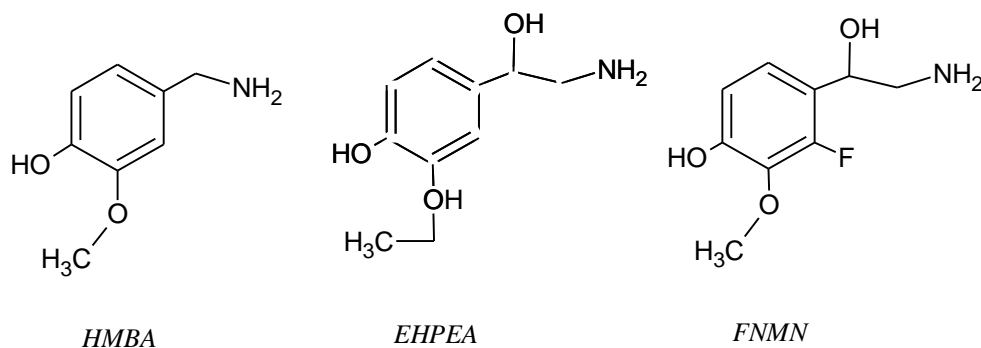
V rámci přípravy plazmatických vzorků k HPLC analýze je nutné analyty z plazmy nejdříve extrahovat. Vzhledem k přítomným hydrofilním funkčním skupinám metanefrinů (-NH₂,

-NHCH₃) se k extrakci pevnou fází (SPE) používají kolonky obsahující iontoměnič, konkrétně silný katex pro extrakci bází (MN pK_a (NH⁺) = 9,13±0,20; NMN pK_a (NH⁺) = 8,25±0,13) [74].

Vzhledem k tomu, že se pro diagnostické účely jedná o stanovení volných metanefrinů z plazmy, není zapotřebí před extrakcí uvolňovat vázané analyty.

Extrakční kolonky je nutné nejdříve aktivovat a promýt. To bylo realizováno propláchnutím kolonek roztokem 10% (2,9 mol.l⁻¹) hydroxidu amonného a 1% (179 mmol.l⁻¹) hydroxidu draselného v methanolu a poté vodou. Následně bylo možné aplikovat vzorky plazmy spolu s vnitřním standardem (IS) 4-hydroxy-3-methoxybenzylaminem (HMBA).

V předešlé publikaci [68] byly alternativně testovány ještě dvě látky s podobnou chemickou strukturou jako IS a to 3-ethoxy-4-hydroxyphenylethanolamin (EHPEA) a 6-fluoronormetanefrine (FNMN).



Obr. 9. Testované vnitřní standardy pro stanovení plazmatických NMN a MN [68]

Dalším krokem bylo promytí extrakčních kolonek roztokem 10 mmol.l⁻¹ kyseliny octové v methanolu, poté 20 mmol.l⁻¹ fosforečnanem amonným o pH 8,5 a nakonec vodou.

Analyty zadržené na kolonkách byly nakonec eluovány 10% (2,9 mol.l⁻¹) hydroxidem amonným v methanolu. Eluát byl poté odpařen na vakuové odparce a odparek rozpuštěn ve 150 μl MF. 100 μl roztoku bylo nakonec dávkováno na kolonu kapalinového chromatografu [75], postup viz publikace [2].

Validace provedená při převodu metody HPLC-EC a kontrola způsobilosti této metody

Vzhledem ke skutečnosti, že při zavádění metody stanovení plazmatických metanefrinů pomocí HPLC-EC bylo čerpáno z literatury [68], testování bylo zaměřeno hlavně na validaci prováděnou při převodu publikované metody do naší laboratoře a na kontrolu její způsobilosti. Validace v tomto případě zahrnuje stanovení opakovatelnosti, správnosti, linearity a citlivosti metody [76]. Navíc byla stanovena i reprodukovatelnost metody. Výsledky stanovení plazmatických metanefrinů byly rovněž porovnány s jinou metodou a to se stanovením volných katecholaminů v moči metodou HPLC-FLD. Obě stanovení slouží k záchytu FEO.

Opakovatelnost byla určena opakovaným stanovením jedné a téže směsné plazmy na třech hladinách. [77]. Jednotlivé hladiny tvořili zdraví dobrovolníci, pacienti s hypertenzí a pacienti s FEO. Zmíněná směsná plazma byla extrahována a měřena v rámci jednoho dne, v tomto případě hovoříme o stanovení za podmínek opakovatelnosti. Pro popis určité míry variability výsledků byla stejná směsná plazma opakovaně extrahována a stanovena vždy s několikadenními intervaly, jako reprodukovatelnost [69]. Těsnost shody mezi našimi výsledky za podmínek opakovatelnosti a za podmínek reprodukovatelnosti byla vyjádřena jako shodnost (přesnost), pomocí směrodatných odchylek a variačních koeficientů [78,79].

