

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické
tekutině kuřecích zárodků kapilární elektroforézou**

Diplomová práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Jana Matějčková

Předmětová hesla: analytická chemie, separace, kapilární elektroforéza

Klíčová hesla: kvantifikace, kyselina močová, kuřecí embryo, plazma, alantoická tekutina, hyperurikémie

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky – garanta Doc. RNDr. Zuzany Bosákové a školitelů – specialistů Ing. RNDr. Petra Tůmy, Ph.D. a Doc. RNDr. Evy Samcové, CSc. , a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 1. května 2007


.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomohli při mých studiích a při vypracování této práce, zejména Ing. RNDr. Petru Tůmovi, Ph.D., Doc. RNDr. Evě Samcové, CSc., kolektivu 3.LF UK Oddělení biochemie, buněčné a molekulární biologie a mé rodině.

Obsah

Obsah	5
Seznam zkratk	7
Seznam symbolů	8
Cíle diplomové práce	9
1 ÚVOD	10
1.1 Historie elektroforézy	10
1.2 Kapilární elektroforéza	10
1.2.1 Elektroforetická migrace	12
1.2.2 Elektroosmotický tok	13
1.2.3 Separace v kapiláře	14
1.2.4 Detekce	15
1.3 Využití CE	16
1.4 Analyzované biologické tekutiny	17
1.4.1 Zárodečné obaly kuřecího embrya	17
1.4.1.1 Alantois	17
1.4.2 Alantoická tekutina kuřecích zárodků	18
1.4.3 Krevní plazma kuřecích zárodků	19
1.5 Odpadní produkty metabolismu bílkovin u různých skupin živočichů	20
1.6 Metabolismus nukleotidů	21
1.7 Hlavní produkty metabolismu dusíku	22
1.7.1 Močovina	22
1.7.2 Amoniak	23
1.7.3 Kyselina močová	24
1.8 Klinický význam kyseliny močové	25
1.9 Metody stanovení kyseliny močové	25
1.9.1 Stanovení kyseliny močové kapilární elektroforézou	26

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2. 1 Přístroje.....	28
2. 2 Materiály	28
2. 3 Chemikálie	28
2. 4 Vyvolání jednostranné ageneze u časných kuřecích zárodků.....	29
2. 5 Příprava vzorku plazmy pro CE analýzu	30
2. 5. 1 Deproteinizace kuřecí plazmy acetonitrilem	30
2. 5. 2 Úprava vzorku kuřecí plazmy alkalizací a ředěním.....	30
2. 5. 3 Příprava vzorku alantoické tekutiny pro CE analýzu	30
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	31
3. 1 Pufry.....	31
3. 2 Absorpční spektra sledovaných analytů	34
3. 3 Kalibrační závislosti	36
3. 3. 1 Kalibrační závislosti modelového vzorku kyseliny močové	36
3. 3. 2 Kalibrační závislosti pro kyselinu močovou ve vzorku plazmy a alantoické tekutiny	39
3. 3. 3 Migrační časy.....	42
3. 4 Opakovatelnost a analytická výtěžnost CE stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině.....	43
3. 5 Stanovení kyseliny močové v plazmě po deproteinizaci s acetonitrilem ..	45
3. 6 Praktická stanovení kyseliny močové v kuřecí plazmě a alantoické tekutině	46
4 ZÁVĚR	52
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrické fokusování
CITP	kapilární izotachoforéza
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	„diod array“ detektor, detektor tvořený diodovým polem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	elektrochromatografie
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GC	plynová chromatografie
HP ^{3D} CE	trojrozměrná kapilární elektroforéza Hewlett Packard
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHES	2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina
IEF	izoelektrické fokusování
ITP	izotachoforéza
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovení
MECC, MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	2-morfolinethansulfonová kyselina
P, PP	fosfát
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV	ultrafialová oblast spektra

Seznam symbolů

a	úsek regresní přímky
b	citlivost
c	molární koncentrace, [mol dm ⁻³]
D	difúzní koeficient roztoku, [m ² s ⁻¹]
E	intenzita pole, [V m ⁻¹]
ε	permitivita roztoku v kapiláře, [F m ⁻¹]
η	viskozita roztoku, [N m ⁻² s]
L	délka kapiláry, [m]
μ_{ef}	elektroforetická pohyblivost, [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
n	počet měření
N	počet teoretických pater
v	migrační rychlost, [m s ⁻¹]
v_{eof}	migrační rychlost elektroosmotického toku, [m s ⁻¹]
R	korelační koeficient
R_{ij}	rozlišení analytů i a j
t	migrační čas, [min.]
U	napětí, [V]
w	šířka píku při základně, [min.]
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky, [min.]
ζ	elektrokinetický potenciál, [V]

Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce je:

- 1. Vývoj CE metody pro stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků.**
- 2. Ověření opakovatelnosti a analytické výtěžnosti této metody.**
- 3. Provádění rutinních stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků s uměle vyvolanou agenezí jedné ledviny a kontrolních vzorků.**
- 4. Vyhodnocení, zpracování a interpretace získaných výsledků.**

1 ÚVOD

1.1 Historie elektroforézy

První pokusy s dělením látek v elektrickém poli byly provedeny s vlhkým papírem, který měl protější strany ponořené do vodivých roztoků (elektrolytů) s elektrodami. Na papír se nanasla směs barevných látek a po spojení elektrického obvodu se látky začaly dělit a vytvářet barevné proužky.

V roce 1892 byl popsán pohyb anorganických částic v elektrickém poli v koloidním roztoku a brzy poté se ukázalo, že podobně putují i proteiny ve vodných roztocích. V 30. letech 20. století zkonstruoval švédský elektrochemik Arne Tiselius zařízení umožňující rozdělit proteiny krevního séra na základě jejich rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli (v roce 1948 za to dostal Nobelovu cenu). V podobném uspořádání se elektroforéza proteinů krevního séra používá jako diagnostická metoda dodnes.

V polovině 60. let vznikla elektroforetická metoda kapilární izotachoforéza, určená převážně pro analýzu směsi malých iontů, anorganických i organických. V roce 1981 J. W. Jorgenson a K. D. Lukacsová popsali separaci různých iontů (aminokyselin, dipeptidů, aminů) zónovou kapilární elektroforézou ve velmi tenké skleněné kapiláře s vnitřním průměrem 75 μm .¹

1.2 Kapilární elektroforéza

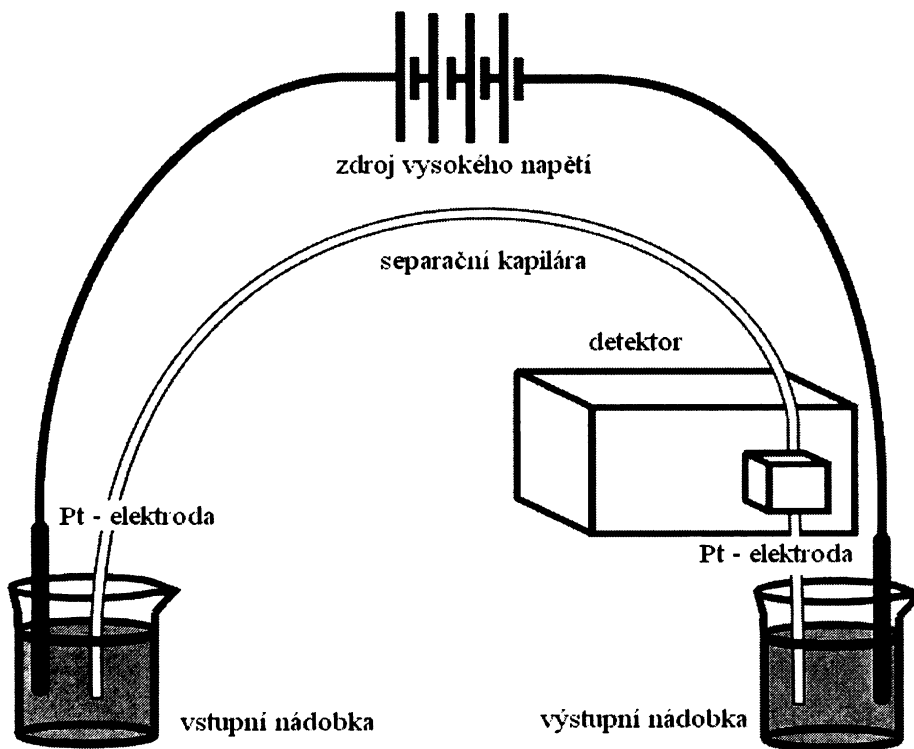
Kapilární elektroforéza patří spolu s plynovou (GC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) k nejdůležitějším separačním metodám v analytické chemii.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) patří mezi skupinu elektromigračních metod. Do této skupiny patří také metody kapilární gelové elektroforéza (CGE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC, MECC), elektrochromatografie (EC, CEC), kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, IEF) a kapilární izotachoforéza (CITP, ITP).

Kapilární elektroforéza (CE) využívá rozdílné pohyblivosti látek (analytů) v elektrickém poli. Kapilární zónová elektroforéza je vhodná pro separaci molekul s nábojem (iontů), které se liší svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Pokud je do roztoku, který obsahuje nabitě částice, vloženo elektrické pole, kladně nabitá částice (kation) bude přitahována záporně nabitou elektrodou (katodou) a naopak záporně nabitá částice (anion) bude přitahována kladně nabitou elektrodou (anodou). Více nabitě a menší ionty budou rychlejší než méně nabitě a velké.

Schéma kapilární elektroforézy je znázorněno na obrázku 1. Kapilára naplněná elektrolytem je ponořena každým koncem do elektrolytu v oddělených nádobkách s elektrodami. Po vložení vysokého napětí na elektrody (dosahujícího jednotek až desítek tisíc voltů) se nabitě částice v kapiláře začnou pohybovat a obvodem začne protékat proud. Předtím, než bude na elektrody vloženo napětí, se musí do kapiláry nadávkovat vzorek – směs látek, které chceme oddělit. To se provádí tak, že se jeden konec kapiláry ponoří do roztoku a buď tlakem, nebo elektrickým napětím se vpraví část analyzované směsi do kapiláry, přičemž po „nástríku“ se zase oba konce kapiláry ponoří do nádobek s elektrolytem. Směs látek se v křemenné kapiláře v důsledku různé pohyblivosti v elektrickém poli začne dělit a jednotlivé zóny putují k detektoru, kde je jejich průchod indikován a zaznamenáván.

CE využívá dvou transportních jevů – elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou.²



Obrázek 1 - Schematické znázornění instrumentace v kapilární elektroforéze.

1. 2. 1 Elektroforetická migrace

Elektroforetická migrace iontů je pohyb iontů v elektrickém poli. Ionty dané látky se v homogenním elektrickém poli pohybují konstantní elektroforetickou rychlostí, která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a velikosti náboje a iontu a nepřímo úměrná jeho poloměru.

Migrační rychlost v [m s^{-1}] je vyjádřena rovnicí:

$$v = \mu_{\text{ef}} E = \mu_{\text{ef}} U / L, \quad (1)$$

kde μ_{ef} [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$] je elektroforetická pohyblivost, E intenzita pole [V m^{-1}], U [V] napětí aplikované na kapiláru a L [m] je délka kapiláry.

Migrační čas t [min.], je čas, který stráví analyt v kapiláře od zapnutí separačního napětí do průchodu analytu detektorem a je roven:

$$t = L / v = L^2 / \mu_{\text{ef}} U \quad (2)$$

Účinnost separace se udává počtem teoretických pater, N . Počet teoretických pater se v kapilární elektroforéze pohybuje v řádech 10 - 100 tisíc.

V kapilární elektroforéze je minimální rozmývání zón a omezený vznik tepla díky malému vnitřnímu průměru kapilár, což vede k lepší separační účinnosti. Účinnost CE separace bývá vyšší než účinnost separace např. ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC).

