

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Petra Anýžová

In–matrix esterifikace polárních karboxylových kyselin v
moči

In–matrix esterification of polar carboxylic acids in urine

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jaroslav Mráz, CSc.

Praha 2014

Prohlášení:

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

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

V Praze, dne

Podpis

Abstrakt

Na souboru 15 karboxylových kyselin různých strukturních typů byl testován nový postup esterifikace těchto látek v moči bez předchozí extrakce s využitím plynově chromatografické koncovky. Kyseliny byly nejprve stanoveny referenčním způsobem bez matrice a poté novým postupem, přičemž k lyofilizované moči bylo přidáno derivatizační činidlo alkohol·HCl, které se poté odpařilo, odparek se rozpustil ve vodě, estery se vyextrahovaly do organického rozpouštědla a následně stanovily metodami GC/FID a GC/MS. Práce je zaměřena hlavně na kyselinu 2-hydroxyethylmerkapturovou (HEMA) a karboxymethylmerkapturovou (CMMA), které byly doplněny dalšími hydroxykyselinami a vícesytnými kyselinami, známými jako fyziologické složky moče nebo markery metabolických poruch.

Klíčová slova: karboxylové kyseliny

merkapturové kyseliny

lyofilizovaná moč

esterifikace

plynová chromatografie

Abstract

A set of 15 carboxylic acids of various structural types was used to test a new procedure of esterification of these substances in the urine without previous extraction. The acids were first measured by a reference method without the matrix, and then by a procedure, where lyophilized urine was treated with derivatizing reagent alcohol·HCl, which was then evaporated, the residue dissolved in water, esters extracted into an organic solvent and subsequently determined by GC/FID and GC/MS. The work is mainly focused on 2-hydroxyethyl- and carboxymethyl-mercapturic acids, but the procedure was also tested on di-, tri- and hydroxy-carboxylic acids, known as physiological urinary components or markers of metabolic disorders.

Key words: carboxylic acids

 mercapturic acids

 freeze-dried urine

 esterification

 gas chromatography

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu RNDr. Jaroslavu Mrázovi, CSc. a paní Ing. Ivetě Hanzlíkové za poskytnutí zázemí, materiálu a pomoc při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za konzultaci mé diplomové práce.

Tato práce byla vypracována v oddělení pro hodnocení expozice chemickým látkám na pracovišti Centra hygieny práce a pracovního lékařství Státního zdravotního ústavu v Praze.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	9
2.1. Karboxylové kyseliny.....	9
2.1.1. Charakteristika a vlastnosti karboxylových kyselin	9
2.1.2. Výskyt karboxylových kyselin v životním prostředí.....	9
2.1.3. Analytické metody pro stanovení karboxylových kyselin.....	10
2.1.4. Metody derivatizace karboxylových kyselin	11
2.1.4.1. Silylace	11
2.1.4.2. Reakce s alkyl chlorformiáty	12
2.1.4.3. Esterifikace	13
2.1.5. Merkapturové kyseliny	14
2.1.5.1. Objev a charakteristika merkapturových kyselin.....	14
2.1.5.2. Merkapturové kyseliny ve vlastní experimentální práci	15
2.1.6. Karboxylové kyseliny ve vlastní experimentální práci.....	16
2.2. Biologické monitorování	20
2.2.1. Metabolické profilování	21
2.2.2. Biologické monitorování merkapturových kyselin.....	22
3. Experimentální část	26
3.1. Přístroje a chemikálie	26
3.2. GC analýza	27
3.2.1. GC/FID analýza.....	27
3.2.2. GC/MS analýza	28
3.3. Příprava roztoků	28
3.3.1. Příprava derivatizačního činidla EtOH·HCl	28
3.3.2. Příprava zásobních roztoků jednotlivých kyselin	29
3.3.3. Příprava směsného roztoku kyselin	29
3.3.4. Příprava zásobních roztoků HEMA a CMMA	29
3.3.5. Příprava roztoku FPMA jako vnitřního standardu.....	30
3.4. Postup derivatizace jednotlivých kyselin.....	30
3.5. Provedení modelových experimentů	30
3.5.1. Postup lyofilizace	30
3.5.2. Provedení modelového experimentu pro směs kyselin přítomných v matrici (výchozí postup)	31
3.5.3. Provedení výsledného modelového experimentu pro směs kyselin v matrici	31
3.5.4. Provedení experimentu na reálných vzorcích potkaní moči	32
4. Výsledky a diskuze.....	33
5. Závěr.....	48
6. Seznam použité literatury	49

1. Úvod

V moči jsou stanovovány četné karboxylové kyseliny jako ukazatele klinického stavu organismu nebo jeho zátěže cizorodými chemickými látkami. Stanovení karboxylových kyselin se uplatňuje například při biologickém monitorování expozic na pracovištích, ověření ochranných opatření a osobních ochranných prostředků a vyšetření v rámci preventivních prohlídek. Mezi nejčastěji prováděná vyšetření v ČR patří v současné době stanovení kyseliny hippurové, kyselin methylhippurových a kyseliny mandlové v moči, které jsou ukazateli expozice toluenu, xylenům a styrenu. Dále se stanovení využívá v oblasti metabolického profilování a screeningu diagnosticky významných markerů metabolických poruch. Mezi takové poruchy patří například organické acidurie, což je skupina několika desítek onemocnění, pro které je charakteristické vylučování karboxylových kyselin do moči.

Pro stanovení těchto kyselin, ať s dalšími funkčními skupinami nebo bez nich existuje celá řada analytických postupů. Před plynově chromatografickým stanovením se obvykle provádí extrakce do organického rozpouštědla s následnou derivatizací, např. esterifikací. Velmi polární kyseliny se však extrahují obtížně. Tento problém lze překonat použitím reaktivních alkylchlorformiátů, které umožňují kombinovat derivatizaci a extrakci v jediném kroku, ale derivatizace často neproběhne kvantitativně.

V této práci byl studován nově zavedený postup provedení esterifikace kyselin v moči bez předchozí extrakce. Podnět k této práci dal projekt pracovníků Státního zdravotního ústavu v Praze, ve kterém se studoval osud proteinových aduktů elektrofilních škodlivin s krevními proteiny. Jednou ze studovaných látek byl ethylenoxid, který se váže na krevní proteiny a jejich odbouráváním se uvolňují merkapturové kyseliny 2-hydroxyethylmerkapturová (HEMA) a karboxymethylmerkapturová (CMMA). Kromě toho tyto dvě látky vznikají i přímou reakcí ethylenoxidu s glutathionem. Kyseliny HEMA i CMMA jsou velmi polární látky a obvyklý postup derivatizace by mohl být problémový, proto byl navržen nový postup, v němž se derivatizačním činidlem působí přímo na lyofilizovanou moč bez předchozí extrakce vzorků. Práce je zaměřena právě na výše popsané merkapturové kyseliny a nově navržený postup byl zároveň aplikován

i na rozšířený soubor podobně polárních karboxylových kyselin v moči.

Cílem této práce bylo podchycení kritických bodů nově zavedeného postupu stanovení karboxylových kyselin v moči, aplikace tohoto postupu na merkapturové kyseliny a poté na reálné exponované vzorky.

2. Teoretická část

2.1. Karboxylové kyseliny

2.1.1. Charakteristika a vlastnosti karboxylových kyselin

Karboxylové kyseliny jsou organické sloučeniny, které jsou charakteristické přítomností funkční karboxylové skupiny $-\text{COOH}$. Podílejí se na buněčném metabolismu a slouží jako výchozí látky pro přípravu řady derivátů. Jsou nepostradatelnou složkou živých organismů. Aminokyseliny tvoří základní stavební složku proteinů, tedy i enzymů, které umožňují složité metabolické procesy. Estery ve formě triacylglycerolu mají zásobní i strukturní funkci [1].

Karboxylové kyseliny mohou mít ve své molekule jednu nebo více karboxylových skupin. Podle počtu karboxylových skupin se organické kyseliny dělí na jednosytné (monokarboxylové), obsahující jednu karboxylovou skupinu a vícesytné (di-, trikarboxylové), obsahující dvě a více karboxylových skupin [2]. Podle druhu uhlovodíkového zbytku se kyseliny dělí na alifatické (nasycené, nenasycené) a aromatické [3].

2.1.2. Výskyt karboxylových kyselin v životním prostředí

Mnohé karboxylové kyseliny se v přírodě vyskytují jako takové nebo ve formě svých derivátů. Hojně rozšířené jsou například nejrůznější estery, s nimiž se setkáváme nejčastěji v ovocných plodech, jimž obvykle udělují příjemnou vůni. Kyselina mravenčí je přítomna jako volná v přírodě, například v kopřivách nebo mravencích, ve formě formylové skupiny je vázána na koenzym - kyselinu tetrahydrofolovou. Kyselina octová vzniká octovým kvašením zředěných vodných ethanolických roztoků. Metabolismu se účastní jak volná, tak ve formě svých solí. Zvlášť významná je přítomnost této kyseliny ve formě acetylu v acetylkoenzymu A, protože tato sloučenina je klíčovým meziproduktem metabolismu živin a výchozí látkou při biosyntéze nejrůznějších přírodních produktů, jako jsou například mastné kyseliny, terpenoidy, rostlinná barviva a mnoho dalších. Kyselina propionová

se vyskytuje v rostlinách volná i ve formě svých solí. Kyselina máselná je nejnižší kyselinou obsaženou v glyceridech, především v másle. Volná se vyskytuje v mnoha rostlinách, například v houbách a dále i v potu. Kyselina šťavelová je obsažena v rostlinách rodu Rumex a Oxalis, ve formě vápenaté soli v jednom z druhů ledvinových kamenů. Kyselina jantarová se vyskytuje volná jak v rostlinné, tak v živočišné říši. Také je obsažena ve fosilní pryskyřici jantaru. Kyselina citronová se vyskytuje ve velkém množství v citrusových plodech. Vyrábí se účinkem mikroorganismů, například *Aspergillus niger* na roztoky sacharózy. Kyselina glykolová je nejjednodušší hydroxykyselina a spolu s nejjednodušší oxokyselinou, kyselinou glyoxylovou, je obsažena v nezralých plodech rostlin. Kyselina mléčná je rozšířena v rostlinách. Pravotočivá sůl L- mléčné kyseliny je konečným produktem anaerobně probíhající glykolýzy. Protože glykolózou získávají svalové buňky živočichů energii, stoupá v nich její obsah úměrně práci svalů. Racemická forma této kyseliny vzniká při různých mikrobiálních procesech (kvašení). Kyselina vinná, především pravotočivá forma, je obsažena v mnoha plodech rostlin. Kyselina pyrohroznová, nebo její sůl, je klíčovým meziproduktem glykolýzy, při níž se tvoří ze soli kyseliny fosfoglycerové. Kyselina panthotenová je součástí koenzymu A řadí se do skupiny vitaminů B. Kyselina benzoová a kyselina skořicová jsou součástí některých přírodních pryskyřic a balzámů. Kyselina gallová je stavební složkou tatinu, hořké a svíravé látky, získávané především z duběnek [4].

2.1.3. Analytické metody pro stanovení karboxylových kyselin

Pro analýzu karboxylových kyselin se používá celá řada analytických technik, jako například plynová chromatografie (GC), iontově–výměnná chromatografie (IEC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kapilární elektroforéza (CE).

Iontová chromatografie je jednoduchá a efektivní metoda pro separaci karboxylových kyselin, jejíž pomocí se stanovují nižší monokarboxylové a dikarboxylové kyseliny [5]. Pomocí HPLC s gradientem se analyzují zejména vyšší monokarboxylové a dikarboxylové kyseliny. Pro detekci se používá MS nebo UV detekce detektorem diodového pole (DAD) [6].

Pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí se stanovují dikarboxylové

kyseliny [7]. Mezi výhody této techniky patří vysoká rychlost analýzy, malé množství vzorku potřebné pro analýzu (v řádech nanolitrů), malá spotřeba elektrolytu a tedy nízké náklady na provoz [8]. Nejrozšířenější analytickou technikou pro stanovení monokarboxylových

a dikarboxylových kyselin ve vzorcích životního prostředí a v biologickém materiálu je plynová chromatografie. Mezi výhody této metody patří vysoká rozlišovací schopnost. Plynová chromatografie se v současné době nejčastěji kombinuje s hmotnostní spektrometrií (MS), tedy s nejlepší analytickou technikou pro identifikaci a kvantifikaci stopových množství organických látek. K detekci karboxylových kyselin lze také zvolit plamenově ionizační detektor (FID). Karboxylové kyseliny mají relativně vysokou teplotu varu a malou tepelnou stabilitu, proto jsou před analýzou derivatizovány na stabilnější deriváty [8].

2.1.4. Metody derivatizace karboxylových kyselin

Plynová chromatografie se používá pro separaci a detekci těkavých látek. Sloučeniny obsahující funkční skupiny s aktivním vodíkem (-SH, -OH, -NH, -COOH) tvoří intermolekulární vodíkové vazby. Tyto vodíkové vazby působí na vlastní těkavost sloučenin, které tyto vazby obsahují, ovlivňují jejich tendenci reagovat s materiály kolony a dále mají vliv na jejich tepelnou stabilitu, je tedy potřeba tyto vazby eliminovat. Modifikace funkční skupiny v molekule pomocí derivatizace umožňuje analýzu těchto látek. Mezi nejčastější derivatizační reakce patří silylace, esterifikace a dále reakce s alkyl chlorformiáty [9, 10].

2.1.4.1. Silylace

Silylace je častá derivatizační technika, využívaná v plynové chromatografii k přípravě vysoce těkavých a tepelně stabilních derivátů. Principem této reakce je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující polární skupinu s aktivním vodíkem. Nejčastější reakce jsou trimethylsilylační, kdy je aktivní vodík v molekule stanovované látky nahrazen trimethylsilylovou skupinou $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, tzv. TMS.