Měření správnosti bylo uskutečněno známými koncentračními přídávky standardů NMN a MN spolu s vnitřním standardem HMBA ke vzorku směsné plazmy. Stejně koncentrace byly rovněž přidány k 1,14% ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) kyselině octové k ověření stability analytů v kyselém prostředí. Standardy v plazmě i v kyselině octové byly poté extrahovány (viz výše). Koncentrační rozmezí přidávaných standardů pokrývalo oblast fyziologických koncentrací analytů v plazmě ($0 - 1 \text{ nmol.l}^{-1}$) a rovněž oblast nad koncentrační mezí až po více než dvacetinásobek koncentrační hranice nad níž se vyskytuje nádor. Každý jednotlivý standard (v plazmě a kyselině octové) byl změřen 3x [80]. Vnitřní standard HMBA byl ve všech vzorcích přítomen ve stejné koncentraci. Ze získaných výsledků byly vyneseny kalibrační přímky.

Tímto způsobem testování byla zároveň změřena správnost podložená výtěžkem metody i její linearita. Pro vyjádření citlivosti metody byly odečteny směrnice kalibračních křivek vnesených z výšek píků, které byly použity pro výpočet meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ).

Dalším parametrem pro výpočet bylo určení maximálního kolísání základní linie v oblasti 20-ti násobku pološířky píku sledovaných analytů v chromatogramu slepého pokusu. Koncentrace meze detekce byla vypočítána jako podíl trojnásobku maximálního kolísání základní linie a směrnice zde uvedené kalibrační přímky. Koncentrace na mezi stanovitelnosti byl pak podíl desetinásobku maximálního kolísání ku směrnici [76].

Nakonec byla posouzena schopnost metody správně zařadit pacienty (s nádorem, bez nádoru) a výsledky stanovení byly porovnány s jinou dostupnou metodou, která rovněž interpretuje změřené koncentrace stanovovaných látek vzhledem k přítomnosti či nepřítomnosti FEO. Srovnávaná metoda stanovuje volné katecholaminy v moči pomocí HPLC-FLD. Ověření přítomnosti (nepřítomnosti) FEO bylo potvrzeno vyšetřením pomocí počítačové tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MRI), případně histologicky. Spolehlivost metod byla poté vyjádřena diagnostickou senzitivitou a specificitou, definice viz výše. Senzitivita byla vypočtena jako podíl správně pozitivních výsledků buď NMN (NA) nebo MN (A) a správně pozitivních výsledků jednoho z těchto analytů plus falešně negativních výsledků obou z analytů. Specificita byla určena jako podíl správně negativních výsledků obou analytů a správně negativních výsledků obou analytů plus falešně pozitivních výsledků buď NMN (NA) nebo MN (A). Podrobnější popis validace je v publikaci [2].

Stanovení fyziologických a patologických koncentračních rozmezí metanefrinů v plazmě

Pro určení hranice mezi normálními (fyziologickými) a patologickými (u pacientů s nádorem) koncentracemi analytů byly stanoveny analytické koncentrace metanefrinů od zdravých dobrovolníků, pacientů s hypertenzí a pacientů s feochromocytomem, viz publikace [2].

Výsledky

Testování stacionárních fází pro afinitní HPLC s vázaným 3,5-dijodo-L-tyrozinem (DIT)

Ve všech předchozích studiích uvedených v literatuře a týkajících se stanovení pepsinů byla použita nízkotlaká chromatografie na nosičích určených pouze pro nízké tlaky [10,81,82]. Novým přínosem uvedeného projektu je příprava nosičů určených pro vysoké tlaky používané v afinitní HPLC.

Účelem přípravy stacionárních fází bylo analyzovat lidský pepsin. Z toho důvodu byly připravené stacionární fáze nejdříve testované modelovým vzorkem prasečího pepsinu A pro určení optimálních podmínek stanovení. Sledováno bylo složení mobilní fáze (MF), pH gradient pro eluci vázaného analytu a dvě vlnové délky (214 a 280 nm) UV detektoru. Optimální podmínky separace byly shledány při koncentraci $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ acetátového pufru při pH startovní MF 3,5 a eluční MF 5,6. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 214 nm. Optimální pH gradient byl nalezen mezi 30 a 50 min z 0 na 100 % elučního pufru.