Počet teoretických pater N je v ideálním případě, kdy se na rozmývání separační zóny podílí pouze longitudinální difúze, dán rovnicí:

$$N = \mu_{ef} U / 2D, \quad (3)$$

kde D [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] je difúzní koeficient.

Počet teoretických pater je možné vypočítat přímo z elektroferogramu (za předpokladu, že chromatografický pík má tzv. Gaussovský tvar), pomocí rovnic:

$$N = 16 (t^2 / w^2) = 5,54 (t^2 / w_{1/2}^2); \quad (4)$$

kde t je migrační čas, w je šířka píku při základně a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky píku.

Rozlišení charakterizuje míru relativní separace, míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků. Rozlišení $R_{i,j}$ dvou analytů mezi sebou je dáno rovnicí:

$$R_{i,j} = 2 (t_i - t_j) / (w_i + w_j) \quad (5)$$

Hodnota rozlišení umožňuje jednoznačně vyjádřit úroveň separace. Látky se považují za zcela oddělené, když $R_{i,j} \geq 1,5$. Při hodnotách nižších se příslušné elektroforetické píky částečně překrývají.^{2, 3, 4}

1. 2. 2 Elektroosmotický tok

Elektroosmózu lze charakterizovat jako elektrický jev, kdy působením vnějšího elektrického pole na prostorový náboj elektrické dvojvrstvy v kapalině

dochází k pohybu této kapaliny. Stěny kapiláry obsahují ionizované skupiny (Si-O^-), které vytvářejí s ionty opačného náboje v roztoku elektrickou dvojvrstvu.

Lineární rychlost elektroosmotického toku je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a závisí na velikosti náboje, který nese vnitřní stěna kapiláry. Čím je pH roztoku uvnitř kapiláry vyšší, tím větší náboj je rozprostřen po vnitřní stěně a tím rychlejší je elektroosmotický tok.

Lineární rychlost elektroosmotického toku, v_{eof} [m s^{-1}], je dána Helmholtz-Smolukovského vztahem:

$$v_{\text{eof}} = (\varepsilon \zeta / \eta) E, \quad (6)$$

kde ε [F m^{-1}] je permitivita roztoku v kapiláře, ζ [V] je elektrokinetický potenciál a η [$\text{N m}^{-2} \text{s}$] je viskozita roztoku.

Za normálních podmínek putuje elektroosmóza směrem ke katodě, tedy u katody je detektor a u anody dávkování. Pokud je třeba změnit rychlost elektroosmotického toku, můžeme přidat do základního elektrolytu povrchově aktivní látku. Po přidání do pufru se povrchově aktivní látka adsorbuje na stěnu kapiláry, změní se elektroosmotický tok a také se omezí potenciální adsorpce ostatních látek. V závislosti na náboji povrchově aktivní látky se elektroosmotický tok může zpomalit, zrychlit, nebo obrátit. Látky obracející elektroosmotický tok jsou např. cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) nebo polybren.³

1. 2. 3 Separace v kapiláře

Kapilární elektroforéza se provádí v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 25 – 100 μm . Kapiláry významně přispívají ke stabilizaci separovaných zón tím, že svým vhodným poměrem mezi vnějším povrchem a vnitřním průměrem umožňují odvod generovaného Joulova tepla. Ohřívání způsobuje nejednotnost teplotního gradientu, místní změny ve viskozitě a pozdější rozmývání zón. Změna teploty o 1 $^{\circ}\text{C}$ má za následek změnu viskozity o 2 – 3 % a změnu mobility také o 2–3 %.

Vysoká elektrická odolnost kapiláry umožňuje aplikaci velmi vysokého elektrického pole (100 – 500 V/cm) s pouze minimálním uvolňováním tepla.

Stěny křemenných kapilár obsahují určité množství ionizovaných skupin (SiO^-), které v roztoku vytvářejí s ionty opačného znaménka elektrickou dvojvrstvu. Při nízkém pH (1 – 3) jsou silanolové skupiny křemenné kapiláry protonizovány a jsou nenabitě. Při vysokém pH (kolem 9 – 10) jsou tyto skupiny deprotonovány a mají negativní náboj.^{2,3}

1. 2. 4 Detekce

Požadavky na detekci v CE jsou takové, aby byla metoda dostatečně citlivá a nepřispívala k dodatečnému rozmývání zóny vzorku.

Podle umístění detektoru vzhledem ke koloně rozlišujeme detekci „on-column“ (prováděna přímo na koloně), „end-column“ (detektor je na konci kolony) a „post-column“ (detektor je za kolonou).²

Mezi nejpoužívanější detekční metodu patří spektrofotometrie v UV oblasti spektra, měřená pomocí UV detektorů nebo „diod array“ detektorů (DAD). Je vhodná především pro detekci látek absorbujících v UV oblasti spektra. Většinou to jsou organické látky, které obsahují chromofory. Většina anorganických iontů neabsorbují UV záření, touto metodou je lze detekovat jen nepřímo a to přidáním pomocné látky do základního roztoku, která UV záření absorbuje.

U DAD (detektor tvořený diodovým polem) je detektor tvořen polem miniaturních polovodičových detektorů (pro oblast 200 – 800 nm). Pole detektorů je vytvořeno na jednom čipu technikami používanými při výrobě integrovaných obvodů. Záření všech vlnových délek, které prošlo vzorkem, je rozloženo monochromátorem, dopadá na diodové pole, kde je detekováno všemi fotodiodami současně.⁴

Dalšími druhy detekce je detekce fluorescenční (pro látky obsahující fluorofory) nebo detekce elektrochemická, která využívá principů potenciometrie, konduktometrie a ampérometrie.

1.3 Využití CE

CE se používá pro analýzu biologických makromolekul, aminokyselin, chirálních léčiv, vitamínů, pesticidů, anorganických iontů, organických kyselin, barviv, detergentů, peptidů a proteinů, sacharidů, oligonukleotidů, DNA restrikčních fragmentů a dokonce i celých buněčných a virových částic.

Elektroforéza je v současné době hojně používána hlavně v biochemických a imunochemických laboratořích při analýzách biologických látek jako jsou např. nukleové kyseliny v genovém inženýrství a genomice nebo proteiny v proteomice.³

V současné době se kapilární elektroforéza využívá v klinických laboratořích pro stanovení cerebrosinálních proteinů, pro stanovení hemoglobinu, lipoproteinů, pro analýzu léků v séru a moči s UV detekcí⁵, pro separaci aminokyselin s bezkontaktně vodivostním detektorem^{6,7}, pro stanovení proteinogenních aminokyselin v lidské plazmě s bezkontaktně vodivostním detektorem⁸, pro stanovení 3-methylhistidinu a 1-methylhistidinu ve vzorcích moči⁹ a pro mnohé další analýzy.

Mechanismus odpovědný za separaci v CE je jiný než u klasické chromatografie a proto dovoluje přímou, komplementární analýzu. Kapilární elektroforéza vyžaduje minimální spotřebu vzorku a vede k malému množství organického odpadu.³

1. 4 Analyzované biologické tekutiny

1. 4. 1 Zárodečné obaly kuřecího embrya

Zárodečné obaly jsou chápány jako přizpůsobení organismů suchozemskému způsobu života. Obsahují tekutiny, které nahrazují vyvíjejícímu se zárodku vodní prostředí, zárodek chrání i mechanicky a mnohdy zprostředkovávají látkovou výměnu. Vyskytují se u živočichů s přímým i larválním vývojem. Z obratlovců mají zárodečné obaly plazi, ptáci a savci. Rozlišují se tři zárodečné obaly – amnion, chorion a alantois.¹⁰

Amnion je tekutinou naplněný obal, který obklopuje embryo a plní převážně ochrannou funkci. Obsahuje tekutinu, která jemně podpírá embryo, zabraňuje dehydrataci jeho tkání, izoluje ho před náhlými změnami teplot a snižuje působení mechanických otřesů – snižuje možnost jeho poranění. Stěna amnionu je velice elastická, je tvořena hladkým svalstvem.

Amnion se vytváří souběžně s chorionem z dvojvrstvé extraembryonální části blastodermu.

Chorion je vnější obal a od amnionu je oddělen prostorem, tzv. extraembryonální tělní dutinou (exocoelomem). Z počátku je chorion bez patrné funkční významnosti. Pak má ale důležitou fyziologickou funkci, když se spojuje s alantoisem, aby vytvořily chorioalantois.¹¹

1. 4. 1. 1 Alantois

Alantois se objevuje jako poslední extraembryonální membrána. Je to obal, který vyrůstá z extraembryonální tělní dutiny jako přídatná část, tzv. zadní střevo. Popřípadě uzavírá celkový obsah vajíčka do obálky s dvojitou stěnou, naplněnou tekutinou.

Alantoický obal je tvořen dvěma stěnami a plní dvě velmi důležité funkce. Je pro embryo dýchacím orgánem a je místem pro odpadní produkty ledvin. Vnitřní a vnější stěny nebo okraje se od sebe liší jak strukturně, tak svými funkcemi.

Dýchání se účastní pouze vnější stěna, (chorioalantois) plicí během embryonálního života funkci plic. Vnější stěna se spojuje s chorionem, nacházejícím se přímo pod skořepinovou membránou a vytváří vnitřní povrch vaječné skořápky. Je silnější než vnitřní stěna (má velkou povrchovou plochu) a je mnohem lépe cévně zásobená.

Vnitřní stěna má spíše jen mechanický význam. Spojuje se s amnionem a skládá se z hladkého svalstva.¹¹

1. 4. 2 Alantoická tekutina kuřecích zárodků

Předtím než embryonální ledviny začnou vylučovat výměšky, obsahuje alantoický váček čirou, bezbarvou tekutinu, která pochází z jeho vlastní stěny nebo z kloaky.

Kolem čtvrtého dne inkubace kuřecího zárodka začíná přitékat moč do alantoisu a tak tomu je po celý zbytek inkubační doby. Po 11 dnech začíná mít alantoická tekutina nažloutlou barvu. Mezi 7. až 14. dnem je koncentrace odpadních produktů (především solí kyseliny močové) dostatečně vysoká, soli kyseliny močové se začínají srážet a v důsledku toho začíná být alantoická tekutina lehce zakalená. Alantoická tekutina se nahromaduje kolem 13. dne, kdy dosahuje maximálního objemu, obvykle 6 – 7 ml, někdy až 10 ml. Množství tekutiny je závislé i na teplotě inkubace, běžná teplota je 37,5 °C. Se snižující se teplotou inkubace se objem alantoické tekutiny snižuje. Během 14. – 19. dne inkubace objem alantoické tekutiny klesá, protože se absorbuje voda. Kolem 20. dne inkubace je alantoická dutina už vyplněna velkým množstvím pevných usazenin.¹¹

Fyziologické hodnoty koncentrace některých látek v alantoické tekutině jsou uvedeny v tabulce 1.¹²

Tabulka 1 – Fyziologické hodnoty koncentrace některých látek v alantoické tekutině kuřecích zárodků.¹²

	stáří embrya 10 dní	stáří embrya 15 dní
kyselina močová, mg L ⁻¹	1500	6300
glukosa, mg L ⁻¹	600	900
cholesterol, mg L ⁻¹	-	400
kyselina mléčná, mg L ⁻¹	400	-
vápník, mg L ⁻¹	260	290
celkový dusík, mg L ⁻¹	1000	2900
lipidy celkové, mg L ⁻¹	200	500
amoniak, mg L ⁻¹	100	100
chloridy, mg L ⁻¹	2500	2600

1. 4. 3 Krevní plazma kuřecích zárodků

Krev je tvořena kapalnou složkou – krevní plazmou, ve které jsou rozptýleny krevní elementy: bílé krvinky, červené krvinky a krevní destičky.