Schopnost různých funkčních skupin tvořit silylové deriváty je následující: alkoholy > fenoly > karboxylové kyseliny > aminy > amidy.

Silylační reakce se odehrávají za přítomnosti aprotického rozpouštědla, obvykle

v pyridinu, dimethylformamidu (DMF), dimethylsulfoxidu (DMSO), tetrahydrofuranu (THF) a acetonitilu (ACN) [11, 12, 13, 14]

TMS deriváty se snadno připravují a vykazují výborné chromatografické vlastnosti. Existuje široká škála silylačních činidel lišící se reaktivitou, selektivitou a charakterem vedlejších reakcí. TMS činidla i deriváty jsou náchylné k vlhkosti a jejich hydrolyzou běžně vzniká hexamethyldisiloxan. Pokud je v analyzovaném vzorku přítomna voda a nelze ji před analýzou odstranit, je nutné přidat mnohonásobné množství silylačního činidla, které působením vody zhydrolyzuje a tím ji ze vzorku odstraní. Další molekuly činidla pak mohou s analytem zreagovat. K dosažení vyšší hydrolytické stability derivátů se do látky místo TMS skupiny zavádí skupina *t*-butyl-dimethylsilylová (TBDMS). Také tepelná stabilita TBDMS derivátů je lepší než u TMS derivátů. Příprava TBDMS nachází uplatnění v oblasti analýzy sloučenin s relativně vysokou molekulovou hmotností (např. dlouhé řetězce nasycených kyselin), které vyžadují vyšší teplotu GC injektoru nebo v chromatografické koloně.

Jistou nevýhodou silylderivátů je zanášení elektrod a celého prostoru plamenově ionizačního detektoru (FID). Proto je nezbytné věnovat větší péči údržbě detektoru a průběžnému sledování jeho citlivosti, zvláště v souvislosti s kvantitativními analýzami. V tomto směru je výhodné používat činidla, která ve své molekule obsahují atom fluoru, který potlačuje depozice SiO_2 během FID detekce. Silylační činidla i deriváty mohou rovněž reagovat s aktivními vodíky obsaženými ve stacionární fázi kolony, což může vest k jejímu poškození [11, 12, 13, 14].

2.1.4.2. Reakce s alkyl chlorformiáty

Metoda derivatizace za použití alkyl chlorformiátů (ACF) je často používána pro její jednoduchost. Výhodou této reakce je, že trvá řádově pár minut a probíhá i při pokojové teplotě a ve vodném prostředí. Podmínkou pro správný průběh reakce je udržení zásaditého pH reakční směsi. Při reakci je potřeba použít katalyzátor (pyridin nebo 3 – pikolin). Použitím ACF se zvyšuje citlivost FID detektoru a zároveň se zlepšuje separace analytů, s úzce souvisejícími retencemi. [9, 10, 15, 16].

2.1.4.3. Esterifikace

Esterifikací se rozumí výměna aktivního vodíku za alifatickou nebo alifatickoaromatickou skupinu (např. benzyl). Výměna může být uskutečněna u organických látek obsahujících funkční skupinu –OH, –COOH, –NH, –SH a SO₃H. Některé reakce mohou být provedeny ve vodném prostředí.

Produkty reakcí jsou ve srovnání s původní látkou méně polární. Deriváty jsou také velmi stabilní a mohou být uchovávány po delší dobu. Reakce obvykle vyžadují přítomnost katalyzátoru, (typicky Ag₂O, BaO, NaH) a mnohdy i použití specifického rozpouštědla (DMF, DMSO). Dalším známým činidlem je *N,N*-dimethylformamid dimethylacetal [12].

Esterifikace představuje kondenzační reakci karboxylové skupiny kyseliny s hydroxylovou skupinou alkoholu nebo fenolu za vzniku esteru a vody. Nederivatizované kyseliny jsou reaktivní a vysoce polární sloučeniny, které v důsledku adsorpčních a nespecifických interakcí v koloně poskytují chvostující píky. Na druhé straně estery patří mezi látky s dobrými chromatografickými vlastnostmi. Jsou podstatně těkavější a méně polární, než jim odpovídající kyseliny, a proto bývá esterifikace, především v plynové chromatografii první volbou pro derivatizaci karboxylových kyselin. Aby měla reakce kvantitativní průběh, je třeba reakci kyseliny katalyzovat. Mezi oblíbené katalyzátory patří chlorovodík nebo trionylchlorid, které mohou být posléze rychle odstraněny s nadbytkem alkoholu. Dobře řízená esterifikace rovněž vyžaduje odstranění vzniklé vody užitím chemických činidel nebo azeotropní destilací. Mezi materiály odstraňující vodu patří molekulová síta, bezvodý síran nebo látky, které s vodou reagují (např. 2,2-dimethoxypropan) [12, 17].

Klasický postup esterifikace karboxylových kyselin z biologického materiálu zahrnuje v prvním kroku extrakci do organického rozpouštědla. Extrakce může probíhat buď v kyselém nebo zásaditém prostředí. Při kyselě katalyzované esterifikaci jsou volné kyseliny zahřívány v přebytku bezvodého organického rozpouštědla. Nejčastějším činidlem je 5% kyselina chlorovodíková v alkoholu. Při bazicky řízené esterifikaci jsou látky esterifikovány velmi rychle v bezvodém methanolu v přítomnosti bazického katalyzátoru. Nejběžnějším činidlem bazicky katalyzovaných reakcí je roztok methoxidu sodného v bezvodém methanolu. Dalšími používanými činidly jsou

methoxid draselný nebo hydroxid sodný v methanolu [18].

Dalším používaným činidlem je diazomethan, který rychle reaguje s kyselinami již v přítomnosti malého množství organického rozpouštědla. Roztok diazomethanu je stabilní pouze po krátkou dobu. Nevýhodou je vysoká toxicita tohoto činidla, jeho karcinogenita a potenciální explozivita. Při práci s diazometanem již není vhodné používat další činidla [18].

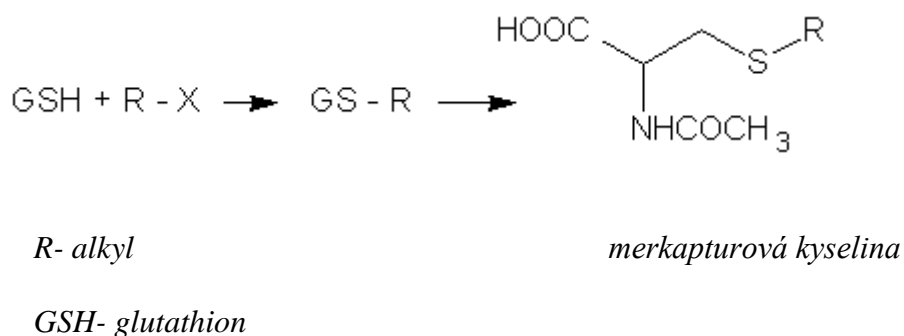
V této práci byl použit nově navržený postup esterifikace, který spočíval v působení derivatizačního činidla přímo na lyofilizovanou moč (in-matrix esterifikace). Látky není potřeba před derivatizací extahovat do organického rozpouštědla a stanovení je tak vhodné i pro velmi polární látky, které se aplikací běžného postupu esterifikace stanovují obtížně.

2.1.5. Merkapturové kyseliny

2.1.5.1. Objev a charakteristika merkapturových kyselin

Kyseliny merkapturové jsou kondenzační produkty vytvořené spojením aminokyseliny cysteinu s aromatickými sloučeninami. Jsou vytvářeny přes glutathion v játrech a jsou vylučována močí.

Některé látky a jejich metabolity se v těle konjugují s endogenními látkami za vzniku metabolitů, které jsou zpravidla polárnější než látky výchozí a proto se mohou snadněji vylučovat z těla ledvinami. Nejdůležitější z nich jsou konjugace s kyselinou glukuronovou, glutathionem a kyselinou sírovou. Zvláštní toxikologický význam má slučování látek s glutathionem. Při něm se elektrofilní látky váží na nukleofilní -SH skupinu glutathionu. Tato reakce je katalyzována enzymy glutathion-S-transferázami a modeluje kovalentní vazbu elektrofilních látek na nukleofilní místa v molekulách proteinů a nukleových kyselin, která často vede k toxicitě. Tvorba glutathionových konjugátů je tedy mírou jejich schopnosti atakovat za fyziologických podmínek biologicky významné makromolekuly a nepřímo také mírou rizika poškození zdraví při vniknutí dané látky do organismu. Vzniklé glutathionové konjugáty se dále metabolizují až na merkapturové kyseliny, deriváty N-acetylcysteinu [19].



Obr. 1- Schéma vzniku merkapturové kyseliny, převzato z [19].

K objevu merkapturových kyselin došlo ve dvou laboratořích v roce 1879. Členové Fyziologického ústavu na univerzitě v Berlíně E. Baumann a C. Preuss zkoumali metabolismus brombenzenového krmiva pro psy. Zjistili, že kromě síranu se v moči psů objevoval druhý metabolit obsahující síru, který pojmenovali jako merkapturovou kyselinu [20]. Kromě toho se zjistilo, že hydrolyzou tohoto metabolitu se získá kyselina octová a p-brom fenylmerkaptan. Ve stejném roce M. Jaffe, v Königsbergu, objasnil biotransformaci chlorbenzenu a jodobenzenu a zjistil, že i tyto látky tvoří merkapturové kyseliny [21]. Pouze o 5 let později E. Baumann oznámil správnou strukturu merkapturových kyselin, jako acetylcystein-konjugátů [22].

2.1.5.2. Merkapturové kyseliny ve vlastní experimentální práci

Jak již bylo zmíněno v úvodu, tato práce je zaměřena na kyseliny 2-hydroxyethylmerkapturovou (HEMA) a karboxymethylmerkapturovou (CMMA) [1.] Obě látky jsou močovými metabolity několika nebezpečných chemických látek, včetně vinylchloridu, ethylenoxidu, ethylendibromidu. Ethylenoxid je reaktivní epoxid, široce využívaný v průmyslu a při sterilizaci v nemocnici. Je genotoxický a karcinogenní jak pro zvířata, tak i pro lidi [23].

Ethylenoxid se váže na krevní proteiny, se kterými vytváří adukty. Jedním

z amino–aduktů ethylenoxidu je 2–hydroxyethylcystein (HEC), který je dále přeměňován právě na HEMA a CMMA.

V této práci byly studovány vzorky potkaních močí po intraperitoneálním podání 2–hydroxyethylcysteinu (4.).

2.1.6. Karboxylové kyseliny ve vlastní experimentální práci

Pro vlastní experimentální práci byl vybrán soubor karboxylových kyselin - od mono–karboxylových až po tri–karboxylové kyseliny. V souboru bylo původně 16 látek, kyselina FPMA byla ze souboru vyloučena a byla použita jako vnitřní standard. Výsledný soubor látek je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka č.1 - Soubor vybraných karboxylových kyselin pro vlastní experimentální práci

látka	CAS	Mw	počet -COOH skupin	počet -OH skupin	počet aromatických kruhů	bod varu [°C]
kyselina mléčná	50-21-5	90,08	1	1	-	122
kyselina β -hydroxymásečná	300-85-6	104,11	1	1	-	119
<i>p</i> -hydroxyfenyloctová	156-38-7	152,15	1	1	1	347
kyselina hippurová	495-69-2	179,17	1	-	1	240
kyselina malonová	141-82-2	104,03	2	-	-	157
kyselina šťavelová	144-62-7	90,03	2	-	-	149-160
kyselina jantarová	110-15-6	118,09	2	-	-	235
kyselina glutarová	110-94-1	132,12	2	-	-	200
kyselina adipová	124-04-9	146,14	2	-	-	338
kyselina jablečná	617-48-1	134,09	2	1	-	306
kyselina vinná	526-83-0	150,09	2	2	-	210
kyselina <i>t,t</i> - mukonová	3588-17-8	142,11	2	-	-	345
kyselina citronová	77-92-9	192,13	3	1	-	175
CMMA	26177-54-8	221,23	2	-	-	565
HEMA	97170-09-7	207,24	1	1	-	175
FPMA	331-93-1	257,28	1	-	-	495

Monokarboxylové kyseliny:

Kyselina mléčná: Kapalina dobře rozpustná ve vodě. Její L-enantiomer je koncovým produktem mléčného kvašení cukrů a je proto přítomen v kyselém mléku a zelí. Kyselina mléčná se užívá v potravinářském a koželužném průmyslu. Její anion, L-laktát, je významným metabolitem [24].

Kyselina β -hydroxymáselná: Bílý prášek. Je prekurzorem pro polyester, známý jako poly (β -hydroxybutyrát), který je také biologicky produkován bakterií *Alcaligenes eutrophus* [25].

Kyselina *p*-hydroxyfenyloctová: Bílý prášek, nalezený v olivovém oleji a pivu [26]. V chemickém průmyslu je jako meziprodukt používán pro syntézu atenololu a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové [27].

Kyselina hippurová: Vyskytuje se v moči koní a jiných býložravců. Kyselina hippurová krystalizuje v kosočtvercové hranoly, které jsou snadno rozpustné v horké vodě. Vysoká koncentrace kyseliny hippurové může způsobit intoxikaci [28].

Dikarboxylové kyseliny

Kyselina malonová: Bílé krystaly nebo krystalický, ve vodě rozpustný prášek. Sublimuje ve vakuu [29].

Kyselina šťavelová: Bezbarvá krystalická pevná látka, rozpustná ve vodě [30]. Je redukčním činidlem a její konjugovaná báze (oxalát), je chelatační činidlo pro kovové kationty [31].

Kyselina jantarová: Je důležitý biochemický meziprodukt, který se vyskytuje u všech živých tvorů. Stejně jako ostatní jednoduché, mono- a di-karboxylové kyseliny se nepovažuje za nebezpečnou, i když může dráždit pokožku [32].