Dalším nezbytným krokem k úspěšnému stanovení lidského pepsinu bylo zjistit jeho chymázovou aktivitu, resp. aktivitu prasečího pepsinu A. Stanovením chymázové aktivity se získá křivka aktivity enzymu, která jednoznačně určí, který ze získaných píků náleží pepsinu. Postup stanovení chymázové aktivity i odpovídající závislost je uvedena v publikaci [1].

Stanovením chymázové aktivity byl identifikován pík pepsinu. Zbývající píky nevykazující chymázovou aktivitu mohou být nečistoty obsažené v komerčním preparátu prasečího pepsinu A.

Dalším sledovaným parametrem byla závislost plochy píku pepsinu na jeho koncentraci.

Měřením byla zjištěna linearita odezvy v rozsahu 0 až 3 mg.l^{-1} . Tento koncentrační rozsah je tedy vhodný pro rutinní stanovení.

V souvislosti se stálostí kolony byla rovněž provedena série měření na nové koloně a na koloně po dvouměsíčním užívání. Životnost kolony byla sledována na koloně HEMA BIO E-DIT. Z každé série měření byl vypočítán variační koeficient. V případě nové kolony byl CV

0,9 % a po dvouměsíčním užívání této kolony 6,2 %. Nárůst CV ukazuje na omezenou životnost připravené kolony.

K ověření skutečnosti, že 3,5-dijod-L-tyrozin váže selektivně pouze pepsin, byla na kolonu HEMA-BIO E-DIT dávkována směs pepsinu, ovalbuminu a lysozymu. Vzhledem k tomu, že ovalbumin i lysozym eluoval v mrtvém čase, je zřejmé, že se na afinitní ligand tyto látky nenařazaly. Více viz publikace [1].

Stanovení lidského pepsinu

Vzorek lidského pepsinu byl získán ve formě pepsinogenu a jako homogenát obsahující příměsi. Bylo tedy nutné nejdříve vzorek upravit filtrací přes vatou a poté přes kolonku DEAE-Separon promytou pufrům tris-HCl o vhodném pH. Na kolonce zachycený analyt byl pak eluován acetátovým pufrům s přidávkem NaCl. Eluát byl dialyzován, zakoncentrován a nakonec byl pepsinogem aktivací pomocí HCl převeden na pepsin.

Stejně jako v případě stanovení prasečího pepsinu bylo zapotřebí stanovit chymázovou aktivitu lidského pepsinu. Stanovením se potvrdilo, že k eluci lidského pepsinu dochází v průběhu pH gradientu, stejně jako u prasečího pepsinu. Rovněž získaný chromatogram obou pepsinů je obdobný, viz publikace [1]. Pík přítomný v mrtvém čase zřejmě odpovídá neadsorbovaným příměsím obsaženým ve vzorku.

Získané výsledky ukazují dobrou reprodukovatelnost připravených stacionárních fází a jejich dostatečnou selektivitu pro pepsiny.

Testování kapilár pro afinitní kapilární elektroforézu s vázaným DIT

Modifikované kapiláry připravené dříve uvedenými postupy, podrobně viz publikace [1], byly opět testované modelovým vzorkem prasečího pepsinu A. Jak již bylo také zmíněno, DIT byl navázán na vnitřní povrch kapilár dvěma způsoby. Testováním se zjistilo, že reprodukovatelné výsledky poskytuje pouze kapilára připravená navázáním L-tyrozinu a následnou jodací. Pík prasečího pepsinu se na kapiláře podařilo rozdělit do několika izoform a v kratším migračním čase, než na kapiláře pokryté polyvinylalkoholem (PVA). Viz obr. 7 a 8

v publikaci [1]. PVA kapilára byla použita pro porovnání se stanovením na modifikované kapiláře. Stanovení pepsinu na nepokryté křemenné kapiláře nebylo možné provést z důvodu jeho sorpce na stěny kapiláry.

Příprava kapilár pro afinitní kapilární elektroforézu modifikovaných 3,5-dijodo-L-tyrozinem je poprvé uveřejněna v naší publikaci [1].

Stanovení disociační konstanty K_d komplexu prasečího pepsinu A s DIT

Ke stanovení disociační konstanty komplexu prasečí pepsin-DIT byla využita metoda založená na změně mobilit. Při klasickém uspořádání této metody je analyt s markerem elektroosmotického toku aplikován jako dávkovaný vzorek o stále stejné koncentraci. Poté se přidávají postupně se zvyšující koncentrace ligandu do separačního pufru. Ze změn v mobilitě analytu vzhledem k markeru elektroosmotického toku je následně možné vypočítat disociační konstantu [83].