Plazma kuřecích zárodků ve stáří 10 dnů inkubace je velmi zředěná, obsahuje méně než 3 % rozpuštěných látek. Během dalšího vývoje tato koncentrace více než dvakrát vzroste. Největší nárůst koncentrace pevných látek je kolem 15. dne inkubace. Souběžně s vývojem embrya výrazně narůstají sérové proteiny. Jejich koncentrace vzroste téměř na dvojnásobnou hodnotu v době těsně před vylíhnutím. Jak je vidět z tabulky 2, roste koncentrace většiny látek.¹¹

Některé fyziologické hodnoty látek v krevní plazmě jsou uvedeny v tabulce 2.¹²

Tabulka 2 - Fyziologické hodnoty koncentrace některých látek v plazmě kuřecích zárodků.¹²

	stáří embrya 10 dní	stáří embrya 15 dní
kyselina močová, mg L ⁻¹	15, 5	23, 6
glukosa, mg L ⁻¹	1500	2000
cholesterol, mg L ⁻¹	1600	3000
kyselina mléčná, mg L ⁻¹	150	150
celkové proteiny, mg L ⁻¹	10400	13500
celkový dusík, mg L ⁻¹	1300	1900
fosfolipidy, mg L ⁻¹	6000	4400
volné aminokyseliny, mg L ⁻¹	240	310
chloridy, mg L ⁻¹	430	340

1. 5 Odpadní produkty metabolismu bílkovin u různých skupin živočichů

Konečnými produkty, kterými živočichové vylučují dusík vázaný v aminokyselinách, mohou být amoniak, kyselina močová nebo močovina.

Podle způsobu vylučování nadbytečného dusíku se živočichové dělí na amonotelní (vylučují amoniak), ureotelní (vylučují močovinu) a urikotelní (vylučují kyselinu močovou).

Amonotelní živočichové (většina vodních živočichů) jednoduše vylučují amoniak. Jejich vodné životní prostředí, které je nutí kontinuálně vylučovat vodu, usnadňuje exkreci vysoce toxického amoniaku.

Tam, kde není voda hojně přítomna, bylo nutno během evoluce vytvořit systém přeměňující amoniak na méně toxické odpadní produkty, jejichž vylučování nevyžaduje velké množství vody. Tímto odpadním produktem je močovina, kterou vylučuje většina suchozemských obratlovců.¹³

Dalším produktem je kyselina močová, kterou vylučují ptáci a suchozemští plazi. Tento systém exkrece dusíku má zřetelný význam, protože uchovává v těle vodu. Kyselina močová je pouze nepatrně rozpustná ve vodě, takže její vylučování v podobě krystalové pasty znamená jen malé ztráty vody.¹⁴ Je tedy hlavním odpadním

produktem u živočichů, kteří mají omezený přístup k vodě a musí ji šetřit.¹³ Vyloučení ekvivalentního množství (ve vodě mnohem více rozpustné) močoviny vyžaduje pro zachování osmotických poměrů značné množství vody.¹⁵

Někteří živočichové mohou svůj vylučovací mechanismus při nedostatku vody přepnout z amonotelního na ureotelní nebo urikotelní.

Mezi minoritní dusíkaté odpadní produkty patří trimethylamin oxid, guanin, kreatin, kreatinin a aminokyseliny.¹⁶

1.6 Metabolismus nukleotidů

Metabolické dráhy katabolismu purinových nukleotidů a deoxynukleotidů jsou u různých organismů odlišné, ale všechny vedou ke kyselině močové.

U ptáků, suchozemských plazů a mnohých druhů hmyzu je konečným produktem degradace purinových nukleosidů (adenosinu a guanosinu) kyselina močová. Tito živočichové nemají enzym urikasu (urátoxidasu) a vylučují kyselinu močovou a také guanin jako konečné metabolity katabolismu purinů.

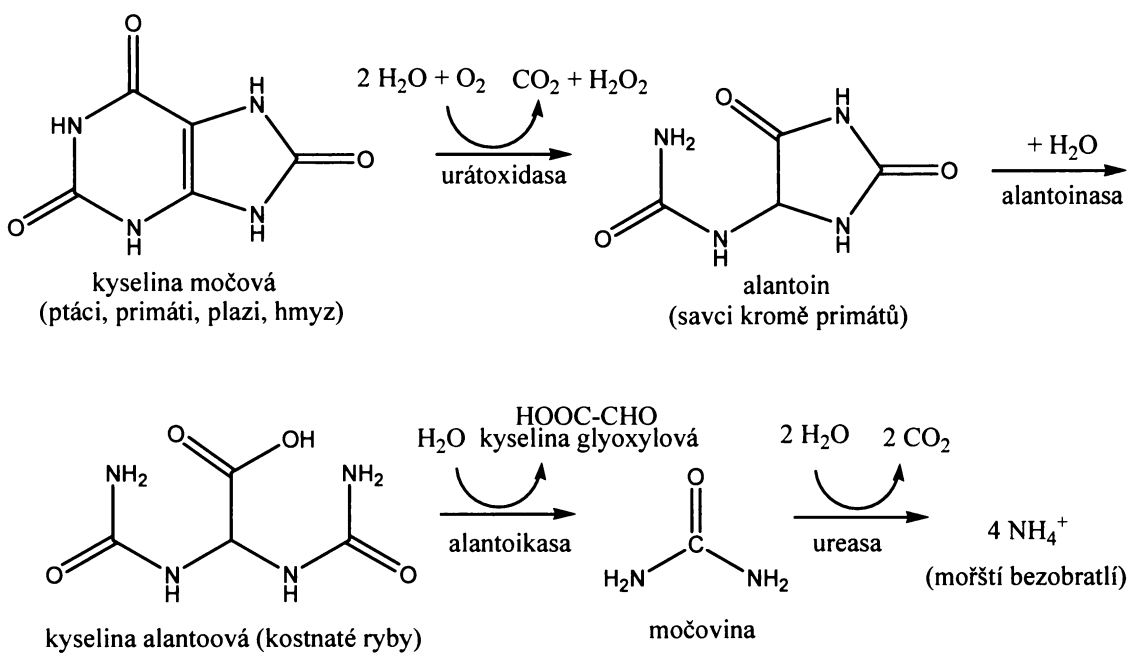
U ostatních organismů je před vyloučením kyselina močová dále metabolisována. Savci s výjimkou primátů oxidují kyselinu močovou na alantoin, který je z těla vylučován močí. Tato reakce je katalyzována enzymem urátoxidasou, která obsahuje měď. Člověk postrádá enzym urátoxidasu, který oxiduje kyselinu močovou na alantoin, a proto je u něj konečným produktem purinového katabolismu kyselina močová.¹⁷ Přítomnost alantoinu v plazmě člověka je výsledkem neenzymové oxidace.¹⁸

U kostnatých ryb je alantoin degradován alantoinasou na kyselinu alantoovou.

Chrupavčité ryby a obojživelníci ale tuto kyselinu přeměňují alantoikasou na vylučovanou močovinu a kyselinu glyoxylovou.

Mořští bezobratlí rozkládají močovinu a vylučují NH_4^+ .¹³

Všechny možnosti způsobu degradace kyseliny močové jsou uvedeny na obrázku 2.



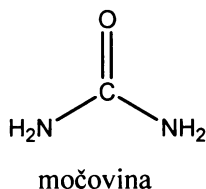
Obrázek 2 - Degradace kyseliny močové na NH_4^+ . U vyznačených druhů končí proces v různých stádiích. Jednotlivé dusíkaté sloučeniny jsou pak vyměšovány jako konečné metabolity.¹³

1. 7 Hlavní produkty metabolismu dusíku

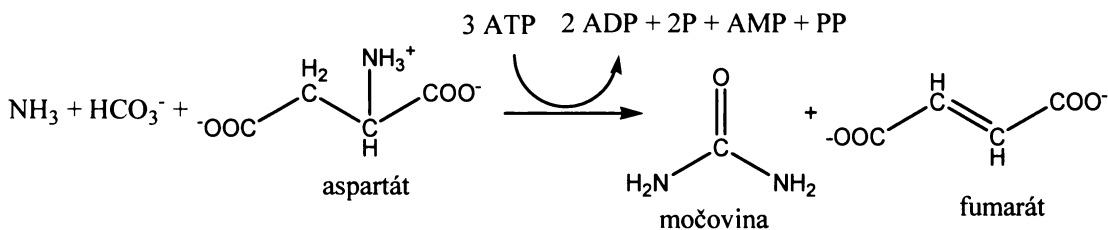
1. 7. 1 Močovina

Močovina (viz obrázek 3) se syntetizuje v játrech za pomoci enzymů močovinného cyklu. Poté se krevním oběhem dostává do ledvin, odkud se vylučuje z organismu močí.

Souhrnná reakce tvorby močoviny je popsána na obrázku 4.



Obrázek 3 – Vzorec močoviny.



Obrázek 4 – Souhrnná reakce tvorby močoviny v močovinovém cyklu. ¹⁹

Jeden atom dusíku v molekule močoviny pochází z amoniaku a druhý z asparagové kyseliny. Uhlík je poskytován hydrogenuhličitanem. ¹⁹

Člověk vylučuje močí asi 30 g močoviny za den. Močovina je výborně rozpustná ve vodě.

1. 7. 2 Amoniak

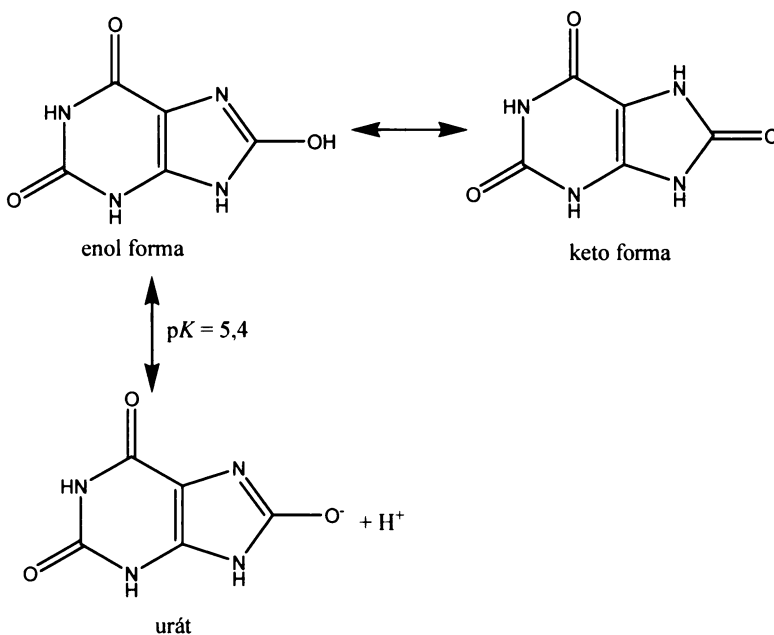
Amoniak je slabá báze, která ve vodném prostředí částečně disociuje. Poměr disociované a nedisociované formy závisí na hodnotě pH. NH_3 je malá molekula, je mírně rozpustná v tucích a proniká do buněčných membrán. ¹⁶

Amoniak, který v těle vzniká především deaminací α -aminodusíku aminokyselin, je pro všechny živočichy toxický. V lidských tkáních je amoniak nejprve detoxikován tak, že se váže na kyselinu glutamovou za vzniku glutaminu. Ten je z 95 % transportován do jater. V játrech probíhá deaminace glutaminu, při které se amoniak z glutaminu opět uvolňuje a zabudovává se do molekuly močoviny, netoxické sloučeniny. Zbylých 5 % glutaminu se transportuje do ledvin, kde se rozkládá za vzniku amoniaku, který je vyloučen močí.

Všude tam, kde jsou jaterní funkce vážně poškozené, např. u jaterní cirhózy, se amoniak hromadí v krvi a vznikají klinické příznaky jeho zvýšené koncentrace.

1. 7. 3 Kyselina močová

Kyselina močová (viz obrázek 5) je triviálním názvem 2,6,8-trihydroxypurin.



Obrázek 5 – Vzorec kyseliny močové (enol forma a keto forma) a její disociace při $pK_1 = 5,4$.

Kyselina močová je slabá dvojsytná kyselina s hodnotami disociačních konstant pK_1 5,4 a pK_2 11,3. V organismu se za fyziologických podmínek vyskytuje i v podobě močových solích K^+ , Na^+ nebo NH_4^+ .