Kyselina glutarová: Je společným prekurzorem pro polyesterů, vyráběných hydrogenací kyseliny glutarové a jejích derivátů [31].

Kyselina adipová: Z průmyslového hlediska nejdůležitější dikarboxylová kyselina. Ročně se tohoto bílého krystalického prášku vyrobí okolo 2,5 bilionu kilogramů. Slouží zejména jako prekurzor při výrobě nylonu [31].

Kyselina jablečná: Je meziproduktem citrátového cyklu a procesu fixace oxidu

uhličitého u C4 a CAM rostlin. Oxidací kyseliny jablečné vzniká kyselina oxaloctová [1].

Kyselina vinná: Samotná kyselina i její deriváty mají nepřeberné množství využití v oblasti léčiv. Využívá se při výrobě šumivých solí a v kombinaci s kyselinou citronovou za účelem zlepšení chuti perorálních léčiv [33]. Kyselina vinná se využívá také v pěstování. Využívá se v zemědělství a v odětvích hutnictví, jako chelatační činidlo po komplexotvorné mikroživiny půdních hnojivech a pro čištění kovových povrchů, skládajících se z hliníku, mědi, železa a slitin těchto kovů [31].

Kyselina *t,t* – mukonová: Je metabolitem benzenu u lidí, je proto používána jako biomarker expozice benzenu, jak v pracovním prostředí, tak v životním prostředí [34].

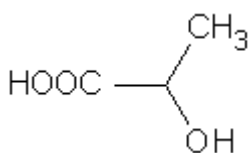
Trikarboxylové kyseliny:

Kyselina citronová: Vyskytuje se ve velkém množství v ovoci, hlavně v ovoci citrusových plodech. Citrony a limety mají obzvláště vysoké koncentrace této kyseliny. Může představovat až 8% hmotnosti sušiny těchto plodů [35].

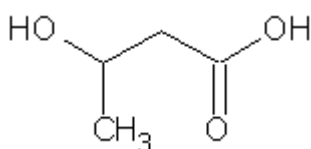
Merkapturové kyseliny:

HEMA: Světle hnědý olej.

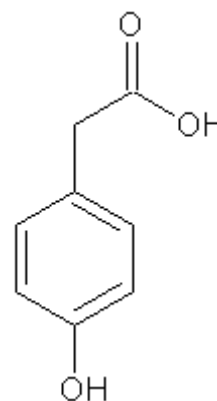
FPMA: Bílý, až nažloutlý prášek, důležitý metabolit benzenu.



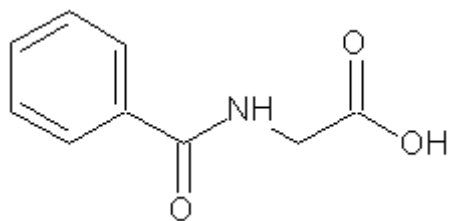
kyselina mléčná



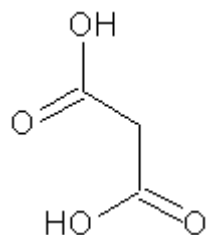
kyselina β -hydroxymáselná



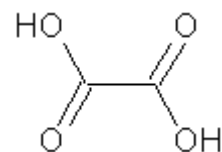
kyselina *p*-hydroxyfenyloctová



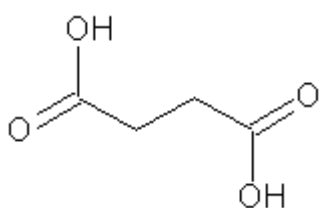
kyselina hippurová



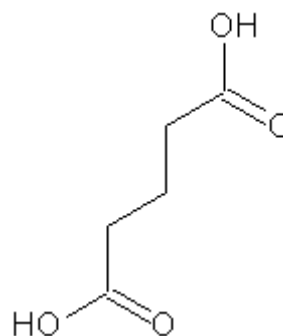
kyselina malonová



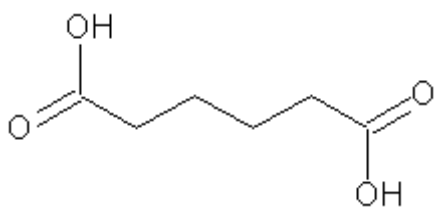
kyselina šťavelová



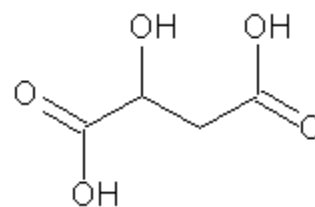
kyselina jantarová



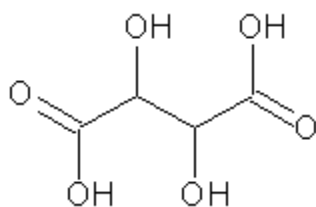
kyselina glutarová



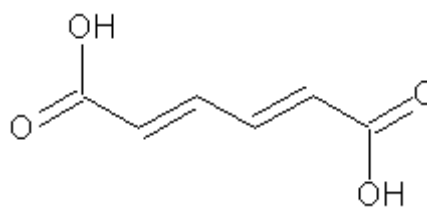
kyselina adipová



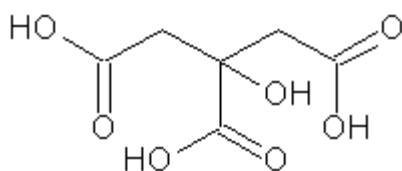
kyselina jablečná



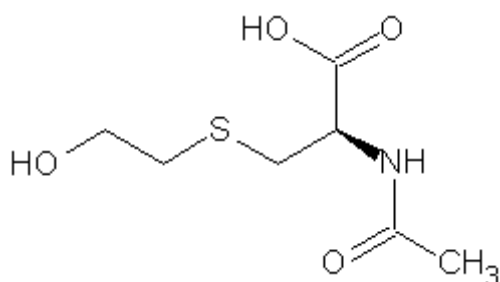
kyselina vinná



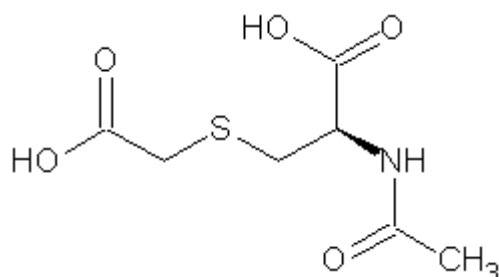
kyselina *t,t*-mukonová



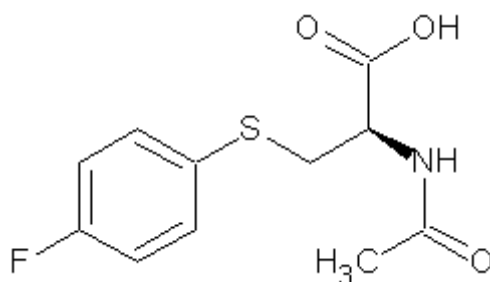
kyselina citronová



kyselina hydroxyethylmerkapturová (HEMA)



kyselina karboxymethylmerkapturová (CMMA)



kyselina *p*-fluorofenylmerkapturová (FPMA)

Vzorke kyselin byly vytvořeny v programu ACD/ChemSketch

2.2. Biologické monitorování

Hlavními oblastmi využití biologického monitorování je měření expozice na pracovištích, ověření ochranných opatření a osobních ochranných prostředků a vyšetření v rámci preventivních prohlídek. Mezi nejčastěji prováděná vyšetření v ČR patří v současné době stanovení kyseliny hippurové, kyselin methylhippurových a kyseliny mandlové v moči, které jsou ukazateli expozice toluenu, xylenům a styrenu.

Biologické monitorování, nebo biologické expoziční testy, zahrnují monitorování sledované látky nebo jejích metabolitů přímo v organismu - v tzv.

biologickém materiálu. Nejčastějším biologickým materiálem bývá krev a moč. Stanovovaná látka se označuje jako biomarker (ukazatel) expozice. V oblasti biologických expozičních testů se využívá tzv. biologický limit (BL), který vyjadřuje povolenou koncentraci měřeného indikátoru dávky nebo účinků většinou v moči. Biologický limit odpovídá takové úrovni expozice, o níž se podle současných vědeckých poznatků předpokládá, že ani při dlouhodobém každodenním opakování nepoškodí zdraví exponovaných osob. Biologické limity jsou navrhovány tak, aby byly v souladu s přípustnými expozičními limity (PEL), pro koncentraci výchozích škodlivin v pracovním ovzduší. Vyšetření, jehož výsledek je porovnatelný s biologickým limitem, se nazývá biologický expoziční test (BET) [36].

2.2.1. Metabolické profilování

Metabolické profilování, neboli metabolomika, je měření v biologických systémech komplementu nízkomolekulárních metabolitů a jejich meziproductů, které odráží dynamickou odezvu na genetické modifikace a fyziologické, patofyziologické nebo vývojové podněty. Měření a interpretace endogenního metabolického profilu biologického vzorku (typicky moči nebo séra) poskytla mnoho možností, jak prozkoumat změny vyvolané vnějšími podněty (například léčba drogové závislosti).

Na buněčné úrovni mohou podněty, jako jsou léky, dietní změny, endogenní hormony nebo chemické látky vyvolat sled biochemických reakcí, zahrnující aktivaci receptoru, genovou transkripci a translaci do proteinových produktů. Nesčetné množství buněčných biochemických interakcí vytváří obrovskou a komplexní řadu metabolitů. Mnoho z těchto metabolitů přechází do krevního oběhu a také moči, kde jsou přístupné technologiím metabolického profilování [37].

Močové organické kyseliny jsou kategorií, která odráží mnoho důležitých metabolických cest – aminokyselin, lipidů, sacharidů, biogenních aminů a bakteriálních konečných produktů. Onemocnění, jako methylmalonová acidurie, onemocnění „javorový sirup“ a glutarová acidurie byly snadno detegovány analýzou denaturovaných nebo silylovaných extraktů. Většina z těchto genetických poruch má v běžné populaci nízký výskyt a více než 99 % zkoumaných vzorků odhaluje velmi zajímavé profily, které se často mění s průběhem nemoci a s pacientovým stavem [38].

2.2.3. Biologické monitorování merkapturových kyselin

V posledních letech bylo identifikováno mnoho nových merkapturových kyselin a byly objasněny jejich metabolické cesty. Teoreticky může být v lidském těle syntetizováno neomezené množství merkapturových kyselin. Jakýkoliv elektrofilní produkt přítomen v těle, ať vstřebán ze životního prostředí, či odvozený z oxido–redukčních metabolických procesů v játrech, či jiných orgánech, „najde“ v glutathionu –SH skupinu, kde může ke konjugaci dojít spontánně nebo může být katalyzován enzymem glutathion–S–transferázou.

V roce 1879 bylo zjištěno, že u laboratorních zvířat některé halogenované uhlovodíky vedly ke specifické syntéze merkapturových kyselin. Nicméně po mnoho let tato informace v průmyslové toxikologii použita nebyla. V poslední době bylo několik merkapturových kyselin považováno za biomarkery v biologickém monitorování profesionálních expozic. Tento počet je ovšem omezený. Omezené použití merkapturových kyselin v profesním monitoringu je způsobeno nízkou znalostí syntézy těchto látek, specifické analýzy těchto látek vyžadují obecně komplikované metody, které nejsou vhodné pro screening velkého počtu pracovníků a pouze málo merkapturových kyselin prokázalo lepší farmakokinetické vlastnosti, než ostatní metabolity ze stejného mateřského produktu. Přesto se některé merkapturové kyseliny používají při profesním monitorování expozici benzenu (kyselina fenylmerkapturová), styrenu (kyselina 2–fenyl, 2–hydroxyethylmerkapturová a kyselina 1–fenyl, 2–hydroxyethylmerkapturová), toluenu (kyselina S–4–toluylmerkapturová), *N,N*–dimethylformamidu (*N*–methylkarbamoyl), perchlorethenu (kyselina trichlorvinylmerkapturová), trichlorethylenu (kyselina 2,2- a 1,2–dichlorvinylmerkapturová), 1,3dichlorpropenu (kyselina *Z*- a *E*-3–chloro–2–propenylmerkapturová) a akrylonitrilu (kyseliny karboxymethylmerkapturová, 2–hydroxyethylmerkapturová a kyselina 1–kyano–2–hydroxyethylmerkapturová).

Analýza merkapturových kyselin v moči není lehkou otázkou, protože je jich velké množství a jejich struktura je podobná. *N*–acetylovaný cystein je pro všechny merkapturové kyseliny totožný. Výsledné merkapturové kyseliny jsou vždy hydrofilní, aby mohly být vyloučeny do moči, kde jsou smíchány se spoustou jiných organických produktů, od kterých je obtížně je poté separovat. Byly navrženy GC a HPLC metody pro stanovení merkapturových kyselin v moči, ale většina těchto metod je příliš drahá a časově náročná. Důležitou úvahou je, že většina metod

pro analýzu těchto látek byla navržena pro kinetické studie na laboratorních zvířatech s rozdílným množstvím podané látky. Dokud byly kyseliny v moči detekovány ve vysokých koncentracích, analýzy se prováděly relativně lehce. Situace ale byla komplikovanější, pokud se analyzovaly vzorky od pracovníků, exponovaných dávkami 100 – 1000krát nižšími, než u zvířat. Metody, používané na zvířecí vzorky se většinou na vzorky lidské použít nedaly. V tabulce č. 2 jsou shrnuty metody analýzy merkapturových kyselin v lidské moči. Většina z nich dává uspokojivé výsledky, většinou jde ale o metody komplikované a časově náročné.