V počátečních experimentech byla testována PVA kapilára, která však nevykazovala žádný elektroosmotický tok. Nebylo proto možné použít žádný marker elektroosmotického toku nutný pro experiment. Z toho důvodu byla posléze použita nepokrytá křemenná kapilára.

Výše uvedené uspořádání metody nebylo možné v našich experimentech dodržet z důvodu již zmíněné adsorpce pepsinu na stěny kapiláry. V alternativním uspořádání byl ligand DIT s markerem thiomočovinou přítomen ve vzorku a do separačního pufru byl přidáván pepsin. V literatuře je v souladu s naším konečným uspořádáním uváděna velká změna pohyblivosti u nízkomolekulární složky, je-li rozpuštěna v základním elektrolytu složka vysokomolekulární [84].

Pro změnu pohyblivosti $\Delta\mu$ ligandu (DIT) v přítomnosti receptoru (pepsinu) v separačním pufru pak platí:

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} - K_d \left(\frac{\Delta\mu}{[L]} \right)$$

$\Delta\mu_{\max}$ maximální změna pohyblivosti ligandu

v elektrolytu v přítomnosti receptoru při

nekonečném zředění [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

K_d disociační konstanta [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

[L] koncentrace ligandu [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

$$\Delta\mu = \frac{I}{E} \left[\left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_m} \right) - \left(\frac{1}{t_0} - \frac{1}{t_{m0}} \right) \right]$$

I migrační vzdálenost k detektoru [m]

E intenzita elektrického pole [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

t migrační čas ligandu v elektrolytu
v přítomnosti nenulové koncentrace
receptoru [s]

t_m migrační čas markeru elektroosmotického
toku v elektrolytu v přítomnosti nenulové
koncentrace receptoru [s]

t_0 migrační čas ligandu v elektrolytu
v přítomnosti nulové koncentrace receptoru
[s]

t_{m0} migrační čas markeru elektroosmotického
toku v elektrolytu v přítomnosti nulové
koncentrace receptoru [s]

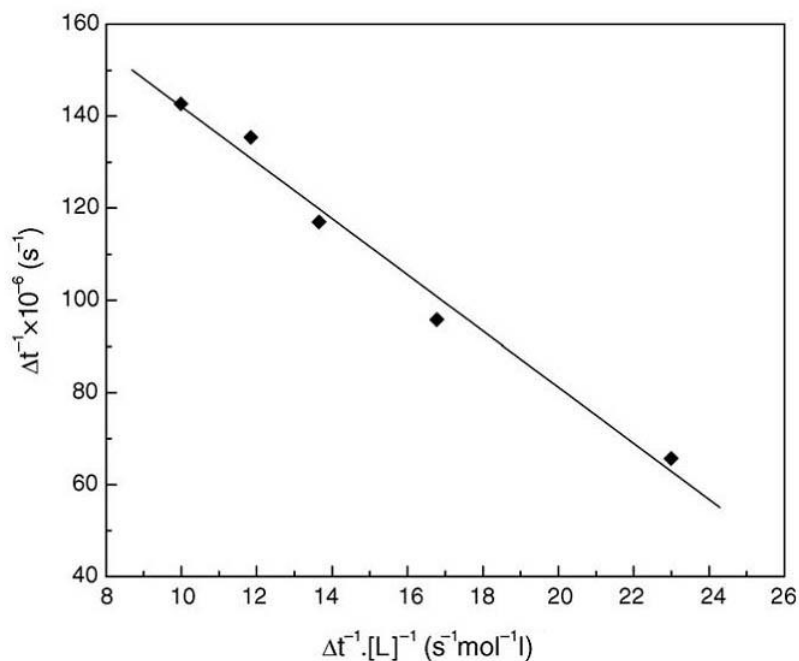
Rovnici lze poté zapsat ve zkrácené podobě:

$$\Delta\mu = \frac{I}{E} \left[\Delta \left(\frac{1}{t} \right) \right]$$

Za předpokladu, že I a E jsou ve všech experimentech stejné, je možné rovnici přepsat do tvaru:

$$\Delta \left(\frac{1}{t} \right) = \Delta \left(\frac{1}{t} \right)_{\max} - K_d \left(\frac{\Delta \left(\frac{1}{t} \right)}{[L]} \right)$$

Koncentrace ligandu DIT v našich experimentech byla $2,3 \text{ mmol.l}^{-1}$, koncentrace thiomocoviny $13,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ a rozmezí koncentračních přidavků pepsinu se pohybovalo od 0 do $14,3 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.