Člověk vyloučí močí denně jen asi 1 g kyseliny močové v rozpuštěné formě. Z celkového množství kyseliny močové vyloučeného za 24 hodin připadá 70 – 80 % na ledviny. Asi 25 % této látky se vylučuje z organismu střevní sekrecí jako výkaly.²⁰

U lidí se část kyseliny močové neenzymaticky přeměňuje na allantoin (viz kapitola 1. 6) a poměr allantoin/kyselina močová se používá jako indikátor oxidačního stresu.²¹ Kyselina močová je dobrý vychytávač radikálů a antioxidant v mnoha lidských tkáních.¹⁶

1. 8 Klinický význam kyseliny močové

Kyselina močová je důležitý klinický marker pro řadu onemocnění. Její zvýšená koncentrace v tělních tekutinách vede k tomu, že se její krystalky vyloučí v kloubech, kde pak vyvolávají mechanická poškození, která se označují jako onemocnění dna. Vysoká koncentrace kyseliny močové v krvi (hyperurikémie) je spojována s ledvinovým selháním, chronickými ledvinovými nemocemi, leukémií a lymfomy, Lesch-Nyanovým syndromem, kardiovaskulárními nemocemi a dalšími patologickými stavy. Vyskytuje se také v případě alkoholového a drogového předávkování, obezité, diabetu, při zvýšené hladině cholesterolu nebo vysokém krevním tlaku.^{22, 23, 24}

1. 9 Metody stanovení kyseliny močové

Pro stanovení kyseliny močové v biologických vzorcích existuje řada metod.

V klinických laboratořích se běžně používají enzymatické metody založené na katalytické oxidaci kyseliny močové na alantoin v přítomnosti enzymu urát oxidasy (viz obrázek 2). Alantoin je následně stanovován kolorimetricky nebo pomocí průtokové injekční analýzy.^{25,26} Tyto metody vyžadují kontrolovanou teplotu, drahé a nestabilní chemikálie a relativně velké množství vzorku (100 µL).

Dalšími používanými metodami jsou kapalinová chromatografie na chemicky vázaných fázích a iontově výměnná chromatografie. HPLC je nejvíce používaná analytická metoda pro stanovení kyseliny močové v séru a v moči a to s elektrochemickou detekcí, UV detekcí nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Tato metoda má ale i své nedostatky. Mezi tyto nevýhody patří např. dlouhá doba analýzy, malá separační účinnost a poměrně krátká životnost kolony.²⁷

1. 9. 1 Stanovení kyseliny močové kapilární elektroforézou

Kapilární elektroforéza byla již několikrát použita pro stanovení kyseliny močové a dalších látek purinového metabolismu (xantinu, hypoxantinu).^{22, 23, 30}

Pro detekci kyseliny močové v CE se běžně používají fotometrické detektory pracující v UV oblasti spektra.^{28,29} Další možností je použití elektrochemických detektorů s uhlíkovou, měděnou nebo platinovou elektrodou.^{23, 30, 31,32}

V práci Boughtona a kol. byla použita metoda CE s elektrochemickou detekcí pro stanovení kyseliny močové v lidském séru.²³

Guan a kol. popsal citlivou metodu pro stanovení kyseliny močové, kyseliny p-aminohippurové, xantinu, hypoxantinu a kyseliny askorbové v lidských slinách a moči.^{22, 30}

Zinellu a kol. popsal CE metodu s detekcí v oblasti UV spektra pro stanovení kyseliny močové a askorbové v lidské plazmě.²⁷

V tabulce 3 jsou uvedeny vybrané analytické metody stanovení kyseliny močové.

Výhodou CE stanovení je kratší čas analýzy než u HPLC stanovení. Metoda CE vykazuje vysoké rozlišení. Velmi významnou charakteristikou CE metody pro klinické využití je velmi nízká cena analýzy. K analýze je třeba minimální množství pufru a velmi malý objem vzorku, což je pro analýzu biologického materiálu velice výhodné. Dalšími výhodami CE metod jsou přiměřená citlivost, automatizace (možnost využití autosamplerů) a mnohostrannost metody – separace analytů může být založena na jeho náboji, velikosti, hydrofobnosti nebo stereospecifitě. Vzorky jsou dávkovány rovnou do kapiláry bez komplikovaných úprav. U biologického materiálu stačí většinou vzorek jen naředit. Z těchto důvodů se stále častěji využívá metody CE v klinické oblasti.

Tabulka 3 – Vybrané analytické metody pro stanovení kyseliny močové v biologických vzorcích.

metoda	pufř / mobilní fáze	detekce	vzorek	LOD	lit.
voltametrická stanovení	0,1 M fosfátový pufř, pH = 7,2	fullerenem C ₆₀ elektroda z leštěného C	moč upravená moč	0,12 μM	33
injekční analýza	0,5 M kyselina sírová	amperometrická	moč	0,4 μM	34
HPLC	50 % citrát sodný a 50% acetonitril, pH = 6,5	MS	moč, sliny	0,42 μM	35
HPLC	10 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH = 4,7	UV – 220 nm	moč	0,65 μM	36
CE	50 mM MES/2 mM CTAB, pH = 7	amperometrická	krev	0,25 μM	23
CE	100 mM borax (H ₃ BO ₃ -Na ₂ B ₄ O ₇), pH = 8	UV – 292 nm	krev	2,97 μM	27
CE	50 mM glycinyglycin sodný, pH = 8	UV – 288 nm	krev	1,5 μM	29
CE	80 mM borax (H ₃ BO ₃ -Na ₂ B ₄ O ₇), pH = 9,2	amperometrická	krev	0,5 μM	30
CE	80 mM borax (H ₃ BO ₃ -Na ₂ B ₄ O ₇), pH = 7,8	amperometrická	sliny	0,1 μM	22
CE	80 mM tricin, pH = 8	amperometrická	moč, krev	1,19 μM	31

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje

Všechna měření byla provedena na přístroji kapilární elektroforézy HP^{3D} CE (Agilent, Německo) vybaveným vestavným DAD a kontrolovaným ChemStation softwarem.

2.2 Materiály

Ke stanovení kyseliny močové byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem 75 μm a s vnějším průměrem 375 μm (Composite Metal Services, UK). Její celková délka byla 77,5 cm, 69 cm k DAD.

Analýzy byly prováděny při kontrolované teplotě 25 °C.

Před prvním použitím byla kapilára promyta 20 min. 0,1 M NaOH, poté 20 min. deionizovanou vodou a nakonec byla naplněna pufrům, který byl v kapiláře ponechán přes noc.

Před každým stanovením biologického materiálu byla kapilára promývána 2 min. 0,1 M NaOH, 2 min. deionizovanou vodou a 3 minuty pufrům.

Vzorky byly dávkovány do kapiláry hydrodynamicky tlakem 1000 mbar s (50 mbar x 20 s). K separaci bylo použito napětí -25 kV.

2.3 Chemikálie

V průběhu stanovování kyseliny močové byly použity tyto chemikálie:

2-morfolinethansulfonová kyselina (MES), Sigma

p-aminosalicylová kyselina, Sigma

askorbová kyselina, Sigma

ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Sigma;

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Fluka

2-(Cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina (CHES), Fluka

hexadimethrin bromid (polybren), Fluka

kyselina močová, Fluka

acetonitril, Fluka

NaOH, Fluka

cystein, Fluka.

Veškeré používané chemikálie dosahovaly analytického stupně čistoty.

Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore, Bedford, USA). Byly připraveny zásobní roztoky kyseliny močové a kyseliny p-aminosalicylové o koncentraci 1 mg mL^{-1} , které byly rozpuštěny v deionizované vodě s přidavkem NaOH. Roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 mg mL^{-1} byl rozpuštěn v roztoku 100 mM cysteinu a 10 mM EDTA, aby se zabránilo standardní oxidaci. Pro přípravu separačního pufru byl použit zásobní roztok 0,01 % (w/v) polybrenu.

Všechny roztoky a separační pufr byly filtrovány přes $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ membránový filtr (TESSEK, Česká Republika).

Všechny roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pro měření pH roztoků byl použit pH metr (pMX 3000, Wissenschaft-lichen-Technischen-Werstätten, Germany).

2. 4 Vyvolání jednostranné ageneze u časných kuřecích zárodků

Kuřecí embrya z druhu Grey Leghorn (Koleč farma, Ústav Molekulární Genetiky, Akademie Věd, Česká Republika) byla inkubována při teplotě $37,5 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ a při relativní vlhkosti 55 – 65 %. Chirurgickým zákrokem byla u některých embryí ve stáří 36 – 42 hod. vyvolána jednostranná ledvinová ageneze podle Bishop-Calame. Skrz vyvrtané okénko ve skořápce embrya byl přerušen mezonefrický kanálek a tím vyvolána jednostranná ageneze ledviny. Poté bylo okénko zakryté parafilmem.

Operovaná embrya i kontrolní vzorky byly inkubovány po dobu 10 – 14 dnů. Poté bylo otevřeno okénko ve skořápce a odebrány tekutiny. Alantoická tekutina byla odebírána z povrchově nechráněného alantoického obalu použitím ostré

skleněné mikropipety o objemu 1 mL. Vzorky alantoické tekutiny byly odebírány do 1 mL mikrozkuvek (Eppendorf). Krev byla odebírána ostrou mikropipetou o průměru kolem 20 μm . Krevní plazma byla oddělena centrifugací od krevních buněk a poté byl odečten hematokrit. Vzorky byly odebrány do 0,1 mL mikrozkuvek (Eppendorf). Všechny vzorky plazmy i alantoické tekutiny byly zamraženy na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. 5 Příprava vzorku plazmy pro CE analýzu

2. 5. 1 Deproteinizace kuřecí plazmy acetonitrilem

Acetonitril je přidáván do biologického vzorku jako deproteinizační činidlo, aby se zabránilo adsorpci proteinů na stěnu kapiláry.⁸

5 μL plazmy bylo smícháno v mikrozkuvce Eppendorf s 10 μL acetonitrilu. Tato směs byla centrifugována 5 minut při odstředivém zrychlení 4000 g. Supernatant byl odebrán a převeden do plastové vialky s insertem a nadávkován do kapiláry.

2. 5. 2 Úprava vzorku kuřecí plazmy alkalizací a ředěním

1 μL kuřecí plazmy byl rozpuštěn v plastové vialce s insertem v 1 μL směsi (0,1 M NaOH a 50 mg L^{-1} kyseliny p-aminosalicylové) a přidalo se 8 μL vody. Tato směs byla rovnou dávkována do kapiláry. Celková koncentrace NaOH ve vzorku byla 0,01 M a koncentrace kyseliny p-aminosalicylové byla 5 mg L^{-1} . Plazma byla 10x ředěná.

2. 5. 3 Příprava vzorku alantoické tekutiny pro CE analýzu

50 μL alantoické tekutiny se rozpustilo se 50 μL 0,2 M NaOH, přidalo se 20 μL kyseliny p-aminosalicylové (1 mg mL^{-1}) a vzorek se doplnil do 1 mL přidáním 880 μL vody. Takto připravený vzorek byl dávkován do kapiláry. Celková koncentrace NaOH ve vzorku byla 0,01 M a koncentrace kyseliny p-aminosalicylové byla 20 mg L^{-1} . Alantoická tekutina se ředila 20x.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Pufry

Pro stanovení kyseliny močové, askorbové a p-aminosalicylové (vnitřní standard) byly testovány dva separační pufry. Jedním z nich byl CHES/Tris a druhým MES/Tris. Tyto pufry vykazují poměrně malou elektrickou vodivost, nízkou mobilitu a mohou být použity i ve vysokých koncentracích, aniž by elektrický proud při CE separaci překročil únosnou mez. Výhodou použití separačního pufru o vysoké koncentraci jednotlivých složek je účinné potlačování adsorpce látek ze vzorku biologického materiálu na stěnu kapiláry.