Tabulka č. 2 - Hlavní analytické metody pro stanovení různých merkapturových kyselin v moči lidí, exponovaných průmyslovými polutanty, převzato z [39]

mateřská látka	merkapturová kyselina (MK)	metoda	detekční limit [ng/l]
benzen	S-fenyl MK	GC/ECD	60
		GC/MS	1000
		GC/MS	5000
		HPLC/UV	-
		HPLC fluorescenční	500
		LC /EC/MS/MS	100
toluen	S-fenyl MK	GC/ECD	64
		HPLC/ESI/MS	3200
styren	1 (a 2)-fenyl-2-hydroxyethyl MK	HPLC/UV	7000
		LC/ESI/MS/MS	700 – 1000
		TLC	100 (každá)
o-xylen	<i>o</i> -methylbenzyl MK	HPLC/ESI/MS	3000
trimethylbenzen	2,3- a 2,6-dimethylbenzyl MK	HPLC/ESI/MS	5500
	3,4-dimethylbenzyl MK	HPLC/ESI/MS	2400
1,3-butadien	1,2-dihydroxybutyl MK	LC/NECI/MS/MS	5000
	mono-hydroxy-butenyl MK	LC/NECI/MS/MS	-
Trichlorethylen	dichlorovinyl MK	GC/MS	10 320
	dichlorovinyl MK	GC/MS	12 900
tetrachloroethylen	trichlorovinyl MK	GC/NCI/MS	250 000
Cis-1,3-dichloropropen	Cis-chloro-2-propenyl MK	GC/MS	-
Z a E-1,3-dichloropropen	Z a E-3-chloro-2-propenyl MK	GC/sulfur detektor	100 000
		GC/NPD	-
		GC/TSI nebo MS	30 000
		GC/MS	300 000
		HPLC	1 320 000
N,N-dimethylformamid	N-methylkarbamoyl MK	HPLC	1 800 000
		HPLC	1 800 000
akrylonitril	2-kyanoethyl MK	GC/FID	1 000 000

Kromě metod shrnutých v tabulce č. 2 byl navržen postup, který teoreticky umožňuje analýzu všech merkapturových kyselin. Spojení pentafluorbenzyl bromidu s kyselým cysteinovým zbytkem umožňuje přeměnu merkapturové kyseliny v produkt, potencionálně detegovatelný pomocí GC/ECD. Tato metoda byla aplikována na kyseliny S-fenylmerkapturové a benzylmerkapturové. Prvním krokem stanovení je acidifikace vzorku moči koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Byl přidán vnitřní standard rozpuštěný v akrylonitrilu. Vzorek byl opakovaně extrahován do ethylacetátu, který byl poté odpařen dusíkem. Alikvotní díl akrylonitrilu byl použit pro rozpuštění odparku. Methylace vzorku byla provedena přidáním diisopropylaminu a pentafluorbenzyl bromidu. Vzorky se poté derivatizovaly při 40°C po dobu 35 minut a byla zastavena přidáním vody. Tento krok byl následován druhou opakovanou extrakcí, tentokrát pomocí hexanu. Přítomnost interferujícího píku ukázalo na nutnost další purifikace vzorku pomocí HPLC. Teoreticky tato metoda může být použita pro analýzu všech merkapturových kyselin, tento postup je ale náročný a drahý.

Byla navržena další analytická GC/MS metoda s několika úpravami, která by se dala považovat za jedinou oficiální metodu pro stanovení merkapturových kyselin. Vzorek moči byl acidifikován při hodnotě pH nižší než 2 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Do vzorku se přidal vnitřní standard. Vzorek se extrahoval dvakrát pomocí ethylacetátu v samostatných nálevkách. Jednotlivé extrakty se spojily a odstředily při 300 ot/min po dobu 20 min v rotační odparce při teplotě 40°C. Odstraněné rozpouštědlo bylo poté vysušeno dusíkem. Zbytek se rozpustil v methanolu a přidal se roztok diazomethanu. Takto připravený vzorek se poté nechal reagovat po dobu 1 hodiny a byl analyzován pomocí GC/MS.

Tato metoda je přesná (mez detekce je 1 mg/l analytu) a umožňuje skladování biologického vzorku při teplotě 4°C po dobu 5 dní nebo při teplotě -20°C po dobu až 6 měsíců. Možné chyby mohou být způsobené nízkým použitým rozmezím hmotností hmotnostního spektrometru, kvalitou ethylacetátu, který může obsahovat stopy oxidačních činidel a stabilitou hmotnostního spektrometru, která je kritickým faktorem tohoto stanovení. Hlavní nevýhodou tohoto stanovení je použití diazomethanu, který je známým karcinogenem.

Pro stanovení dalších merkapturových kyselin byl tento postup různě modifikován [39].

3. Experimentální část

Experimentální část zahrnuje zavedení základního analytického postupu pro stanovení karboxylových kyselin, provedení modelových experimentů s lyofilizovanou močí (přídavek derivatizačního činidla do moči, odpaření činidla, rozpuštění vzorku a jeho extrakce do ethylacetátu, odpaření rozpouštědla a následná GC/FID a GC/MS analýza), s přídavkem analytů, a nakonec aplikace metodiky na reálné vzorky moče potkanů, kterým byl podán 2-hydroxyethylcystein. Zároveň byla testována použitelnost metodiky pro stanovení širšího souboru karboxylových kyselin, Na základě předběžné analýzy byl sestaven reprezentativní soubor 12 karboxylových kyselin s různým počtem karboxylových a hydroxylových skupin, jejichž směsný roztok o známých koncentracích byl přidáván do vzorků potkaní moči a analyzován nově zavedeným postupem. Byly podchyceny kritické body celého stanovení a postup byl aplikován na merkapturové kyseliny samotné a poté na reálné exponované vzorky.

3.1. Přístroje a chemikálie

Přístroje: vortex IKA MS3 basic

vyhřívací blok IsoTemp 125 D, Fisher Scientific

centrifuga Hettich Zentrifugen EBA 20

plynový chromatograf Agilent 6890N s plamenově ionizačním detektorem

plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostně spektrometrickým detektorem 5975C

lyofilizační zařízení Fynn-Ley

předvážky Kern 440 – 33N

analytické váhy Mettler AE 240

Chemikálie: ethanol, Penta

ethylacetát, Merck

isooktan, Aldrich Chemical Company, čistota 99,5 %

síran sodný bezvodý, Lach-ner s.r.o.

kyselina jantarová, Medika

kyselina glutarová, LaChema Brno, čistota 99%

kyselina *t,t* - mukonová, Fluka, čistota 97%
kyselina šťavelová, LeChema Brno
kyselina hippurová, Sigma Aldrich Company, čistota 99%
kyselina jablečná, Spolek pro chemickou a hutní výrobu
kyselina β -hydroxymáselná, Aldrich Chemical Company, čistota 95%
kyselina *p*-hydroxyfenyloctová, Sigma Aldrich Company
kyselina mléčná, LaChema Brno, čistota 89%
kyselina malonová, zásoby SZÚ
kyselina vinná, zásoby SZÚ
kyselina adipová, zásoby SZÚ, čistota 99%
kyselina *p*-fluorofenylmerkapturová (FPMA), zásoby SZÚ
kyselina 2-hydroxyethylmerkapturová (HEMA), syntetizováno na katedře organické chemie VŠCHT, dodáno ve formě vodného roztoku
kyselina karboxymethylmerkapturová (CMMA), syntetizováno na katedře organické chemie VŠCHT, dodáno ve formě vodného roztoku

3.2. GC analýza

3.2.1. GC/FID analýza

Stanovení byla provedena na přístroji Agilent 6890N s plamenově ionizačním detektorem. Vzorky byly analyzovány na koloně DB – 5MS UI (délka 30 m, vnitřní průměr 250 μ m a tloušťka filmu 0,25 μ m) od firmy J&W Scientific. Nosným plynem byl dusík o průtokové rychlosti 1,5 ml/min. Analýzy byly prováděny v režimu splitless. Teplota injektoru: 250 °C. Teplota detektoru: 250 °C. Teplota kolony se pro jednotlivá stanovení lišila. Pro analýzy vzorků bez matrice byla teplota kolony 80 – 250 °C s teplotním gradientem 20 °C/min do 140 °C a poté 10 °C/min do 250 °C. Pro analýzy vzorků s matricí a ethanolem a isooktanem jako rozpouštědlem byla teplota kolony 80 – 300 °C s teplotním gradientem 20 °C/min do 140 °C a poté 10 °C/min do 300 °C. A pro analýzy vzorků s matricí a ethylacetátem jako rozpouštědlem byla teplota kolony

60 – 300 °C s teplotním gradientem 20 °C/min do 140 °C a poté 10 °C/min do 300 °C. Doba jedné analýzy byla 23 minut.

3.2.2. GC/MS analýza

Stanovení byla provedena na přístroji Agilent 7890A s hmotnostně spektrometrickým detektorem. Vzorky byly analyzovány na koloně DB – 5MS UI (délka 30 m, vnitřní průměr 250 µm a tloušťka filmu 0,25 µm) od firmy J&W Scientific. Nosným plynem bylo helium o průtokové rychlosti 2,5 ml/min. Analýzy byly prováděny v režimu splitless. Teplota injektoru: 250 °C. Teplota detektoru: 150 °C. Teplota kolony byla 60 °C s teplotním gradientem 20 °C/min do 140 °C a poté 10 °C/min do 300 °C. Doba jedné analýzy byla 23 minut. Hmotnostní rozsah detektoru: 25 – 300.

3.3. Příprava roztoků

3.3.1. Příprava derivatizačního činidla EtOH·HCl

Molekulové síto bylo v sušárně sušeno při 200 °C po dobu 2 hodin. Poté bylo nasypáno do prázdných baněk tak, aby bylo zakryté dno a bylo ponecháno přes noc. Poté byla sestrojena aparatura na vyvíjení plynů, která se skládala ze 100ml slzy s bočním vývodem, přikapávací nálevky s bočním vývodem a velkou a malou promývačkou s fritou.

Do slzy bylo odváženo 20 chloridu sodného a přilito 20 ml kyseliny chlorovodíkové. Do velké promývačky se dala koncentrovaná kyselina sírová a do malé promývačky vysušený ethanol. Malá promývačka i s alkoholem byla zvážena na předvážkách. Z horní nálevky se přikapávala koncentrovaná kyselina sírová a plyn se začal vyvíjet. Zároveň se pomocí pH papírku kontrolovalo, zda z promývačky s etanolem na konci aparatury neunikají žádné kyselé páry. Příprava se prováděla dvakrát.

Tímto postupem byly získány dva zásobní roztoky. Z přírůstku hmotnosti ethanolu po rozpuštění kyseliny chlorovodíkové byly stanoveny jejich koncentrace, které činily 11,9 mol/l a 13,3 mol/l.

Z prvního roztoku o koncentraci 11,9 mol/l bylo do 10ml zkumavky

odpipetováno 840 μl a roztok byl doplněn 9,160 μl vysušeného ethanolu na výslednou koncentraci 1,0 mol/l. Takto zředěný roztok derivatizačního činidla byl použit k vlastním analýzám.

Analogickým postupem byly připraveny i derivatizační činidla MeOH·HCl, PrOH·HCl a IsoButOH·HCl.

3.3.2. Příprava zásobních roztoků jednotlivých kyselin

Roztoky pevných látek (1 mg/ml) byly připraveny navážením 2 mg dané látky na analytických vahách a rozpuštěním ve 2 ml destilované vody. Roztoky kapalných látek (kyselina mléčná a kyselina β -hydroxymáselná) byly připraveny odpipetováním 20 μl dané látky a doplněny 2 ml destilované vody. Koncentrace jednotlivých látek v analyzovaných byla 5, 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.3. Příprava směšného roztoku kyselin

Pro přípravu směšného roztoku byla připravena nová sada zásobních roztoků o koncentraci 10 mg/ml. Z takto připravených roztoků bylo do 20ml Erlemayerovy baňky odpipetováno po 1 ml kyselin mléčné, šťavelové, citronové, glutarové, hippurové, β -hydroxymáselné, *p*-hydroxyfenyloctové, *t,t*-mukonové a adipové (finální koncentrace ve směšném roztoku činila 500 $\mu\text{g/ml}$), dále 2 ml kyseliny jablečné (finální koncentrace ve směšném roztoku činila 1 mg/ml), a 3 ml kyseliny vinné, jantarové a malonové (finální koncentrace ve směšném roztoku činila 1,5 mg/ml).

3.3.4. Příprava zásobních roztoků HEMA a CMMA

Roztoky látek HEMA a CMMA byly připraveny a analyzovány zvlášť kvůli jejich omezenému množství. Původní zásobní roztok CMMA o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ nebylo potřeba dále ředit. Původní zásobní roztok HEMA o koncentraci 1 mg/ml byl zředěn na koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.5. Příprava roztoku FPMA jako vnitřního standardu

Do 10ml zkumavky se odvážilo 10 mg FPMA a přidalo se 5 ml destilované vody. K jednotlivým analýzám bylo odebíráno 100 μl roztoku a jeho koncentrace

v analyzovaných vzorcích činila 20 µg/ml.

3.4. Postup derivatizace jednotlivých kyselin

Ze zásobních roztoků kyselin o koncentraci 1mg/ml bylo do 2ml vialek odpipetováno 5,10 a 20 µl daných látek. Koncentrace látek tedy byly 5,10 a 20 µg/ml. Vzorky se dusíkem odふうaly dosucha. K odparkům bylo přidáno 100 µl 1M derivatizačního činidla EtOH·HCl. Poté byly vzorky vloženy na 1 hodinu do vyhřívacího bloku o teplotě 50 °C. Po ukončení derivatizace byly vzorky znovu odふうány dusíkem dosucha a poté rozpuštěny ve 20 µl vysušeného ethanolu a 200 µl isooktanu. Takto připravené vzorky byly dále analyzovány plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem. Změřením jednotlivých vzorků kyselin byla zjištěna jejich retenční časy a charakteristické odezvy (Tab. 3),(Obr. 3).