Obr. 10. Grafická závislost stanovení disociační konstanty K_d komplexu prasečího pepsinu A s DIT.

Ze změn v pohyblivosti DIT vzhledem k thiomocovině po přidavcích pepsinu byla sestrojena lineární závislost, viz obr. 10. Disociační konstanta K_d byla poté odečtena z grafu jako směrnice ($-K_d$), z rovnice lineární regrese $y = -6,1x + 203$. K_d tedy odpovídá $6,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzhledem k tomu, že konstanta K_d komplexu prasečí pepsin A–DIT nebyla doposud v literatuře uváděna, bylo možné pouze srovnání s K_d komplexu konkanavalin A–glykoproteiny [85]. Nalezené hodnoty konstant K_d pro konkanavalin A–ovalbumin, fetuin i kyselý α -glykoprotein jsou obdobné, viz publikace [1].

Prezentace a porovnání získaných validačních parametrů metody HPLC-EC s publikovanými daty

Při měření přesnosti za podmínek opakovatelnosti variační koeficient (CV) určený u obou analytů nepřekročil na žádné koncentrační hladině 6,9 %. V případě měření za podmínek reprodukovatelnosti byla nejvyšší hodnota CV 13 % pro všechny hladiny a analyty. Zvýšení CV v případě reprodukovatelnosti plně odpovídá zahrnutí variability do výsledků (měření v různých dnech) a zároveň odpovídá požadavku na maximální hodnotu CV při měření přesnosti, kterou je 15 % [74].

Změřením opakovatelnosti i reprodukovatelnosti byla získána představa o shodnosti (přesnosti) metody. Výsledky korelují s literaturou [13,68,69]. Lenders a kolektiv [68] uvádí CV reprodukovatelnosti u skupiny pacientů se zvýšenými hodnotami analytů v plazmě až 16,5 %. Pagliari a kol. [70] uvádí CV reprodukovatelnosti pro volný MN v plazmě dokonce více než 32 %, tedy údaj přesahující povolený limit.

Kalibrační přímky ukazují vynikající linearitu přes celý sledovaný koncentrační rozsah, tedy od nuly až po dvacetinásobek koncentrace normálních hodnot, viz publikace [2]. Koeficienty determinace (R^2) potvrzující linearitu jsou pro oba analyty v plazmě a pro MN v 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny octové vyšší než 0,99, pro NMN v 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny octové je R^2 vyšší než 0,97.

Výtěžek obou analytů z plazmy se pohybuje mezi 96 a 125 % přes celé koncentrační rozmezí (0 – 22,76 nmol.l⁻¹ pro NMN, 0 – 21,39 nmol.l⁻¹ pro MN). Ztráta analytů při extrakci 30–40 % odpovídá výtěžku Lenders a kol. [68], kteří udávají absolutní výtěžek obou analytů mezi 50 a 70 %. Podstatně horšího výsledku bylo dosaženo z 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny octové. Vyšší výtěžek analytů z 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny octové (stabilita v kyselém prostředí) oproti jejich výtěžku z vody viz [68] se proto nepotvrdil.

Koncentrace na LOD pro NMN z plazmy byla stanovena jako 150 pmol.l⁻¹, pro MN 320 pmol.l⁻¹. LOQ pak odpovídá 500 pmol.l⁻¹ NMN a 1,1 nmol.l⁻¹ MN. Výsledky plně odpovídají mezím uvedeným v publikacích pomocí HPLC-EC [68,69] a rovněž metodou LC-MS/MS [12,13]. Pagliari a kol. [70] určili cca 10x vyšší LOD (HPLC-EC).

Porovnáním výsledků metody stanovení volných plazmatických metanefrinů (HPLC-EC) s výsledky stanovení volných močových katecholaminů (HPLC-FLD) bylo zjištěno, jak se

výstupy obou metod shodují a zároveň byla ověřena jejich vypovídací schopnost. Ze skupiny sledovaných pacientů byli metodou HPLC-EC všichni pacienti zařazeni správně (senzitivita i specificita 100 %), definice viz výše. Na základě stanovení stejné skupiny pacientů byla senzitivita metody HPLC-FLD rovněž 100 %, ovšem specificita této metody byla nižší a to 77 %.

Správná identifikace všech pacientů metodou HPLC-EC potvrdila význam zařazení pacientů s hypertenzí mezi normální kontrolní vzorky (fyziologické koncentrace pacientů bez FEO), viz níže. Pokud by nedošlo k přidání skupiny hypertoniků bez FEO mezi normální hodnoty, tři z výsledků (správně negativní) by byly špatně zařazeny mezi pacienty s FEO (jako falešně pozitivní). Podrobněji viz publikace [2].