Koncentrace MES nebo CHES byla zvolena konstantní (60 mM) a optimalizována byla koncentrace Tris v rozmezí 10 – 50 mM. Optimálního složení separačního pufru bylo dosaženo s 60 mM MES + 30 mM Tris (pH = 6,1), nebo 60 mM CHES + 30 mM Tris (pH = 8,6).

Do pufru byla přidána povrchově aktivní látka polybren o výsledné koncentraci 0,001 % (w/v). Polybren se adsorbuje na stěnu kapiláry a obrací elektroosmotický tok, který pak má stejný směr jako migrace aniontů (kyseliny močové, askorbové i p-aminosalicylové). Výsledkem bylo, že se snížil migrační čas aniontů kyseliny močové, askorbové i p-aminosalicylové.

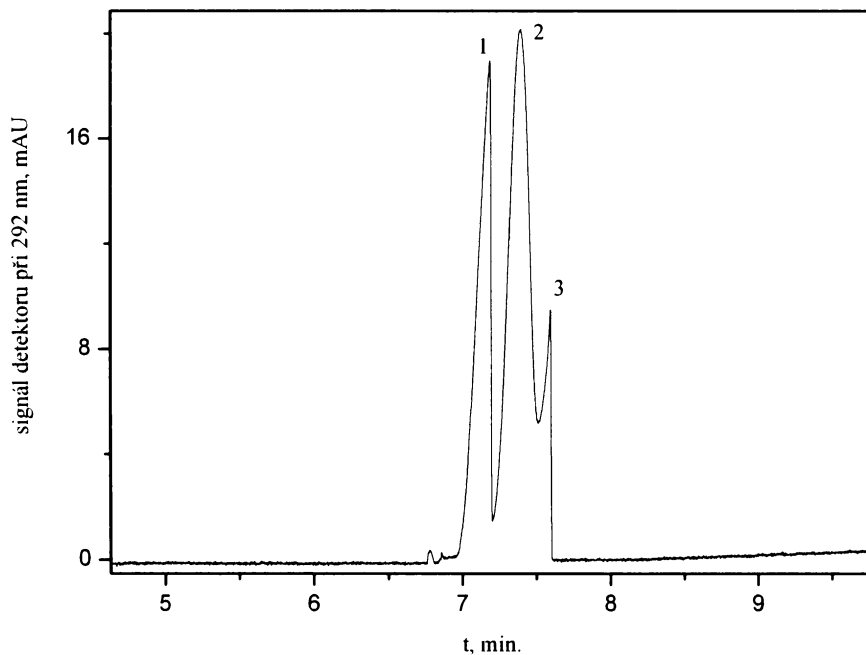
Jako modelový vzorek byla namíchána směs kyseliny močové (25 mg L⁻¹), askorbové (50 mg L⁻¹) a p-aminosalicylové (20 mg L⁻¹). Z grafu 1 a grafu 2 je vidět, že při použití pufru CHES/Tris se látky od sebe úplně neoddělily, a proto byl pro další analýzy používán pufr MES/Tris.

Při použití pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % (w/v) polybren vykazovala směs vyšší separační účinnost 156 000 ± 13 000 počet teoretických pater pro kyselinu močovou a rozlišení kyseliny močové a askorbové bylo 5,6 ± 0,4. Při použití pufru 60 mM CHES + 30 mM Tris + 0,001 % (w/v) polybren vykazoval systém účinnost více než 10x nižší, 10 500 ± 420 počet teoretických pater pro kyselinu močovou a rozlišení kyseliny močové a askorbové bylo pouze 0,83 ± 0,1. Nižší účinnost může být způsobena vyšší elektrodisperzí analytů vedoucí k rozmývání píku kyseliny močové.

Tabulka 4 ukazuje průměrné hodnoty ($n = 3$) migračních časů, šířek píků v polovině výšky píku, počty teoretických pater a rozlišení vzhledem ke kyselině močové pro CE separaci modelového vzorku kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L^{-1}), močové (25 mg L^{-1}) a askorbové (50 mg L^{-1}) v separačním pufru $60 \text{ mM CHES} + 30 \text{ mM Tris} + 0,001 \%$ polybren (pH 8,6). Tabulka 5 ukazuje stejné parametry, ale pro CE separaci modelového vzorku v separačním pufru $60 \text{ mM MES} + 30 \text{ mM Tris} + 0,001 \%$ polybren (pH 6,1).

Rozdílnost v pH pufrů (MES/Tris pH = 6,1 a CHES/Tris pH = 8,6) může za změny v mobilitě testovaných slabých kyselin.

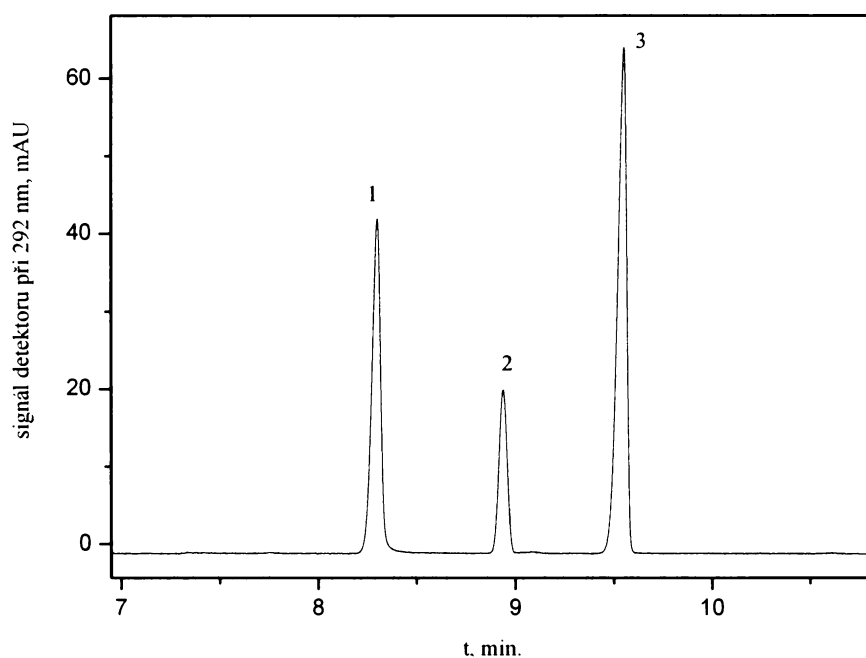
Protože mnohem lepší separace sledovaných analytů bylo dosaženo v separačním pufru $60 \text{ mM MES} + 30 \text{ mM Tris} + 0,001 \%$ polybren (pH 6,1), byl při všech dalších analýzách (modelových vzorků, vzorků plazmy a alantoické tekutiny) používán výhradně tento separační pufr.



Graf 1 - Elektroferogram separace kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L^{-1}), močové (25 mg L^{-1}) a askorbové (50 mg L^{-1}) při použití separačního pufru $60 \text{ mM CHES} + 30 \text{ mM Tris} + 0,001 \%$ polybren (pH 8,6). Identifikace píků: 1 – kyselina p-aminosalicylová, 2 – kyselina močová, 3 – kyselina askorbová.

Tabulka 4 – Hodnoty migračních časů, šířek píků v polovině výšky píku, počtu teoretických pater a rozlišení vzhledem ke kyselině močové pro CE separaci modelové směsi kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L^{-1}), močové (25 mg L^{-1}) a askorbové (50 mg L^{-1}) v separačním pufru $60 \text{ mM CHES} + 30 \text{ mM Tris} + 0,001 \%$ polybren ($\text{pH } 8,6$).

	t (min.)	$w_{1/2}$ (min.)	N	rozlišení
kyselina p-aminosalicylová	7,14	0,102	27 100	0,77
kyselina močová	7,35	0,169	10 500	-
kyselina askorbová	7,54	0,061	84 600	0,83



Graf 2 - Elektroferogram separace kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L^{-1}), močové (25 mg L^{-1}) a askorbové (50 mg L^{-1}) při použití separačního pufru $60 \text{ mM MES} + 30 \text{ mM Tris} + 0,001 \%$ polybren ($\text{pH } 6,1$). Identifikace píků: 1 – kyselina p-aminosalicylová, 2 – kyselina askorbová, 3 – kyselina močová.

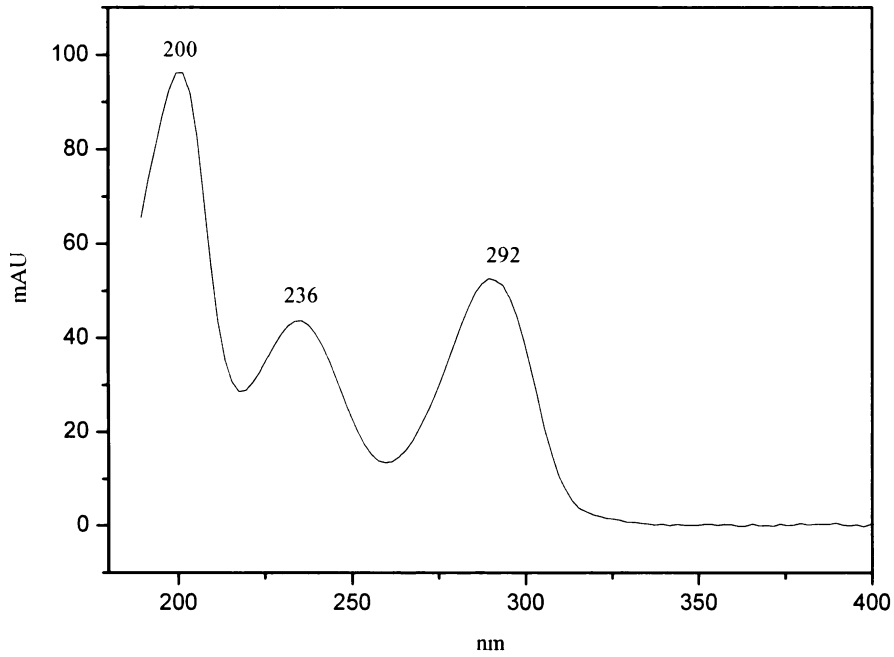
Tabulka 5 - Hodnoty migračních časů, šířek píků v polovině výšky píku, počtu teoretických pater a rozlišení vzhledem ke kyselině močové pro CE separaci modelové směsi kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L⁻¹), močové (25 mg L⁻¹) a askorbové (50 mg L⁻¹) v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1).

	<i>t</i> (min.)	<i>w</i> ½ (min.)	<i>N</i>	rozlišení
kyselina p-aminosalicylová	8,18	0,053	132 000	11,1
kyselina askorbová	8,79	0,051	164 600	5,6
kyselina močová	9,39	0,056	156 000	-

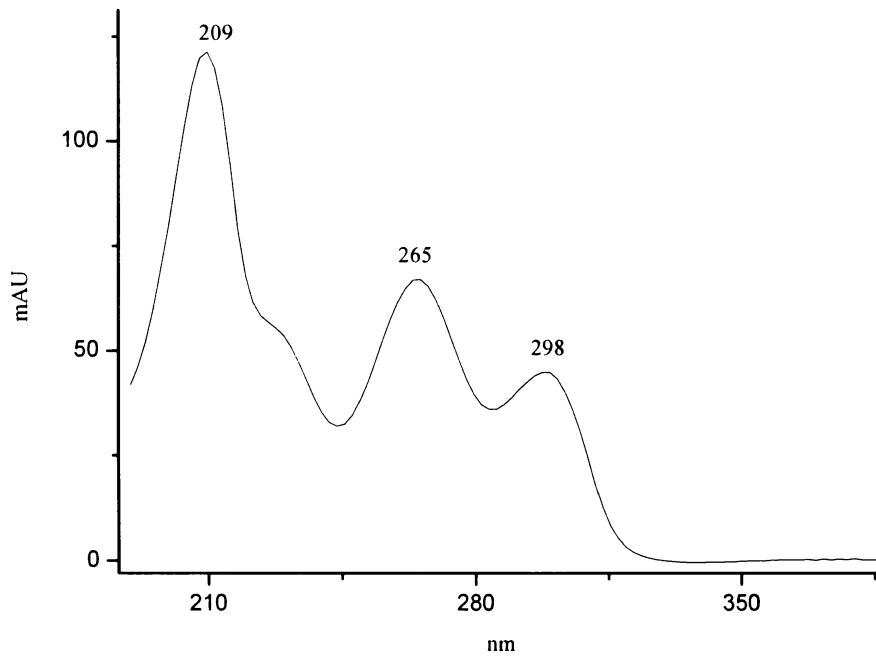
3.2 Absorpční spektra sledovaných analytů

Kyseliny p-aminosalicylová a močová byly detekovány v UV oblasti spektra. Byla proměřena absorpční spektra pro tyto látky v UV oblasti 190 nm – 400 nm. Průběhy těchto spekter pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v grafu 3 a grafu 4. Kyselina močová má tři absorpční maxima: při 200, 236 a 292 nm (viz graf 3) a kyselina p-aminosalicylová při 200, 265 a 298 nm (viz graf 4).