Stejným postupem byla analyzována i připravená směs kyselin o koncentraci 50 a 100 µg/ml (respektive dvojnásobné koncentrace pro kyselinu jablečnou a trojnásobné pro kyseliny vinnou, jantarovou a malonovou), (3.3.3.). Pro analýzu bylo odebíráno 100 a 200 µl.

3.5. Provedení modelových experimentů

3.5.1. Postup lyofilizace

Zmrazená potkaní moč byla rozpuštěna při pokojové teplotě a poté naředěna destilovanou vodou v poměru 1:1. Z takto naředěné moči se k vlastní lyofilizaci do 4ml vialek odebíral 1 ml vzorku. Kromě kontrolních močí byly vzorky ospikovány roztoky kyselin nebo směsí kyselin podle aktuální potřeby. Dále bylo přidáno 100 µl roztoku FPMA, který při všech analýzách sloužil jako vnitřní standard. Vzorky byly vloženy do misky se suchým ledem, který byl přelit lihobenzinem. Po vytvoření ledové krustičky na povrchu byly vzorky zabezpečeny gázou a byly ještě na 15 min vloženy do lednice o teplotě -80 °C. Poté byly vzorky vloženy do přístroje a nechaly se přes noc lyofilizovat.

3.5.2. Provedení modelového experimentu pro směs kyselin přítomných v matrici (výchozí postup)

Ke vzorkům lyofilizované moči ve 4ml vialkách bylo přidáno 400 μ l 1,0M derivatizačního činidla EtOH·HCl. Vzorky se nechaly reagovat v bloku při 50 °C po dobu 1 hodiny a byly průběžně každých 10 minut protřepávány. Poté se vzorky odfoukaly dusíkem dosucha a odparky byly rozpuštěny v 1 ml destilované vody. K rozpuštěným odparkům bylo přidáno 1,5 ml ethylacetátu a vzorky se nechaly 5 min promíchávat na vortexu. Dále byly vzorky stočeny v centrifuze po dobu 5 minut při 5000 otáčkách za minutu. Do 2ml vialek byla odebrána celá ethylacetátová vrstva, která se poté opět odfoukala dusíkem dosucha. K odparkům bylo přidáno 10 μ l vysušeného ethanolu, 100 μ l isooktanu a vzorky byly změřeny pomocí GC/FID.

Jelikož některé látky při GC/FID analýze neposkytovaly dostatečné odezvy pro jejich spolehlivou identifikaci, byly vzorky analyzovány také pomocí GC/MS.

Tento postup pro stanovení karboxylových kyselin v moči byl ale nevyhovující, docházelo k velkým ztrátám látek při druhém odfoukávání, odparky se obtížně rozpouštěly a GC/FID analýza neposkytovala statisticky správné výsledky, některé parametry stanovení byly změněny (3.6.3.), (4.).

3.5.3. Provedení výsledného modelového experimentu pro směs kyselin v matrici

Tento postup se od předchozího lišil v několika krocích. Po prvním odfoukání vzorků dusíkem a jejich rozpuštění v destilované vodě byly přidány 3 ml ethylacetátu a po stočení vzorků v centrifuze bylo přeneseno 2,5 ml ethylacetátové vrstvy do 10ml zkumavek. Do všech zkumavek byl přidán 1g bezvodého síranu sodného, vzorky byly promíchány, nechány 1 minutu odstát při pokojové teplotě a poté byly stočeny v centrifuze po dobu 2 minut při 5000 otáčkách za minutu. Ze vzorků se poté do 2ml vialek odebrala pomocí vysušená ethylacetátová vrstva a vzorky byly odfoukány dusíkem dosucha. Posledním rozdílem oproti původnímu postupu bylo rozpouštění výsledných odparků. Vzorky byly rozpuštěny pouze ve 300 μ l vysušeného ethylacetátu. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí GC/FID a GC/MS (4.).

Současně s modelovým experimentem pro směs látek v matrici se stejným postupem analyzovaly i neospikované potkaní moče, které sloužily jako vzorky

kontrolní.

3.5.4. Provedení experimentu na reálných vzorcích potkaní moči

Pro tyto analýzy byly použity vzorky moči potkanů, exponovaných 2-hydroxyethylcysteinem (HEC). Sada vzorků obsahovala čtyři vzorky potkaní moči, odebrané před expozicí (vzorky kontrolní). Jeden z nich byl ospikován HEMA a CMMA o odstupňovaných koncentracích a byl použit pro přípravu kalibračních vzorků. Další čtyři vzorky byly odebrány jeden den po expozici a čtyři vzorky dva dny po expozici a analyzovaly se samostatně.

Zásobní roztoky HEMA a CMMA o koncentraci 100 µg/ml byly zředěny na koncentrace 10 µg/ml a 1 µg/ml. Do vybraného vzorku před expozicí (1 ml) bylo přidáno 50, 100, 200 a 500 µl takto připravených roztoků. Koncentrace látek ve vzorcích tedy činily 0,1;0,2; 0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 µg/ml.

Zásobní roztok FPMA byl zředěn na koncentraci 10 µg/ml. Z takto zředěného roztoku vnitřního standardu se k analýzám odebíralo 50 µl a byl přidán do všech analyzovaných vzorků této sady. Koncentrace vnitřního standardu v analyzovaných vzorcích činila 0,5 µg/ml.

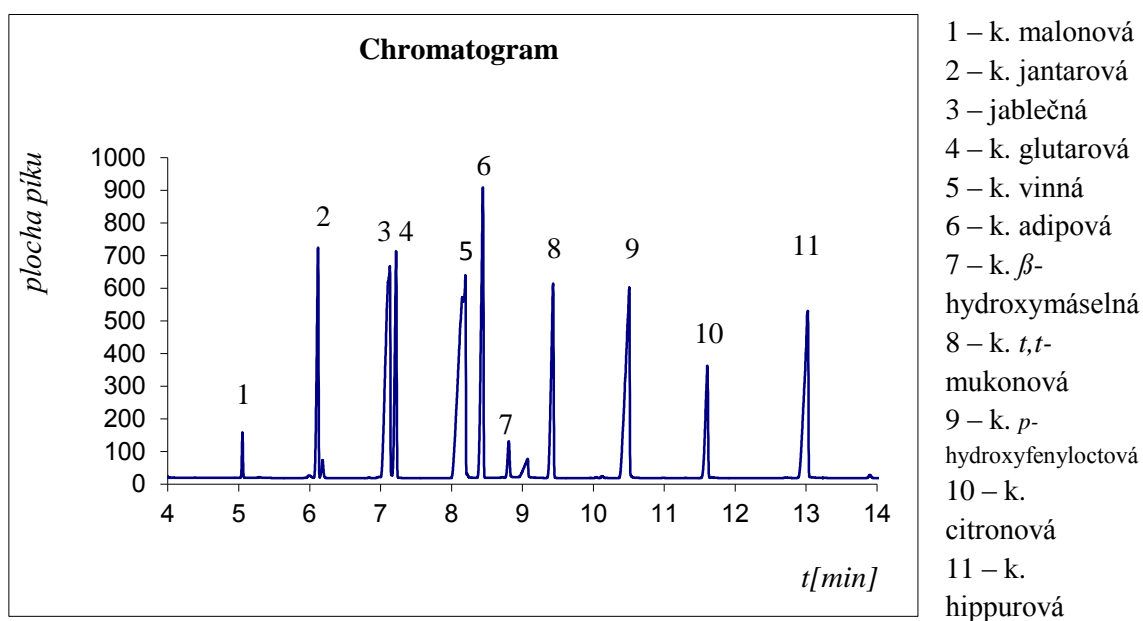
Analýza této sady vzorků probíhala již pouze pomocí GC/MS.

4. Výsledky a diskuze

Vybraný soubor testovacích karboxylových kyselin byl derivatizován činidlem EtOH·HCl postupem v základním provedení (3.6.2.) a pro vytvořené estery byly naměřeny jejich retenční časy (Tab. 3) a charakteristické odezvy, na jejichž základě byla poté sestavena vhodná směs. Bylo zjištěno, že kyseliny mléčná a šťavelová se v průběhu stanovení zcela ztrácejí. Jejich přítomnost nebyla potvrzena ani analýzou GC/FID, ani analýzou GC/MS. Chromatogram je ukázán obrázku č. 2.

Tabulka č. 3 - Retenční časy jednotlivých karboxylových kyselin

látka	R _t [min]
kyselina malonová	5,052
kyselina jantarová	6,117
kyselina jablečná	7,128
kyselina glutarová	7,218
kyselina vinná	8,194
kyselina adipová	8,441
kyselina β-hydroxymáselná	8,807
kyselina t,t-mukonová	9,430
kyselina p-hydroxyfenyloctová	10,504
kyselina citronová	11,607
kyselina hippurová	13,021



Obr. 2 – Chromatogram směsi karboxylových kyselin bez matrice

Připravená směs byla přidávána do potkaní moči a byla analyzována výchozím postupem (3.6.2.), pomocí kterého byl testován vliv délky odfoukávání na koncentrace látek ve vzorku. První sada vzorků byla odfoukávána přesně dosucha, u druhé sady vzorků bylo odfoukání přetaženo o 30 minut. Porovnání výsledků prvního a druhého odfoukání naznačovalo, že přetažené první odfoukání ke ztrátám analytů nevede (látky pravděpodobně drží matice), přetažené druhé odfoukání ke ztrátám vede. Dále bylo zjištěno, že vzhledem k reálným (a tímto měřením právě zjištěným) koncentracím analytů v kontrolní moči jsou použité přídavky jednotlivých analytů (5 a 10 µg/ml) příliš nízké. Často nebyl vůbec vidět trend nárůstu v sekvenci 0 - 5 - 10 µg/ml.

Z výsledků těchto analýz bylo zřejmé, že takto provedený postup je pro stanovení karboxylových kyselin v moči nevhodný. Po druhém odfoukání zůstával na dně vialky materiál, který se kvůli obsahu vody špatně dosušoval, a také bylo obtížné přesně určit konec odfoukávání. Výsledky jednotlivých analýz navíc nebyly reprodukovatelné ani v rámci tripletů. Tyto problémy se při zpracování novým postupem (3.6.3.) eliminovaly tak, že se vzorek extrahoval větším objemem ethylacetátu, díky čemuž se poté mohl odebrat jen bezpečný objem extraktu, který byl před druhým odfoukáváním ještě vysušen síranem sodným.

Jak již bylo řečeno, 1. odfoukávání ke ztrátám analytů nevedlo. Vzorky byly tedy zpracovány novým postupem a byl testován pouze vliv 2. odfoukání.

V tabulkách č. jsou uvedeny výsledky analýz, zpracovaných novým postupem. Veškeré vzorky byly analyzovány v tripletu.

Tabulka č. 4 - Naměřené hodnoty ploch píků, provedené novým postupem pro kontrolní vzorky, odfoukávání právě dosucha

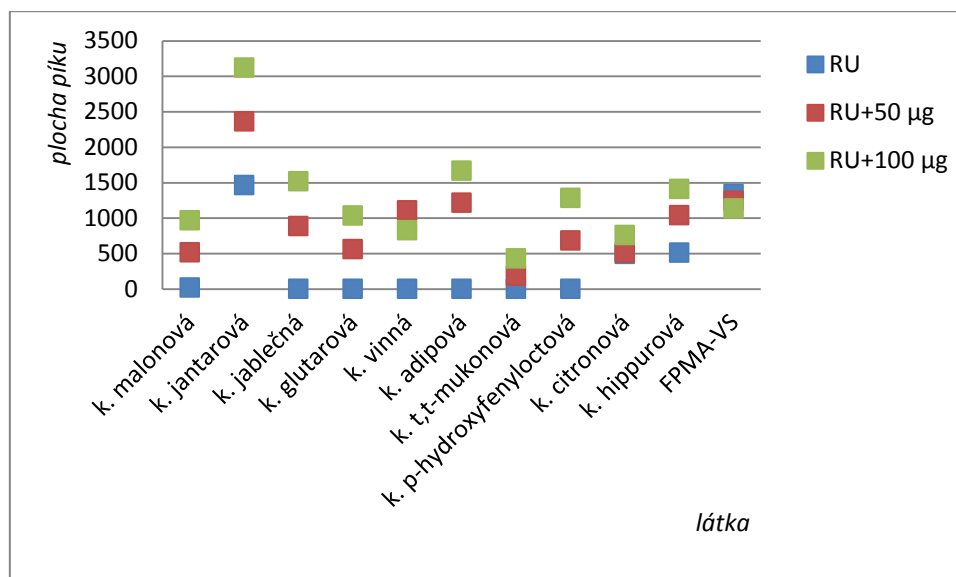
Látka	kontrola			arit. průměr
	vz.a	vz.b	vz.c	
k. malonová	16,6	19,1	22,3	19,3
k. jantarová	1330,0	1713,3	1346,7	1463,3
k. jablečná	-	-	-	-
k. glutarová	-	-	-	-
k. vinná	-	-	-	-
k. adipová	-	-	-	-
k. β - hydroxymáselná	-	-	-	-
k. t,t - mukonová	-	-	-	-
k. p - hydroxyfenyloctová	-	-	-	-
k. citronová	533,5	473,9	473,1	493,5
k. hippurová	520,9	516,5	495,9	511,1
FPMA - VS	1397,6	1331,9	1290,6	1339,8

Tabulka č. 5 - Naměřené hodnoty ploch píků, provedené novým postupem pro přidavek 50 µg směsi, odfoukávání právě dosucha