Prezentace a porovnání změřených koncentračních rozmezí metanefrinů v plazmě s publikovanými daty

Rozdělením kontrolních pacientů na tři skupiny (zdraví, hypertonici a nemocní s FEO) byl ověřen předpoklad, že koncentrační hodnoty NMN a MN u pacientů s hypertenzí zasahují do mírně vyšších koncentrací než u zdravých. Zároveň bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace NMN u normálních hodnot (kontroly bez FEO) nepřesahuje nejnižší koncentraci NMN u pacientů s FEO. Tím byla stanovena koncentrační hranice. V případě MN se horní normální a spodní patologická koncentrace kryjí, viz publikace [2]. Vzhledem k tomu, že v případě adrenergního fenotypu FEO (A, MN produkujícího) docházelo u všech sledovaných pacientů k výraznému zvýšení MN a současně i k zvýšení NMN nad koncentrační mez, zmíněný fakt výsledky nezkrsluje a odpovídá dříve publikovaným hodnotám [68]. Porovnáním získaných referenčních intervalů s publikovanými bylo zjištěno, že rozmezí získaná stejnou metodou (HPLC-EC) jsou velmi blízká [12,68].

Závěr

Z výsledků uvedených v této dizertaci, resp. v publikaci [1] je patrné, že se podařilo připravit afinitní stacionární fáze s navázaným DIT jako afinitním ligandem. Rovněž byly určeny optimální podmínky pro separaci pepsinu na těchto fázích. Stanovení pepsinu na připravených stacionárních fázích jsou reprodukovatelná a zároveň bylo prokázáno, že tyto fáze vykazují pro pepsin dostatečnou selektivitu. Proto je možné uvažovat o použití zmíněných fází v běžné praxi pro stanovení lidských nebo prasečích pepsinů.

Ze dvou testovaných postupů přípravy CE kapilár modifikovaných DIT byla pouze dvoustupňová syntéza vhodná pro přípravu použitelných kapilár. Na kapiláry byl v tomto případě nejdříve navázán L-tyrosin, který byl následně jodován. Takto připravené kapiláry byly testovány analýzou prasečího pepsinu A a výsledky byly porovnány s analýzou téže látky na komerční PVA modifikované kapiláře za stejných separačních podmínek. Kapiláry modifikované DIT se ukázaly jako vhodnější pro separaci pepsinu, než komerční PVA kapiláry. Připravené kapiláry umožnily separaci v kratším migračním čase a bylo dosaženo lepšího rozdělení pepsinu do jednotlivých izoform.

Ke stanovení disociační konstanty komplexu prasečího pepsinu A s DIT byla využita metoda založená na změně mobilit. K_d komplexu byla určena jako $6,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, viz publikace [1].

Metoda stanovení volných plazmatických metanefrinů HPLC-EC splňuje všechny požadované analytické parametry pro její validaci, viz publikace [2]. Ověřením diagnostické senzitivity a specificity jsme určili vynikající rozlišovací schopnost metody. V porovnání se stanovením volných katecholaminů z moče metodou HPLC-FLD má stanovení metanefrinů z plazmy vyšší specificitu, protože všichni pacienti bez FEO byli metodou správně zařazeni jako negativní, na rozdíl od srovnávané metody. Určili jsme referenční meze pro pacienty bez FEO (negativní) a s FEO (pozitivní). Prokázalo se, že je nezbytné zařadit hypertenzní pacienty mezi normální hodnoty, protože mírně zvyšují hraniční koncentraci a tím se zabránilo vzniku falešně pozitivních výsledků.