Získaná UV spektra byla použita při identifikaci těchto látek ve vzorcích biologického materiálu. Vzhledem k tomu, že kyselina močová má výrazné absorpční maximum při vlnové délce 292 nm, byly při této vlnové délce vyhodnocovány parametry píků kyseliny močové.



Graf 3 – Absorpční spektrum kyseliny močové (25 mg L^{-1}) v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1).



Graf 4 – Absorpční spektrum kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L^{-1}) v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1).

3.3 Kalibrační závislosti

Závislost odezvy detektoru na koncentraci dávkovaného analytu lze popsat obecně platnou rovnicí přímky:

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

kde a je konstantní člen závislosti, b je konstanta úměrnosti mající význam citlivosti stanovení a může být určena z výšky píku nebo z jeho plochy, c je koncentrace analytu a i je faktor linearity.

Kalibrační závislosti byly naměřeny pro modelový vzorek kyseliny močové metodou kalibrační přímky v rozmezí koncentrací 0,5 – 100 mg L⁻¹. Dále byly naměřeny kalibrační závislosti pro kyselinu močovou v plazmě a alantoické tekutině metodou standardního přídatku. Všechny koncentrace byly měřeny třikrát a pro vyhodnocení se používaly průměrné hodnoty těchto měření.

Limit detekce byl vypočítán pro výšku píku odpovídající trojnásobku šumu detektoru. Limit detekce je 0,2 mg L⁻¹ (1,2 μM) a je srovnatelný s limity detekce uváděné pro optické nebo elektrochemické detektory.^{21-23, 27-36}

Limit stanovení byl vypočítán pro výšku píku odpovídající desetinásobku šumu detektoru. Limit stanovení je 0,7 mg L⁻¹ (4,0 μM).

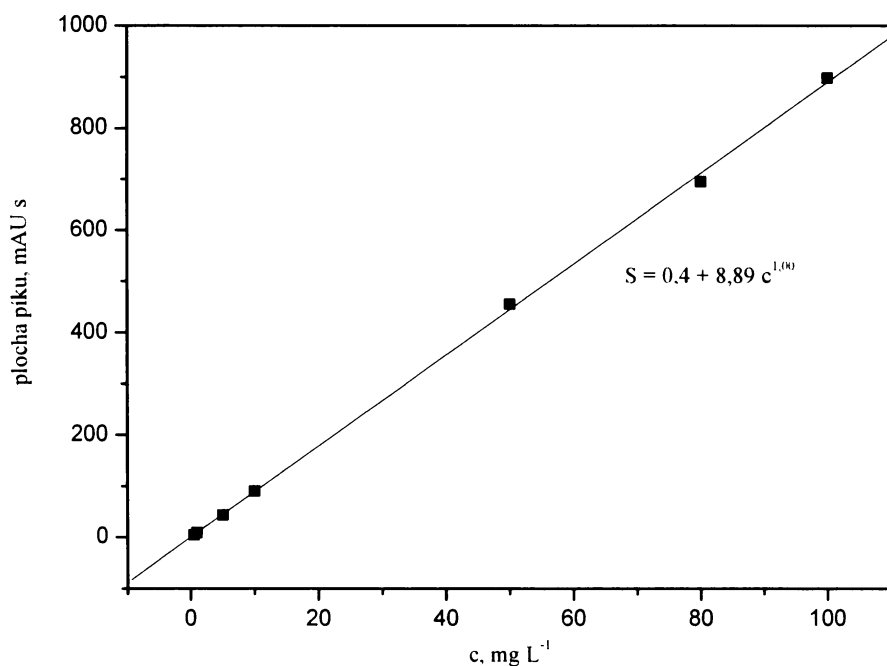
3.3.1 Kalibrační závislosti modelového vzorku kyseliny močové

Naměřené koncentrace byly vyhodnocovány jak z výšky, tak z plochy píků a jejich závislost na koncentraci byla zpracována regresní analýzou. Parametry lineární kalibrační závislosti pro CE stanovení kyseliny močové v jejím modelovém vzorku jsou uvedeny v tabulce 6. Experimentálně změřená závislost plochy píku na koncentraci kyseliny močové je zobrazena v grafu 5.

Rovnice kalibrační závislosti pro modelovou směs kyseliny močové je $S = 0,40 + 8,89 c^{1,00}$.

Tabulka 6 – Parametry závislosti plochy píku na koncentraci pro stanovení kyseliny močové v jejím modelovém vzorku, použitý separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1); v závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek.

parametr	modelový vzorek
testované koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	0,5 - 100
lineární dynamický rozsah, mg L ⁻¹	0,5 - 100
citlivost, <i>b</i> , mAU s L mg ⁻¹	8,89 (0,10)
úsek, <i>a</i> , mAU s	0,40 (5,03)
směrodatná odchylka, mAU s	9,82
korelační koeficient, <i>R</i>	0,999
počet měření, <i>n</i>	7
faktor linearity <i>i</i>	1,00 (0,01)



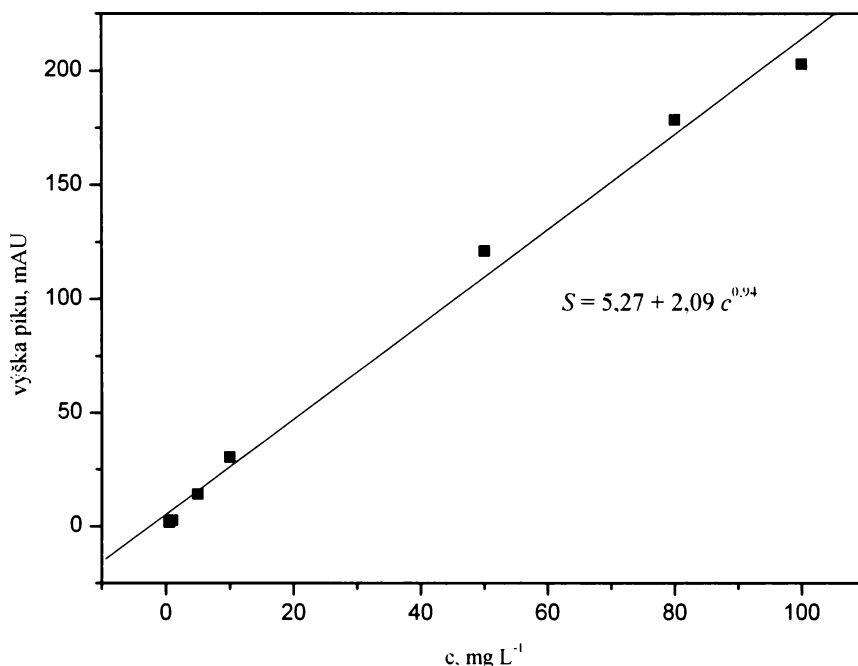
Graf 5 – Kalibrační přímka pro stanovení kyseliny močové v jejím modelovém vzorku vyhodnocená z ploch píků, použitý separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1).

Experimentálně změřená závislost výšky píku na koncentraci kyseliny močové je zobrazena v grafu 6. Parametry této závislosti získané metodou regresní analýzy jsou uvedené v tabulce 7.

Rovnice kalibrační závislosti pro modelový vzorek kyseliny močové je $S = 5,27 + 2,09 c^{0,94}$.

Tabulka 7 - Parametry závislosti výšky píku na koncentraci pro stanovení kyseliny močové v jejím modelovém vzorku, použitý separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001% polybren (pH 6,1); v závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek.

parametr	modelový vzorek
testovaný rozsah koncentrace, mg L ⁻¹	0,5 – 100
lineární dynamický rozsah, mg L ⁻¹	0,5 - 10
citlivost, b , mAU L mg ⁻¹	2,09 (0,08)
úsek, a , mAU	5,27 (4,34)
směrodatná odchylka, mAU	8,47
korelační koeficient, R	0,996
počet měření, n	7
faktor linearity i	0,94 (0,02)
LOD, mg L ⁻¹	0,2
LOD, μM	1,2
LOQ, mg L ⁻¹	0,7
LOQ, μM	4,0



Graf 6 – Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny močové v modelovém vzorku vyhodnocená z výšek píků, použitý separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1).

Jak vyplývá z grafu 5 a grafu 6, je lepší při stanovení kyseliny močové metodou CE vyhodnocovat koncentrační závislosti z ploch píků spíše než z výšek píků. Při vyhodnocování odezvy detektoru z výšek píků byl pozorován větší odklon od lineární závislosti při vyšších koncentracích analytu.

3. 3. 2 Kalibrační závislosti pro kyselinu močovou ve vzorku plazmy a alantoické tekutiny

V tabulce 8 jsou uvedené parametry kalibrační závislosti stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků stanovené metodou standardního přídávku a vyhodnocené z ploch píků. Vzorky plazmy i alantoické tekutiny byly připraveny výše uvedeným způsobem (kapitola 2. 5. 2 a 2. 5. 3). Ke vzorku 10x ředěné plazmy byly přidávány přídatky kyseliny močové

o koncentraci 0,5; 1 a 2 mg L⁻¹. Původní koncentrace kyseliny močové v neředěné plazmě byla 19,05 ± 0,51 mg L⁻¹. Do vzorku 20x ředěné alantoické tekutiny byly přídavky 5; 10 a 20 mg L⁻¹. Původní koncentrace kyseliny močové v neředěné alantoické tekutině byla 692,4 ± 27,7 mg L⁻¹. Všechny vzorky byly měřeny třikrát.

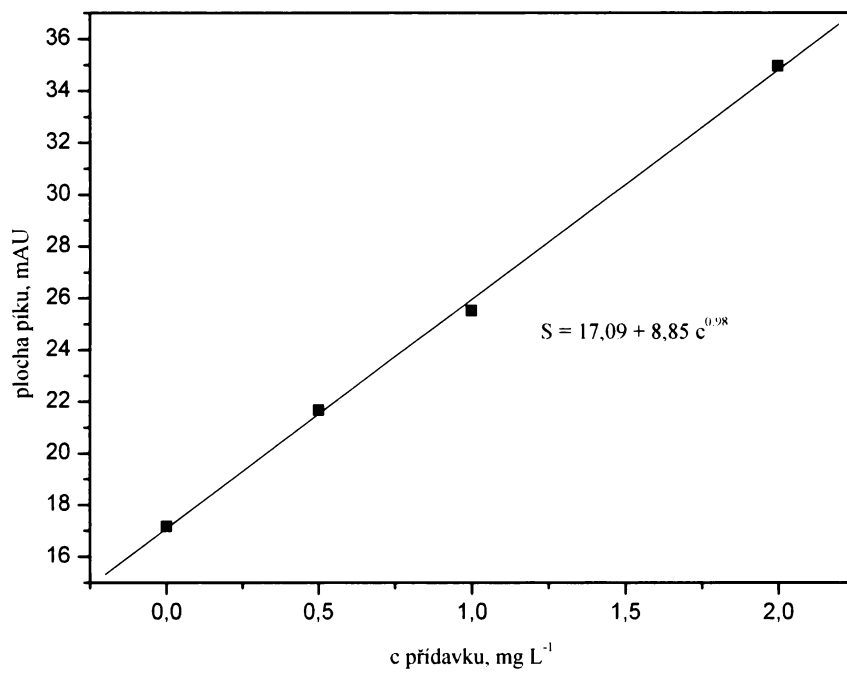
V tabulce 8 jsou uvedené parametry závislosti získané metodou lineární regrese pro plazmu a pro alantoickou tekutinu. Rovnice kalibrační závislosti pro metodu standardního přídavku kyseliny močové do plazmy je $S = 17,09 + 8,85 c^{0,98}$ a pro alantoickou tekutinu $S = 347,8 + 9,19 c^{1,00}$.