Látka	RU + 50 µg			arit. průměr
	vz.a	vz.b	vz.c	
k. malonová	1036	491,1	542,0	516,55
k. jantarová	3507,4	2402,7	2324,1	2363,4
k. jablečná	1064,3	881,3	887,2	884,3
k. glutarová	768,4	592,3	532,8	562,6
k. vinná	1211,4	1213,2	903,7	1109,4
k. adipová	1387,6	1138,7	1122,5	1216,3
k. β - hydroxymáselná	-	-	-	-
k. t,t - mukonová	216,6	179,2	169,5	188,4
k. p - hydroxyfenyloctová	763,9	624,2	657,9	682,0
k. citronová	562,1	454,5	518,9	511,8
k. hippurová	1130,9	982,9	1003,7	1040,4
FPMA - VS	1338,6	1176,5	1214,6	1243,2

Tabulka č. 6 - Naměřené hodnoty ploch píků, provedené novým postupem pro přidavek 100 µg směsi, odfoukávání právě dosucha

Látka	RU + 100 µg			arit. průměr
	vz.a	vz.b	vz.c	
k. malonová	1279,7	953,4	671,8	968,3
k. jantarová	3732,4	2868,7	2764,3	3121,8
k. jablečná	1495,3	1506,9	1555,9	1519,4
k. glutarová	1221,8	901,9	987,0	1036,9
k. vinná	891,3	771,9	822,2	828,5
k. adipová	1789,1	1553,2	1665,4	1669,2
k. β - hydroxymáselná	-	-	-	-
k. t,t - mukonová	446,7	393,5	445,4	428,5
k. p - hydroxyfenyloctová	1335,8	1273,6	1239,8	1283,1
k. citronová	809,9	732,8	740,6	761,1
k. hippurová	1438,9	1439,8	1355,6	1411,4
FPMA - VS	1074,5	1210,9	1116,9	1134,1



Graf č.1 - Porovnání jednotlivých měření směsi standardů karboxylových kyselin v matrici s kontrolními vzorky, odfoukávání právě dosucha

Tabulka č. 7 - Naměřené hodnoty ploch píků, provedené novým postupem pro kontrolní vzorky, odfoukávání přetažené o 30 minut

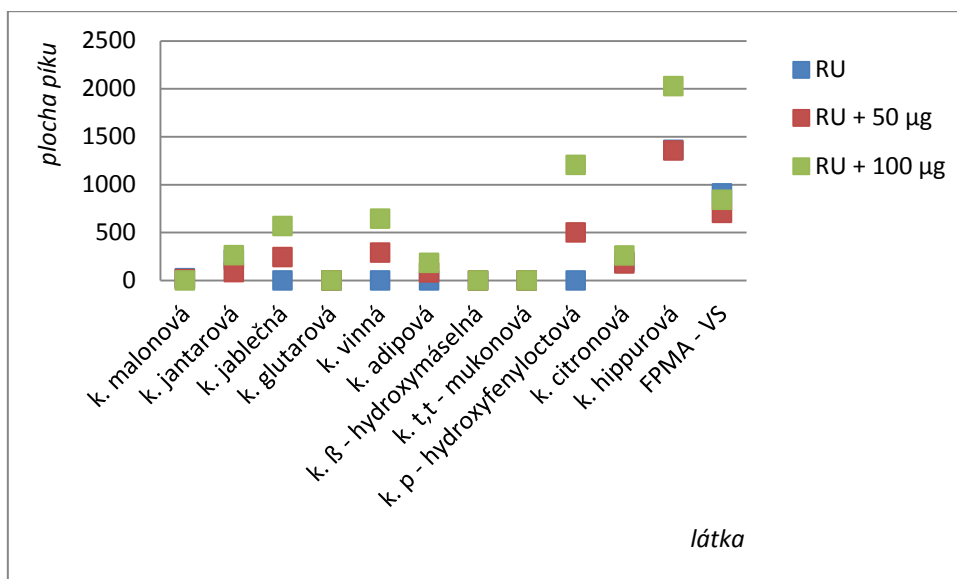
Látka	kontrola			arit. průměr
	vz.a	vz.b	vz.c	
k. malonová	20,3	23,0	23,8	22,4
k. jantarová	198,6	214,6	231,7	215,0
k. jablečná	-	-	-	-
k. glutarová	-	-	-	-
k. vinná	-	-	-	-
k. adipová	-	-	-	-
k. β - hydroxymáselná	-	-	-	-
k. t,t - mukonová	-	-	-	-
k. p - hydroxyfenyloctová	-	-	-	-
k. citronová	180,8	215,0	188,9	194,9
k. hippurová	1357,8	1429,3	1292,3	1359,8
FPMA - VS	928,3	952,9	844,1	908,4

Tabulka č. 8 - Naměřené hodnoty ploch píků, provedené novým postupem pro přidavek 50 µg směsi, od foukávání přetažené o 30 minut

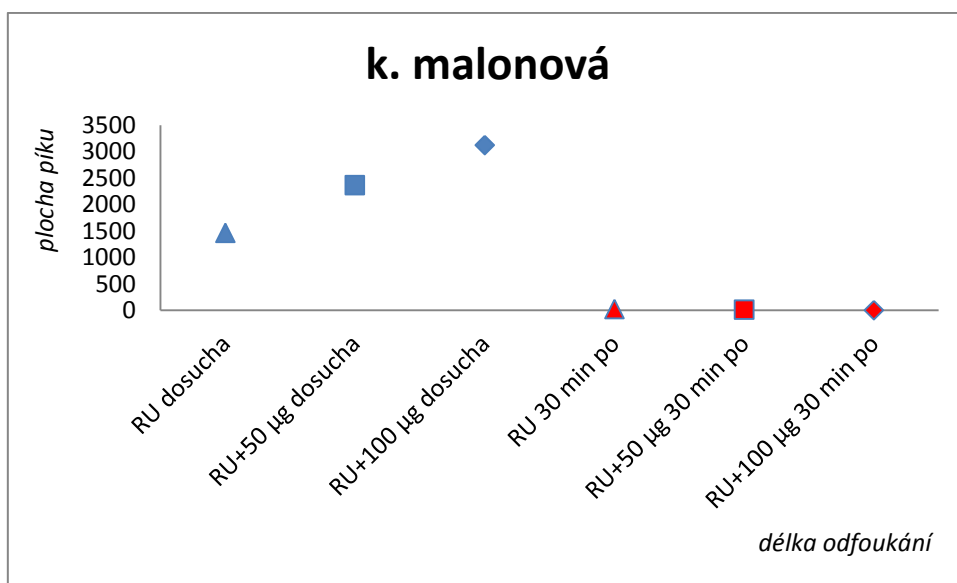
Látka	RU + 50 µg			arit. průměr
	vz.a	vz.b	vz.c	
k. malonová	8,9	13,3	13,4	11,9
k. jantarová	72,2	96,9	87,5	85,5
k. jablečná	212,7	199,3	321,1	244,4
k. glutarová	-	-	-	-
k. vinná	278,7	272,9	321,7	291,1
k. adipová	72,6	30,4	143,0	82,0
k. β - hydroxymáselná	-	-	-	-
k. t,t - mukonová	-	-	-	-
k. p - hydroxyfenyloctová	473,7	552,6	474,2	500,2
k. citronová	170,9	171,7	183,4	175,3
k. hippurová	1296,6	1488,0	1276,2	1353,6
FPMA - VS	679,3	743,4	683,3	702,0

Tabulka č. 9 - Naměřené hodnoty ploch píků, provedené novým postupem pro přidavek 100 µg směsi, od foukávání přetažené o 30 minut

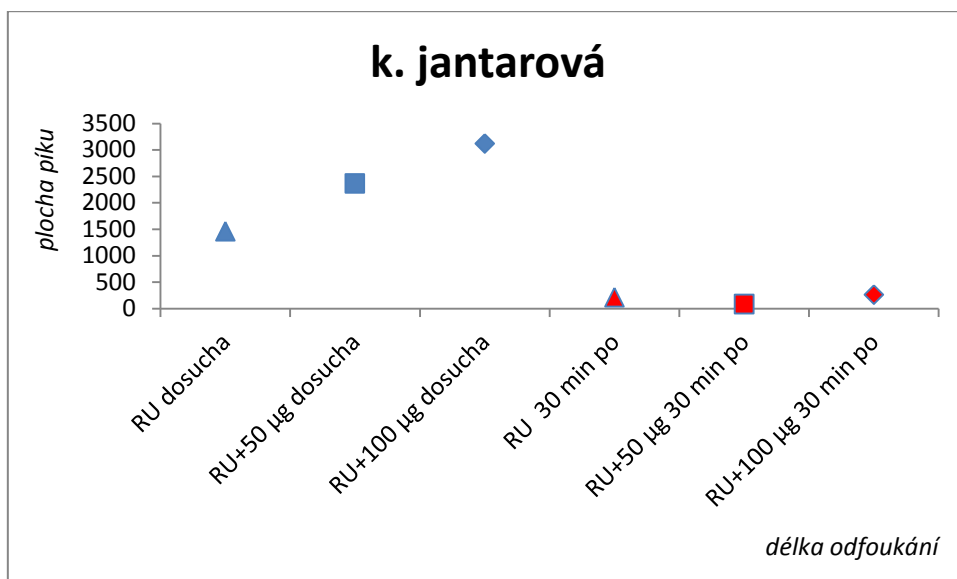
Látka	RU + 100 µg			arit. průměr
	vz.a	vz.b	vz.c	
k. malonová	-	-	-	-
k. jantarová	273,4	259,9	259,4	264,2
k. jablečná	588,8	566,7	540,0	565,2
k. glutarová	-	-	-	-
k. vinná	688,9	687,8	551,9	642,9
k. adipová	193,4	170,3	181,2	181,6
k. β - hydroxymáselná	-	-	-	-
k. t,t - mukonová	-	-	-	-
k. p - hydroxyfenyloctová	1237,9	1153,3	1218,0	1203,1
k. citronová	290,8	286,1	200,9	259,3
k. hippurová	2123,9	1952,6	1999,6	2025,4
FPMA - VS	902,9	844,2	774,8	840,6



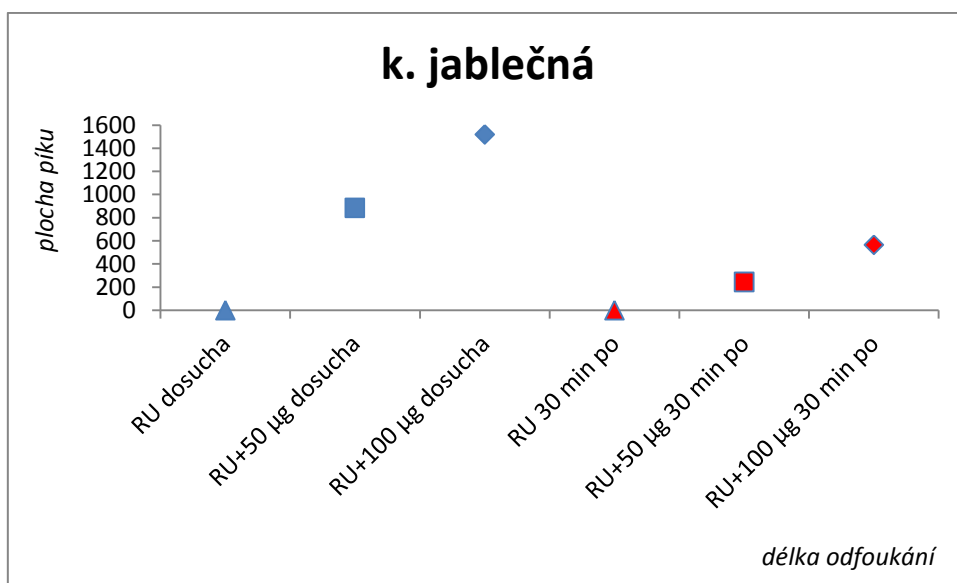
Graf č. 2 - Porovnání jednotlivých měření směsi standardů karboxylových kyselin v matrici s kontrolními vzorky, odfoukávání přetažené o 30 minut



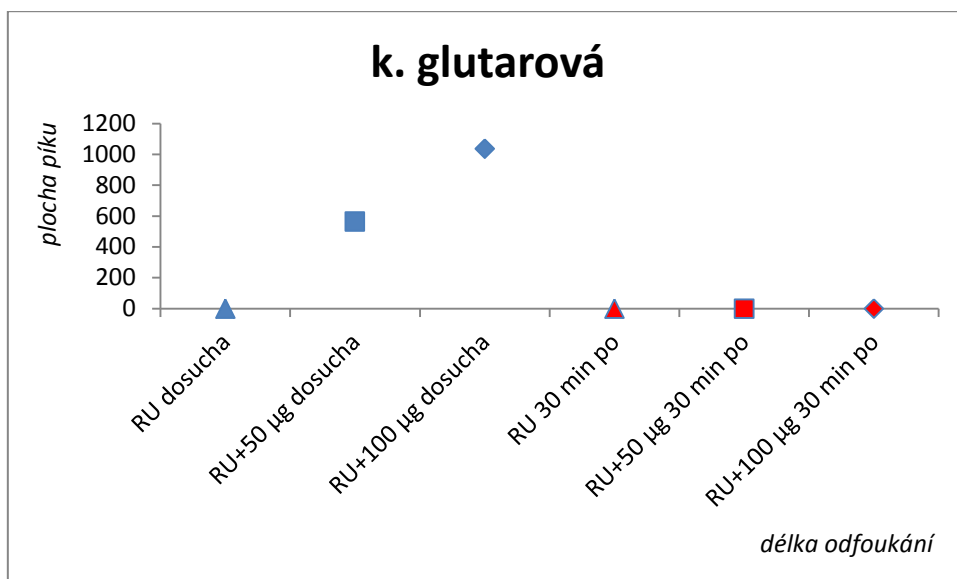
Graf č. 3 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina malonová