Literatura

- [1] T. Vařilová, A. Vránková, V. Pacáková, M. Tichá, K. Štulík, *J.Chromatogr. A* 1084 (2005)207.
- [2] A. Vránková, T. Škrámlíková, J. Widimský jr., T. Zelinka, O. Petrák, R. Holaj, B. Štrauch, J. Rosa, J. Škrha, Z. Jůzová, *Chem. listy*, přijato (práce přijatá redakcí, dosud nepublikovaná).
- [3] T. Zelinka, B. Štrauch, O. Petrák, R. Holaj, A. Vránková, et al, *J.Hypertension* 23 (2005) 2033.
- [4] R. Holaj, T. Zelinka, O. Petrák, B. Štrauch, D. Wichterle, A. Vránková, et al, *J. Human Hypertension* (2008) 1.
- [5] J. Widimský jr, T. Zelinka, O. Petrák, B. Štrauch, L. Šafařík, M. Kasalický, A. Vránková, R. Holaj, *Vnitřní lékařství*, 53:4 (2007) 428.
- [6] J. Haginaka, Y. Miyano, Y. Saizen, Ch. Seyama, T. Murashima, *J.Chromatogr. A* 708 (1995) 161.
- [7] M. Gliges, M.H. Kleemiss, G. Schomburg, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2038.
- [8] J.P. Landers, R.P. Oda, B.J. Madden, T.C. Spelberg, *Anal. Biochem.* 205 (1992) 115.
- [9] Z. Kučerová, M. Tichá, *J.Chromatogr. B* 770 (2002) 121.
- [10] E. Tonková, M. Tichá, Z. Kučerová, *Int. J.Bio-Chromatogr.* 4 (1998) 35.
- [11] Z. Kučerová, M. Tichá, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 669.
- [12] S. A. Lagerstedt, D. J. O'Kane, R. J. Singh, *Clin.Chem.*50:3 (2004) 603.
- [13] W. H. A. de Jong, K. S. Graham, J.C. van de Molen et al, *Clin. Chem.*53:9 (2007) 1684.
- [14] Esa, Inc., *Coulochem II Operating manual*, Chelmsford, 1995.
- [15] L. Felzl, K. Štulík, *Teoretické základy separačních metod*, SPN, Praha 1985.
- [16] K. Štulík a kolektiv, *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.
- [17] V. Pacáková, K. Štulík, *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, SPN, Praha 1986.
- [18] T. Hanai, *HPLC: A Practical Guide*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999.
- [19] Z. Glatz, *Chem. Listy* 96 (2002) 127.
- [20] http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm, staženo dne 1.4.2008.
- [21] T. Vařilová, M. Maděra, V. Pacáková, K. Štulík, *Current Proteomics* 3 (2006) 55
- [22] http://www.iontosorb.cz/cz/afi_chro.htm, staženo dne 1.4. 2008.
- [23] J. Turková, *Bioaffinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1993
- [24] http://www.vscht.cz/anl/lach1/4_Coulo.pdf, staženo dne 7.4. 2008.
- [25] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005.
- [26] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, 3rd edition, Hoboken, New Jersey 2006.

- [27] http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html, staženo dne 7.4. 2008.
- [28] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html>, staženo dne 14.4. 2008.
- [29] P. Camilleri, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, CRC Press, 2nd edition, Boca Raton 1998.
- [30] http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/el_sep_vyber.htm, staženo dne 14.4.2008.
- [31] http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Bartak_Petr/Hab.prace-Bartak.pdf, staženo dne 29.4. 2008.
- [32] <http://ca.expasy.org/uniprot/P00790>, staženo dne 29.4. 2008.
- [33] <http://ca.expasy.org/uniprot/P00791>, staženo dne 29.4. 2008.
- [34] <http://ca.expasy.org/uniprot/P20142>, staženo dne 29.4. 2008.
- [35] PBD-protein data bank, <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=3psg&job=download>, staženo dne 29.4. 2008.
- [36] Z. Vodrážka, *Biochemie*, Academia, Praha 2002.
- [37] C.G. Sanny, J.A. Hartsuck, J. Tang, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 2635.
- [38] A. Hayashi, M. Matsuo, US Patent Issued on June 18, 2002 , No. 319863 filed on 1999-06-14
- [39] http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJECR.htm, staženo dne 6.5. 2008
- [40] Z. D. Peterson, *Dissertation*, Brigham Young University (2004).
- [41] L. Thomas, *Clinical Laboratory Diagnostics*, TH-Books, 1. English edition, Frankfurt, 1998.
- [42] K. Pacák, *Habilitační práce*, I.LF UK Praha (2002)
- [43] J.W.M. Lenders, K. Pacák, M.M. Walter, et al, *JAMA* 287 (2002) 1427.
- [44] E.L. Bravo, *Curr Ther Endocrinol Metab* 6 (1997) 195.
- [45] E.L. Bravo, R.W. Gifford, Jr., *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 22 (1993) 329.
- [46] M. A. Raggi, V. Pucci, C. Sabbioni, S. Furlanetto, G. Gerra, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 275.
- [47] Z. D. Peterson, D. C. Collins, Ch. R. Bowerbank, et al, *J Chromatogr. B*, 776 (2002) 221.
- [48] G. Eisenhofer, T.T. Huynh, M. Hiroi, K. Pacák, *Rev. Endocr. Metabol. Disorders*, 2 (2001)297.
- [49] M. Plabani, *Critic. Rev. Clin. Lab. Sci.* 30 (1993) 273.
- [50] I.M. Samloff, *Gastroenterology* 96 (1989) 586.
- [51] G.N. Stemmermann, I.M. Samloof, A.M.Y. Nomura and L.K. Heilbrun, *Clin. Chim. Acta* 163 (1987) 191.
- [52] J. Frýdlová, Z. Kučerová, M. Tichá, *J. Chromatogr. B* 800 (2004) 109.
- [53] H. Arnoštová, Z. Kučerová, I. Tišlerová, T. Trnka, M. Tichá, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 211.
- [54] G. Eisenhofer, I.J. Kopin, D.S. Goldstein, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 331.
- [55] Eisenhofer G, Lenders J.W., Goldstein D.,et al., *Clin. Chem.* 51:4 (2005) 735–744.