Experimentálně změřená závislost výšky píku na koncentraci kyseliny močové v plazmě je zobrazena v grafu 7 a v alantoické tekutině v grafu 8.

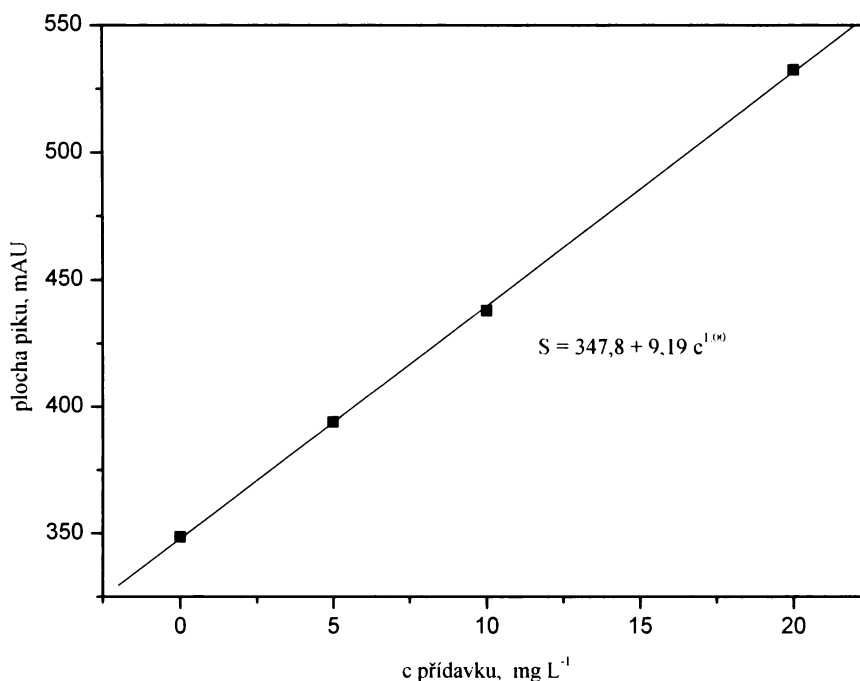
Dosažená citlivost a LOD u plazmy a alantoické tekutiny kuřecích zárodků vypočítaná z výšky píku odpovídající trojnásobku šumu detektoru je prakticky stejná. Hodnota limitu detekce je 0,2 mg L⁻¹ (1,2 μM).

Tabulka 8 - Parametry závislosti plochy píku na velikosti přídavku kyseliny močové do vzorku 10x ředěné plazmy a do vzorku 20x ředěné alantoické tekutiny, v závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek.

	plazma	alantoická tekutina
přídavky mg L ⁻¹	0 – 2	0 – 20
citlivost, b , mAU s L mg ⁻¹	8,85 (0,23)	9,19 (0,16)
úsek, a , mAU s	17,09 (0,26)	347,8 (1,16)
směrodatná odchylka, mAU s	0,34	1,450
korelační koeficient, R	0,999	0,999
faktor linearity, i	0,98 (0,03)	1,00 (0,01)
počet měření, n	4	4



Graf 7 - Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci přidavku kyseliny močové do 10 x ředěné plazmy vyhodnocená z ploch píků, použitý separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1). Původní koncentrace kyseliny močové v neředěné plazmě je $19,05 \pm 0,51 \text{ mg L}^{-1}$.



Graf 8 - Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci přídavku kyseliny močové do vzorku 20x ředěné alantoické tekutiny vyhodnocená z ploch píků, použitý separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1). Původní koncentrace kyseliny močové v nefeděné alantoické tekutině je $692,4 \pm 27,7 \text{ mg L}^{-1}$.

3. 3. 3 Migrační časy

Migrační čas kyseliny močové v modelovém vzorku je $9,5 \pm 0,3 \text{ min.}$, v alantoické tekutině $9,9 \pm 0,2 \text{ min.}$ a v plazmě $11,5 \pm 0,2 \text{ min.}$ Migrační čas kyseliny p-aminosalicylové v modelovém vzorku je $8,1 \pm 0,3 \text{ min.}$, v plazmě $9,7 \pm 0,2 \text{ min.}$ a v alantoické tekutině $8,6 \pm 0,2 \text{ min.}$ Hodnoty těchto migračních časů jsou uvedeny v tabulce 9. Pomalejší migrační časy u vzorků plazmy jsou způsobené adsorpcí proteinů na kapilární stěnu, která vede ke zpomalení elektroosmotického toku.

Tabulka 9 – Průměrné hodnoty migračních časů kyseliny močové a kyseliny p-aminosalicylové pro modelový vzorek kyseliny močové, plazmu a alantoickou tekutinu; v závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek.

	modelový vzorek	plazma	alantoická tekutina
průměrný t kyseliny močové, min.	9,5 (0,3)	11,5 (0,2)	9,9 (0,2)
průměrný t kyseliny p-aminosalicylové, min.	8,1 (0,3)	9,7 (0,2)	8,6 (0,2)

3. 4 Opakovatelnost a analytická výtěžnost CE stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině

Opakovatelnost vyvinuté metody byla ověřována při opakovaném stanovení kyseliny močové ve vybraném vzorku plazmy a alantoické tekutiny. Před každou analýzou byla plazma i alantoická tekutina opakovaně zpracována podle výše uvedeného postupu (kapitola 2. 5. 2 a 2. 5. 3). Vzorek byl po přípravě okamžitě analyzován a všechna měření byla provedena v jeden den.

Hodnoty variačního koeficientu plochy píku a migračních časů pro vzorek plazmy i alantoické tekutiny jsou uvedené v tabulce 10. Výsledná hodnota variačního koeficientu pro plochu píku vzorku 10x ředěné plazmy (celková koncentrace neředěné plazmy je $19,05 \pm 0,51 \text{ mg L}^{-1}$) je 2,64 % a pro 20x ředěnou alantoickou tekutinu (celková koncentrace neředěné plazmy je $692,4 \pm 27,7 \text{ mg L}^{-1}$) je 4,05 %. Tyto hodnoty vykazují, že přesnost metody stanovení kyseliny močové je vyhovující. Výsledná hodnota variačního koeficientu pro průměrný migrační čas stejného vzorku 10x ředěné plazmy je 2,43 % a pro 20x ředěný stejný vzorek alantoické tekutiny je 1,19 %. I tyto hodnoty vykazují, že přesnost metody je vyhovující.

V tabulce 10 jsou uvedené průměrné plochy píků (mAU s) a průměrné migrační časy (min.) a jejich variační koeficienty.

Tabulka 10 – Opakovatelnost měření CE stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků s průměrnou koncentrací kyseliny močové v 10 x ředěné plazmě (koncentrace neředěné plazmy je $19,05 \pm 0,51 \text{ mg L}^{-1}$) a ve 20x ředěné alantoické tekutině koncentrace neředěné alantoické tekutiny je $692,4 \pm 27,7 \text{ mg L}^{-1}$). Standardní odchylky jsou uvedené v závorkách.

parametr	plazma	alantoická tekutina
průměrná plocha píku, mAU s	17,33 (0,46)	308,12 (12,48)
variační koeficient, %	2,64	4,05
průměrný migrační čas, min.	11,50 (0,28)	10,92 (0,13)
variační koeficient, %	2,43	1,19
počet opakování	7	6

Metoda standardního přídatku byla použita pro vyhodnocení analytické výtěžnosti CE stanovení kyseliny močové v plazmě i alantoické tekutině vyhodnocením ploch píků. Průměrné hodnoty analytické výtěžnosti byly pro plazmu $98,5 \pm 1,0 \%$ a pro alantoickou tekutinu $100,8 \pm 0,6 \%$ (viz tabulka 11). Tyto hodnoty jsou zcela vyhovující.

Tabulka 11 – Analytická výtěžnost měření kyseliny močové metodou CE v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků vyhodnocená z ploch píků. V závorkách jsou uvedené standardní odchylky.

Plazma			Alantoická tekutina		
Přídavek, mg L^{-1}	Koncentrace, mg L^{-1}	Analytická výtěžnost, %	Přídavek, mg L^{-1}	Koncentrace, mg L^{-1}	Analytická výtěžnost, %
0	19,05	-	0	774,2	-
5	23,92	99,5	100	875,0	100,1
10	28,20	97,1	200	988,9	101,5
20	38,67	99,0	400	1182,7	100,7
Průměr, %		98,5 (1,0)	Průměr, %		100,8 (0,6)

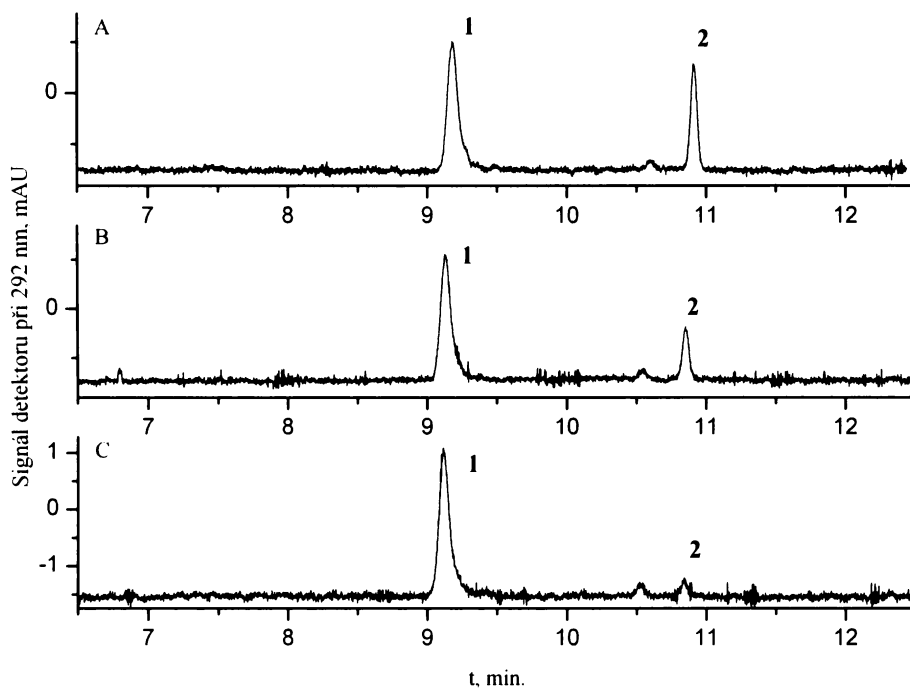
3. 5 Stanovení kyseliny močové v plazmě po deproteinizaci s acetonitrilem

Acetonitril je přidáván do biologického vzorku jako deproteinizační činidlo, aby se zabránilo adsorpci proteinů na stěnu kapiláry.⁸ Vzorek plazmy, který byl deproteinizován acetonitrilem, byl analyzován v pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1). Graf 9 ukazuje elektroferogramy kuřecí plazmy deproteinizované acetonitrilem, které byly analyzovány ihned po přípravě vzorku – panel A, panel B je měřený po 12 minutách po přípravě a panel C po 24 minutách od přípravy. Z grafu 9 je vidět, že koncentrace kyseliny močové ve vzorku klesá s rostoucím časem od přípravy vzorku po 12 minutách na 59 % původní plochy píku a po dalších 12 minutách (tj. po 24 minutách od přípravy vzorku) na 17 % původní naměřené plochy píku kyseliny močové (viz tabulka 12).