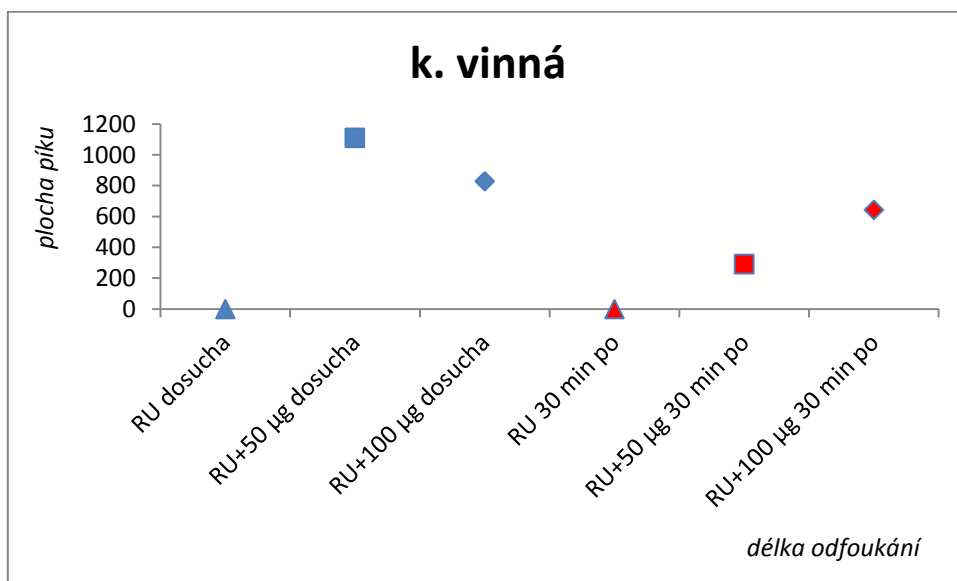
Graf č. 4 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina jantarová



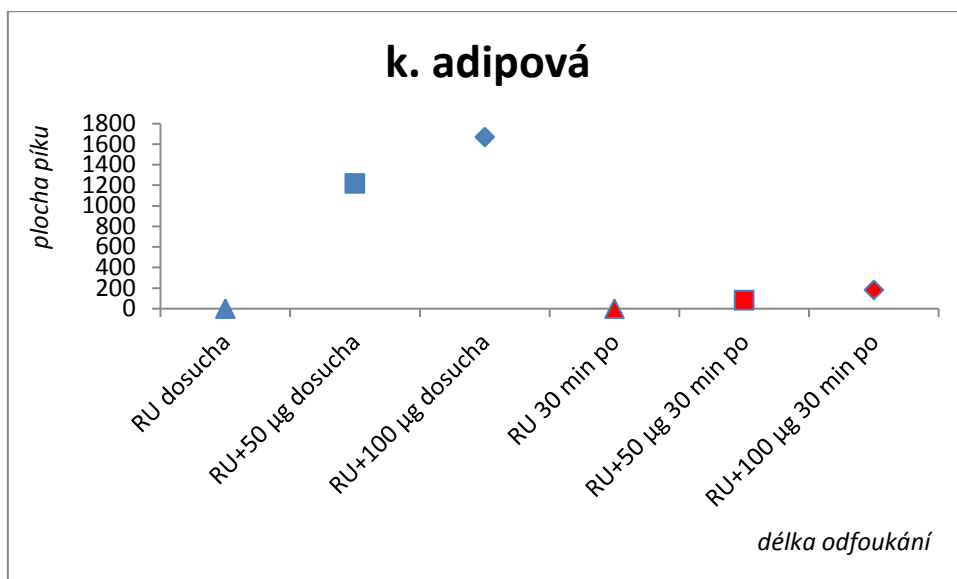
Graf č. 5 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina jablečná



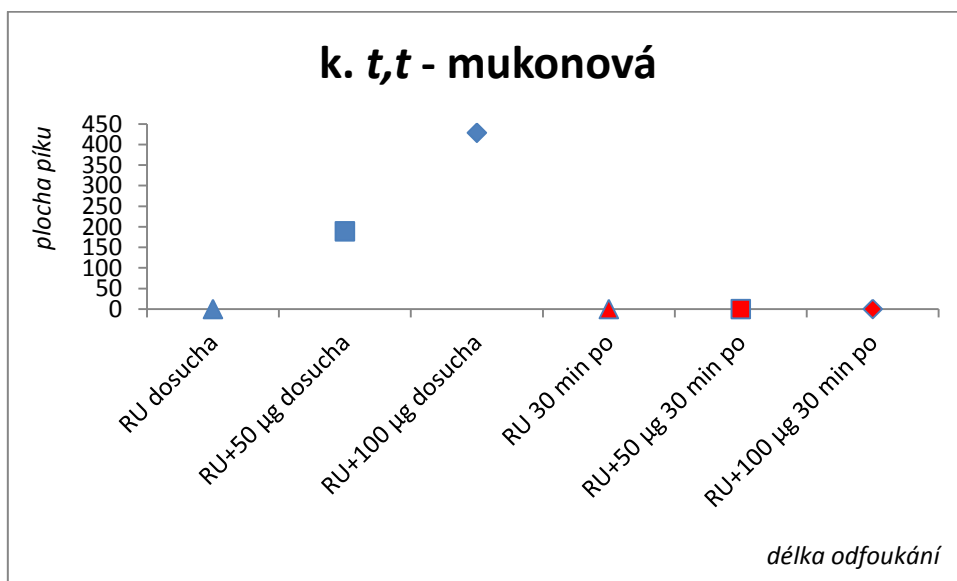
Graf č. 6 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina glutarová



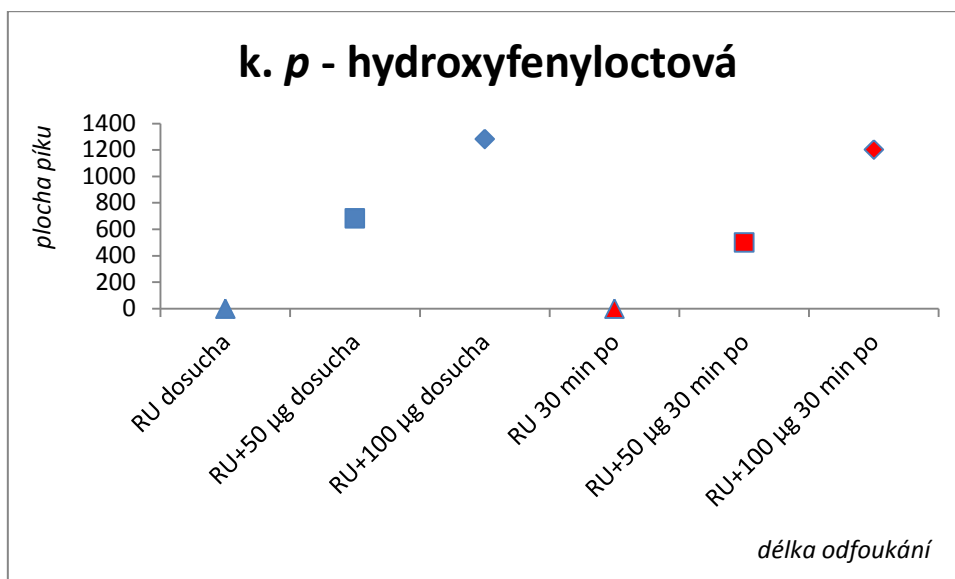
Graf č. 7 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina vinná



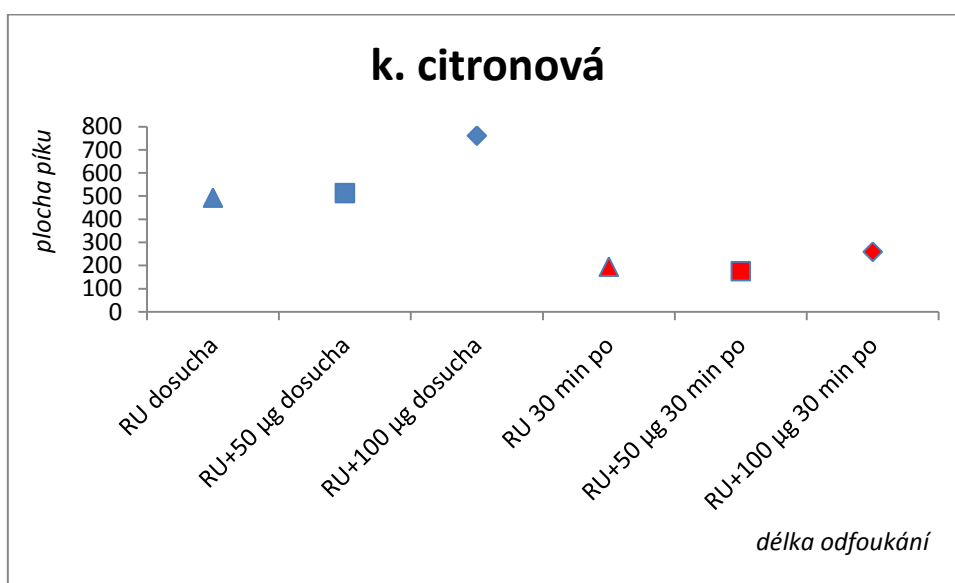
Graf č. 8 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina adipová



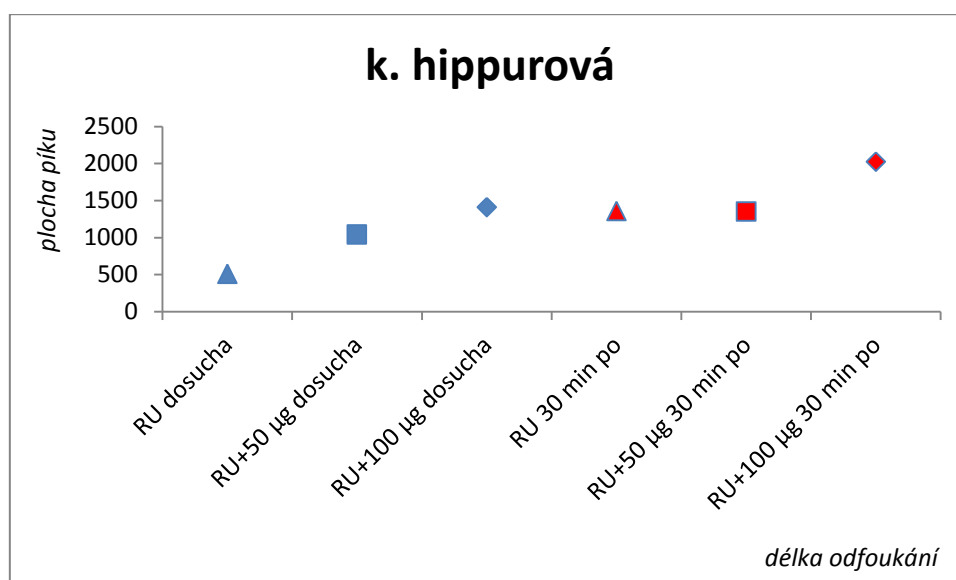
Graf č. 9 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina t,t-mukonová



Graf č. 10 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina p-hydroxyfenyloctová



Graf č. 11 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina citronová



Graf č. 12 - Vliv délky odfoukání na koncentraci analytu – kyselina hippurová

Z výsledků uvedených v tabulkách a grafech je zřejmé, že při stanovení, provedeném novým postupem, přetažení druhého odfoukání ke ztrátám analytů sice vede, ale výsledky jsou zároveň v rámci jednotlivých tripletů reprodukovatelné. Pro kyseliny malonovou, jantarovou, jablečnou, glutarovou, vinnou, adipovou, *t,t*-mukonovou a citronovou je odfoukávání kritickým faktorem, je tedy třeba odfoukávat právě dosucha. Naopak aromatické kyseliny *p*-hydroxyfenyloctová a hippurová, jsou vůči přetaženému odfoukání odolné. Také trend nárůstu v sekvenci 0 – 50 – 10 µg/ml je již znatelný.

Na dalších dvou sadách vzorků byly sledovány výtěžky extrakce. První sada byla analyzována klasickým postupem s jednou extrakcí. U druhé sady byla provedena extrakce opakovaná. Z výsledků těchto analýz bylo zřejmé, že výtěžky 2. extrakce byly u většiny do kyselin do 20 % a pro celé stanovení byla tedy jedna extrakce dostačující.

Z veškerých uvedených výsledků je zřejmé, že při novém způsobu zpracování se správnou délkou odfoukání vzorků k větším ztrátám analytů nedochází, že vyšší použité přídavky jednotlivých analytů (50 a 100 µg/ml) jsou dostatečné a trend nárůstu v sekvenci 0 – 50 – 100 µg/ml je kromě kyseliny vinné a citronové znatelný. Výtěžky druhé extrakce byly u většiny látek do 20% a postup s jednou extrakcí je proto dostačující. Dále bylo zjištěno, že kyselina β -hydroxymáselná se v průběhu analýzy zcela ztrácí. Její přítomnost nebyla potvrzena ani analýzou

GC/FID, ani analýzou GC/MS.

Postup stanovení karboxylových kyselin v moči byl tedy podchycen a přistoupilo se k hlavnímu kroku celého experimentu, a to ke stanovení merkapturových kyselin HEMA a CMMA.

Pro vlastní experiment byly použity vzorky moči potkanů, po intraperitoneálním podání 2-hydroxyethylcysteinu (HEC). Sada vzorků obsahovala čtyři vzorky potkaní moči, odebrané před expozicí. Jeden z nich byl ospikován HEMA a CMMA a byl použit pro přípravu kalibračních vzorků. Další čtyři vzorky byly odebrány jeden den po expozici a čtyři vzorky dva dny po expozici. V těchto vzorcích byla očekávána přítomnost obou merkapturových kyselin a na základě kalibračních přímků měla být stanovena jejich koncentrace v exponované moči.