- [56] T. Zelinka, G. Eisenhofer, K. Pacák, *Stress* 10 (2007a) 195.
- [57] <http://www.solen.cz/pdfs/int/2001/09/05.pdf>, staženo dne 5.5. 2008.
- [58] J.W. Lenders, G.Eisenhofer, M. Mannelli, et al, *Lancet* 366 (2005) 665.
- [59] <http://new.euromise.org/czech/tajne/ucebnice/html/html/node5.html>, staženo 10.12. 2007.
- [60] L.M. Sanchez, J.P. Freije, A.M. Merino, F. Vizoso, et al, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 24725.
- [61] J.Y. Fu, S.M. Wu, Ch.T. Chang, H.Y. Sung, *J. Agric, Food Chem.* 51 (2003) 1042.
- [62] J.Fruton, *Q. Rev. Biol.* 77 (2002) 127.
- [63] G. Khitto, L. Vermette, G. Nappert, N. Lariviere, *AJVR* 52 (1991) 713.
- [64] C. Simo, R. Gonzales, C. Barbas, A. Cifuentes, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7709
- [65] G. Treiber, A. Leodolter, M. Nilins, P. Malfertheiner, *Gastroenterology* 118 (2000) A752
- [66] S. Peyre, C. Sategnaguidetti, A. Dinapoli, et al, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (1981) 58.
- [67] H. Waldum, *Scand. J. Gastroenterol.*, 18 (1983) 90.
- [68] J. W. Lenders, G. Eisenhofer, I. Armando, H. R. Keiser, et al, *Clin.Chem.* 39/1 (1993) 97.
- [69] M. Roden, W.Raffesberg, W.Raber, E.Bernroider, *Clin.Chem.* 47 (2001) 1061.
- [70] R. Pagliari, J.M.Cottet-Emard, L.Peyrin, *J. Chromatogr.* 563 (1991) 23.
- [71] L.C. Marney, T.J. Laha, G.S. Baird, P.M. Rainey, et al, *Clin. Chem.* 54 (2008) 1729.
- [72] Y.C. Gao, H.K. Lu, Q.Y. Luo, et al, *Clin. Exp. Med.* 8 (2008) 87.
- [73] B. Manz, M. Kuper, E. Booltink, U.Fischer-Brugge, *Ann New York Acad Sci* 1018 (2004) 582.
- [74] SciFinder Scholar Version 2004.2. American Chemical Society 2004.
- [75] <http://www.catecholamine.org/labprocedures/procedure/plasmamet.htm>, staženo dne 5.9. 2007.
- [76] <http://www.hplc.cz/index.html>, staženo dne 10.12. 2007.
- [77] <http://www.scribd.com/doc/2353306/Guia-EurachemThe-Fitness-for-Purpose-of-Analytical-Methods>, staženo dne 10.12. 2007.
- [78] <http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/csn5725.htm>, staženo dne 10.12. 2007.
- [79] <http://www.fda.gov/cder/guidance/1320fnl.pdf>, staženo dne 10.12. 2007.
- [80] A. Vránková, Diplomová práce, PřF UK Praha (2001).
- [81] Z. Kučerová, M.J. Beneš, J. Lenfeld, *Int. J. Bio-Chromatogr.* 3 (1997) 177.
- [82] Z. Kučerová, J. Turková, *Int. J. Bio-Chromatogr.* 2 (1997) 145.
- [83] N.H.H. Heegaard, S. Nilsson, N.A. Guzman, *J. Chromatogr. B* 715 (1998) 29.
- [84] Y.H. Chu, L.Z. Avila, J. Gao, G.M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* 28 (1995) 461.
- [85] S. Hubená, Diplomová práce, PřF UK Praha (1999).
- [86] <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>, staženo dne 10.12. 2007.