Tabulka č. 10 - Naměřené hodnoty ploch piků HEMA v kalibračních vzorcích, metoda GC/MS, režim Full scan

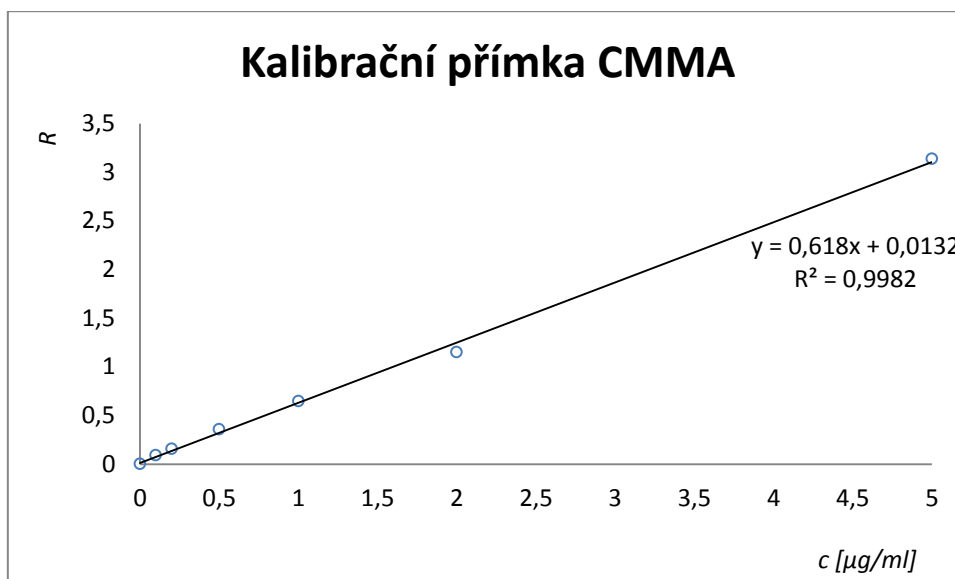
HEMA			
m/z: 157			
c [µg/ml]	vz. a)	vz. b)	arit. průměr
0	2048761	-	2048761
0,1	1918315	-	1918315
0,2	2049335	1948842	1999089
0,5	2301430	2064573	2183002
1,0	2028830	2112728	2070779
2,0	2152779	1967986	2060383
5,0	1931904	-	1931904

Tabulka č. 11 - Naměřené hodnoty ploch piků HEMA v reálných vzorcích, metoda GC/MS, režim Full scan

HEMA – reálné vzorky		
	číslo vzorku	m/z 157
před expozicí	RU 272	1347688
	RU 273	1475176
	RU 274	0
	RU 275	0
1 den po expozici	RU 276	2430032
	RU 277	2689041
	RU 278	1762165
	RU 279	2787916
2 dny po expozici	RU 280	1658584
	RU 281	1404132
	RU 282	1760922
	RU 283	1137498

Tabulka č. 12 - Naměřené hodnoty ploch piků CMMA v kalibračních vzorcích, metoda GC/MS, režim Full scan

CMMA			
m/z: 190			
c [µg/ml]	vz. a)	vz. b)	arit. průměr
0	15	-	15
0,1	223292	191695	207494
0,2	389749	303246	346498
0,5	863275	752525	807900
1,0	1639233	1587387	1613310
2,0	3147598	2499010	2823304
5,0	7505305	-	7505305



Graf č. 13 - Kalibrační přímka CMMA, metoda GC/MS, režim Full scan

Nálezy vnitřního standardu FPMA ve všech vzorcích a CMMA v kalibračních vzorcích ukazovaly, že metoda je v principu pro stanovení merkapturové kyseliny schůdná.

V reálných vzorcích CMMA ale oproti očekávání detegována nebyla. To mohlo být způsobeno tím, že koncentrace CMMA v těchto vzorcích byly pod mezí detekce. V původním experimentu pracovníků SZÚ a VŠCHT s exponovanými močemi CMMA nalezena sice byla, analýza byla ale provedena pomocí HPLC/MS, která byla zřejmě citlivější, než zde použitá GC/MS. Kvantifikace metodou HPLC/MS provedena nebyla. Pro zvýšení citlivosti této metody je možné pracovat v režimu SIM a ne v režimu Full scan, vyčistit liner nebo zkrátit kolonu.

Z veškerých výsledků měření HEMA (analýza samotného standardu zjednodušeným postupem i v lyofilizovaných močích) nebylo jisté, zda byl opravdu měřen ethylester HEMA. Měření ukázala, že kalibrační vzorky v celém rozsahu 0 – 5 µg/ml poskytovaly téměř stejné plochy píku HEMA, stejně tak tomu bylo i u vzorků reálných. Dále bylo zjištěno, že m/z identifikované látky bylo mnohem nižší, než molekulární ion a látka eluovala o téměř 10 minut dříve, než CMMA a FPMA.

Je možné, že stanovovaná látka je něco jiného než ethylester HEMA, zatímco ten neeluuje, což je u látek s volnou hydroxyskupinou možné. Z posledních analýz

vzorků HEMA vyšlo najevo, že pík, který byl považován ethylester HEMA nejspíše interferuje s nečistotou z FPMA, která byla použita jako vnitřní standard. Z časových důvodů se bohužel tato problematika nestačila dokončit.

5. Závěr

Byla testována nová metodika stanovení karboxylových kyselin, která spočívala v působení derivatizačního činidla přímo na lyofilizovanou moč bez předchozí extrakce analytů. Postup dále zahrnoval odpaření činidla, rozpuštění odparku, extrakci a následnou GC/FID a GC/MS analýzu.

Na souboru 12 testovacích karboxylových kyselin různých struktur byly podchyceny kritické body celého stanovení. Prvním kritickým faktorem je délka odfoukání ethylacetátového extraktu. Bylo zjištěno, že na aromatické karboxylové kyseliny délka odfoukání vliv nemá. Naopak, pro zbylé kyseliny z testovaného souboru je délka odfoukání kritickým faktorem. Je třeba co nejpřesněji odhadnout jeho konec, jinak dochází k velkým ztrátám analytů. Druhým kritickým faktorem je extrakce do organického rozpouštědla. Je třeba vzorky před odebráním ethylacetátové vrstvy vysušit, jinak hrozí, že ve vzorku zůstane materiál, který obsahuje vodu a poté se obtížně dosušuje.

Postup byl aplikován na merkapturové kyseliny HEMA a CMMA a na reálné vzorky potkaních močí, exponovaných 2-hydroxyethylcysteinem. Pro CMMA je metoda vhodná, kyselina byla detegována jak samotná, tak i v lyofilizovaných vzorcích močí. Pouze v reálných vzorcích detegována nebyla, což bylo nejspíše způsobeno nízkou citlivostí metody. Pro budoucí studie je vhodnější pracovat v režimu SIM a ne v režimu Full scan. Pro HEMA, která ve své molekule obsahuje volnou hydroxylovou skupinu stanovení vhodné není. Není jisté zda pík, který byl zpočátku považován za ethylester HEMA, byl detegován správně (4.). Z časových důvodů studium HEMA nebylo dokončeno. Pro ověření identifikace látky je možné provést celý postup s příbuznými derivatizačními činidly (MeOH·HCl, PrOH·HCl apod.), dále je možné provést derivatizaci volné hydroxylové kyseliny (silylaci nebo acetylaci). Další možností je zkrácení nebo výměna kolony a vyčištění lineru.

Celé stanovení je časově náročné a pracné, ale jeho hlavní výhodou je působení derivatizačního činidla přímo na lyofilizovanou moč, bez nutnosti předchozí extrakce, a je tak umožněna analýza látek velmi polárních, které se při běžném postupu esterifikace analyzují obtížně a dochází k jejich ztrátám. Další výhodou je, že není potřeba pracovat s roztokem diazomethanu, který je karcinogenní.

6. Seznam použité literatury

- 1) Organické (karboxylové) kyseliny a jejich deriváty. [online], Dostupné z URL: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200630/hypertext/_TRIDAK_ORGA.htm>, [cit. 17.5.2014]
- 2) Pacák J. - *Poznáváme organickou chemii*, Česká republika, Praha, SNTL, (1989)
- 3) McMurry J. - *Organická chemie*, Česká republika, Praha, VŠCHT, (2007),
- 4) Pacák J. - *Úvod do studia organické chemie*, Česká republika, Praha, SNTL, (1982)
- 5) Suzuki Y - Automated analysis of low-molecular weight organic acids in ambient air by a microporous tube diffusion scrubber system coupled to ion chromatography, *Analitica Chimica Acta* 353: 227, (1997)
- 6) Wang, P., Zhou R. - Determination of Organic Acids Exuded from Plant Roots by High Performance Liquid Chromatography, *Chinese Journal Chromatogr.* 24: 239, (2006)
- 7) Adler H., Sirén H., Kulmala M., Riekkola M. L. – Capillary electrophoretic separation of dicarboxylic acids in atmospheric aerosol particles, *Journal of Chromatography A* 990: 133, (2003)
- 8) Dabek-Zlotorzynska E., McGrath M. - Determination of low-molecular-mass carboxylic acids in atmospheric aerosol and vehicle emission samples by capillary electrophoresis, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 367: 507 (2000)
- 9) Casas Ferreira A. M., Fernandez Laespada M. E., Perez Pavon J. L., Moreno Cordero B. - In situ aqueous derivatization as sample preparation technique for gas chromatographic determinations, *J. Chromatogr. A* 1296: 70–83 (2013)
- 10) Orata F. - Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, dostupné z URL: <<http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/32817>>, [cit.14.6.2014]
- 11) Wilson I., Poole C., Cooke M. - Encyclopedia of separation science, *Academic Press*: 4502 (2000)
- 12) Moldoveanu S. C, David V. - Sample preparation in Chromatography, *Journal of Chromatography* 65: 942

- 13) Segura J., Ventura R., Jurado C. - Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents, *Journal of Chromatography B*, 713: 61-90 (1998)
- 14) Wells R. J. - Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 843: 1-18 (1991)
- 15) Hušek P. - Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *Journal of Chromatography B* 717: 57-91 (1998)
- 16) Hušek P., Šimek P. - Alkylchloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis, *Current Pharmaceutical Analysis* 2: 23-43 (2006)
- 17) Regis Technologies, GC derivatization, 2000 [online], dostupné z URL: <<http://www.registech.com/Library/gcderrev.pdf>>, [cit. 20.6.2014]
- 18) Christie W. W. - Gas chromatography and lipids - *The Oil Press* (1989)
- 19) Linhart I., Horák J., Klusoň P. - Úvod do toxikologie a ekologie, Česká republika, Praha, VŠCHT (2004)
- 20) Baumann E., Preuss C, Cohn R. - Concerning bromophenylmercapturic acid, *Ber Deut Chem Ges* 12:806 (1879)
- 21) Jaffe M., - Ueber die nach einfurung von bromobenzol und chlorobenzol im organismus entstehenden schwefelhaltigen sauren, *Ber Deut Chem Ges* 12: 1092 – 1098, (1879)
- 22) Baumann E. - Ueber cystin und cystein, *Z.Physiol.Chem.* 8: 299, (1884)
- 23) Popp W., Vahrenholz C., Przygoda H., Brauksfepe A, Goch S, Müller G, Schell C, Norpoth K. - DNA-protein cross-links and sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes and hydroxyethyl mercapturic acid in urine of ethylene oxide-exposed hospital workers, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, Volume 66, *Issue* 5: 325-332, (1994)
- 24) Kodíček M. - Biochemické pojmy : výkladový slovník [online], dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=kyselina_mlecna>, [cit. 14.6.2014]
- 25) Yoshiharu D., Masao K., Yoshiyuki N., Kazuo S. - Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and

- 4-hydroxybutyrate, *Macromolecules* 21 (9): 2722–2727, (1988)
- 26) Papadopoulos G., Boskou D. - Antioxidant effect of natural phenols on olive oil, *Journal of the American Oil Chemists Society* 68 (9): 669, (1991)
- 27) Mattioda G., Christidis Y. - Glyoxylic Acid, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: 2, (2000)
- 28) Pero R. - Health consequences of catabolic synthesis of hippuric acid in humans, *Current clinical pharmacology* 5 (1): 67–73, (2010)
- 29) dostupné z URL: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9709256.htm>, [cit. 8.6.2014]
- 30) Bjerrum, J., et al. - Chemical Society, *Stability Constants*, London, (1958)
- 31) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley - VCH, (2005)
- 32) dostupné z URL: <<http://ebookbrowse.net/0898t-pdf-d292678370>>, [cit. 5.7.2014]
- 33) Blair G. T., DeFraties J. J. - Hydroxy Dicarboxylic Acids, *Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*: 1-19, (2000)
- 34) Wiwanitkit V., Soogarun S., Suwansaksri J- A correlative study on red blood cell parameters and urine trans, trans-muconic acid in subjects with occupational benzene exposure, *Toxicologic pathology* 35 (2): 268–9, (2007)
- 35) Penniston K., Nakada S., Holmes R., Assimos D. - *Journal of Endourology* 22 (3): 567–570), (2008)
- 36) Mráz J., Stránský V. - Biologické monitorování a biologické expoziční testy, dostupné z URL: <<http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/biologicke-monitorovani-a-biologicke-expozicni-testy>> , [cit. 17.8.2014]
- 37) Christopher J. Clarke, John N. Haselden - *Metabolic Profiling as a Tool for Understanding Mechanisms of Toxicity*, dostupné z URL: <<http://tpx.sagepub.com/content/36/1/140.full>>, [cit. 17.8.2014]
- 38) Thompson J.A., Markley S.P.- Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gas-chromatography-mass spektrometry. Comparison of isolation methods, *Analytical Chemistry*, 47 (8): 1313–1321, (1975)
- 39) Perbellini L., Veronese N., Princivalle A. - Mercapturic acids in the biological monitoring of occupational exposure to chemicals, *Medicina del Lavoro*, Department of Medicine and Public Health, University of Verona, Piazzale L.A. Scuro 10, 37134

Verona, Italy, *Journal of Chromatography B*, 781: 269–290, (2000)