Přidáním acetonitrilu do vzorku se zřejmě kyselina močová postupně přeměňuje na nerozpustnou neutrální formu. Deproteinizace vzorku plazmy silnými kyselinami (HClO₄, sulfosalicylovou kyselinou) má stejný účinek jako acetonitril. Při stanovení kyseliny močové ve vzorku plazmy se spoléhalo na potlačení adsorpce proteinů relativně vysokou koncentrací složek pufru a mezi analýzami jsem důkladně promývala kapiláru 2 min. 0,1 M NaOH, 2 min. deionizovanou vodou a 3 min. puftrem.

Tabulka 12 – Plocha píků a procentuální hodnota plochy píku vzorku plazmy deproteinizované acetonitrilem a analyzované ihned po přípravě, po 12 a 24 minutách.

doba po přípravě vzorku, min.	plocha píku, mAU s	%
0	7,85	100
12	4,67	59
24	1,32	17

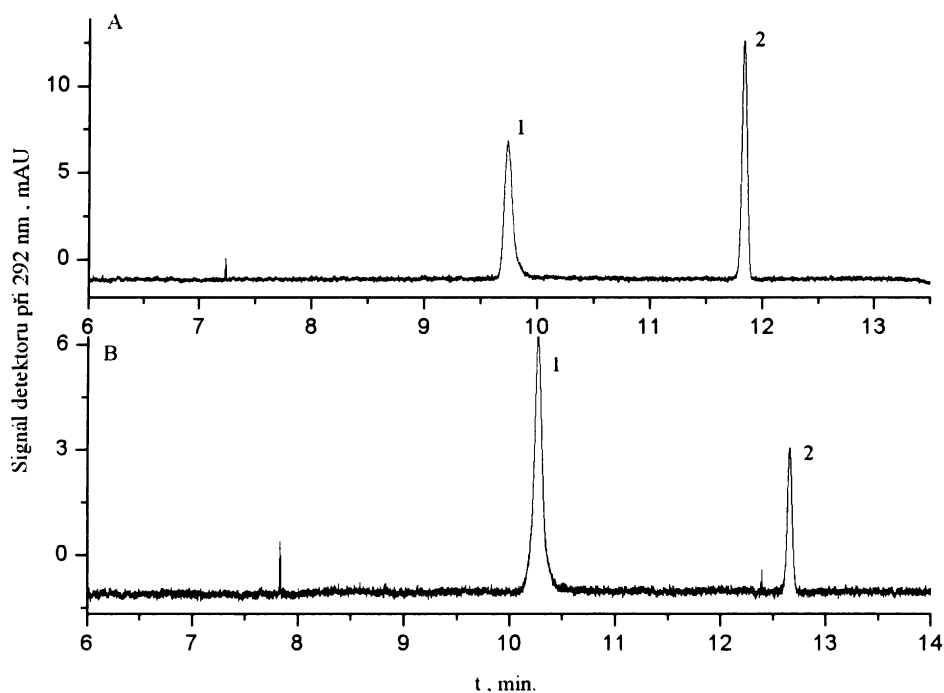


Graf 9 - Elektroferogramy separace plazmy deproteinizované acetonitrilem v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1). Panel A - vzorek byl analyzován ihned po smíchání s acetonitrilem; panel B – po 12 minutách po smíchání s acetonitrilem; panel C – po 24 minutách po smíchání s acetonitrilem.

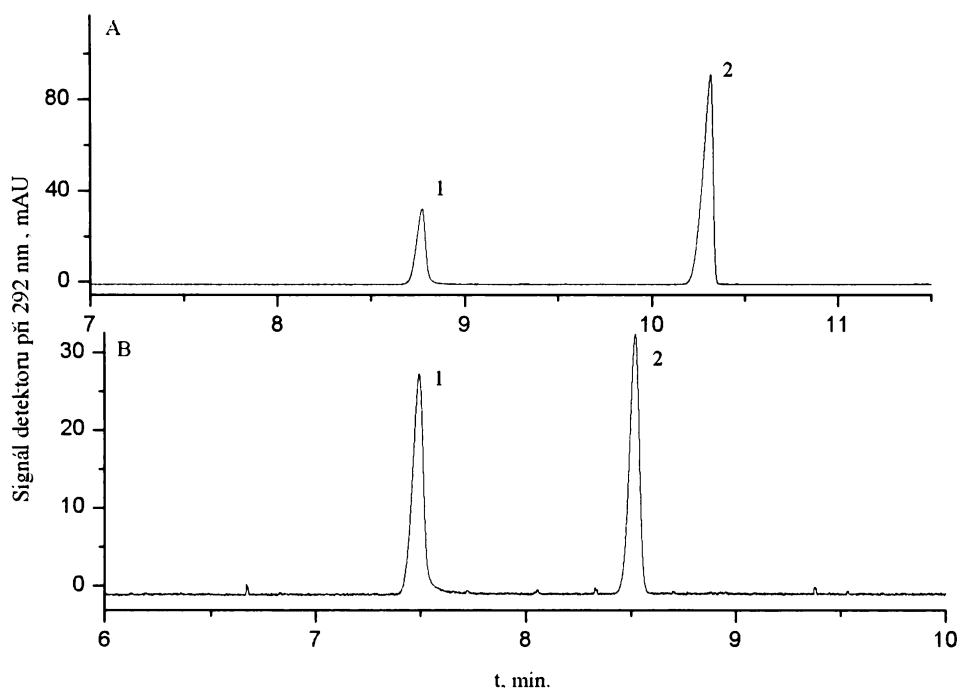
3. 6 Praktická stanovení kyseliny močové v kuřecí plazmě a alantoické tekutině

Vyvinutá CE metoda stanovení kyseliny močové byla použita pro praktické stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích embryí (stáří 10 – 14 dní). Graf 10 ukazuje koncentrace kyseliny močové v 10x ředěné plazmě – panel A je výsledná koncentrace $51,2 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ a panel B $15,8 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$. Graf 11 ukazuje koncentraci kyseliny močové ve 20x ředěné alantoické tekutině kuřecích zárodků – panel A je výsledná koncentrace $1397,8 \pm 11,9 \text{ mg L}^{-1}$ a panel B $821,2 \pm 5,2 \text{ mg L}^{-1}$. Odezva UV detektoru byla zaznamenávána při 292 nm. Pík kyseliny askorbové není vidět, protože stanovení této kyseliny vyžaduje přidavek

antioxidačního činidla do vzorku, aby se zabránilo oxidaci kyseliny askorbové vzdušným kyslíkem.



Graf 10 – Elektroferogram stanovení koncentrace kyseliny močové v 10x ředěné plazmě kuřecích zárodků v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1) s vysokým obsahem kyseliny močové – panel A výsledná koncentrace $51,2 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ a panel B s nízkým obsahem kyseliny močové o výsledné koncentraci $15,8 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$. Identifikace píků: 1 - kyselina p-aminosalicylová, 2 – kyselina močová.



Graf 11 – Elektroferogram stanovení koncentrace kyseliny močové ve 20x ředěné alantoické tekutině kuřecích zárodků v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1) s vysokým obsahem kyseliny močové – panel A výsledná koncentrace je $1397,8 \pm 11,9 \text{ mg L}^{-1}$ a panel B s nízkým obsahem kyseliny močové o výsledné koncentraci $821,2 \pm 5,2 \text{ mg L}^{-1}$. Identifikace píků: 1 – kyselina p-aminosalicylová, 2 – kyselina močová.

V tabulce 13 a tabulce 14 jsou uvedena rozmezí, průměr a odchylky hodnot koncentrace kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků. Vzorky byly rozdělené na dvě skupiny: U⁺ (embrya s vyvolanou agenezí ledviny) a Kon (kontrolní skupina).

Výsledné hodnoty byly statisticky vyhodnoceny testem ANOVA a t-testem na hladině významnosti 0,05. Tyto testy byly vyhodnocovány pomocí programu Origin 6. 1, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

Tabulka 13 – Průměrné hodnoty, koncentrační rozmezí a směrodatné odchylky (uvedené v závorkách) stanovení koncentrace kyseliny močové v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1) v **plazmě** kuřecích zárodků ve stáří 10 a 14 dní.

	stáří 10 dní	stáří 14 dní
zárodky s agenezí ledviny		
průměrná hodnota kyseliny močové , mg L ⁻¹	43,6 (17,1)	72,5 (54,1)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	12,3 - 82,5	34,2 – 110,7
počet embryí	14	2
kontrolní skupina, Kon		
průměrná hodnoty kyseliny močové, mg L ⁻¹	22,3 (10,2)	19,6 (11,1)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	11,7 – 46,5	10,5 – 40,3
počet embryí	11	6

Tabulka 14 - Průměrné hodnoty, koncentrační rozmezí a směrodatné odchylky (uvedené v závorkách) stanovení koncentrace kyseliny močové v separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1) v **alantoické tekutině** kuřecích zárodků ve stáří 10, 12 a 14 dní.

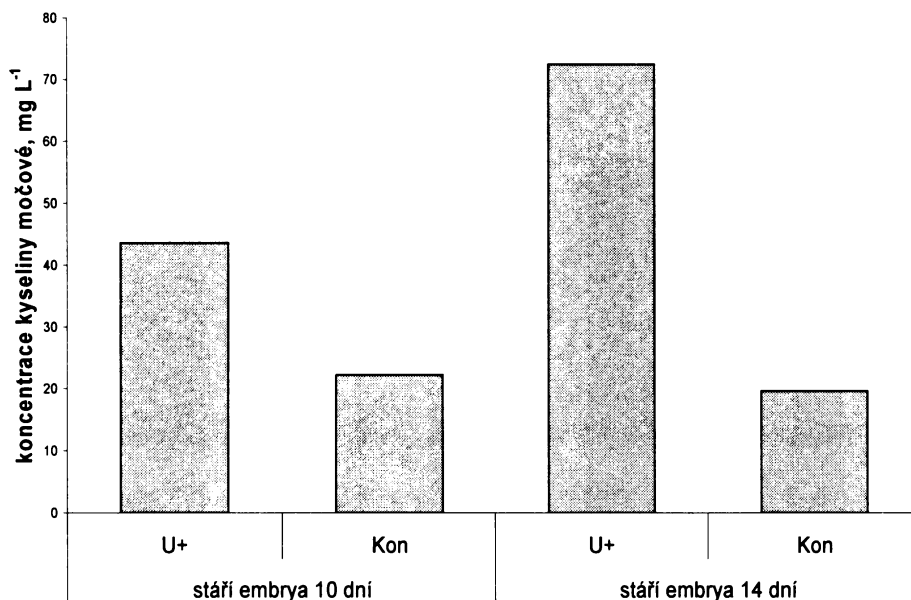
	stáří 10 dní	stáří 12 dní	stáří 14 dní
zárodky s agenezí ledviny			
průměrná koncentrace kyseliny močové, mg L ⁻¹	808,7 (313,4)	886,1 (443,8)	1426,5 (543,0)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	143,4 - 1208,5	645,4 - 1534	910,8 – 1375,5
počet embryí	14	7	3
kontrolní skupina, Kon			
průměrná koncentrace kyseliny močové , mg L ⁻¹	939,8 (278,9)	901,4 (240,3)	1264,1 (566,3)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	542,4 – 1397,8	504,6 – 1202,7	485,4 – 2061,8
počet embryí	10	6	7

Statistické vyhodnocení ukázalo, že průměrná hodnota koncentrace kyseliny močové v plazmě u skupiny kuřecích zárodků s agenezí ledviny ve stáří 10ti dnů ($43,6 \pm 17,1 \text{ mg L}^{-1}$) je dvakrát vyšší než u kontrolní skupiny ve stejném stáří ($22,3 \pm 10,2 \text{ mg L}^{-1}$) a tento rozdíl je na hladině významnosti 0,05 statisticky významný podle obou testů – ANOVA i t-testu.

U 14ti denních zárodků je u skupiny s agenezí ledviny ($72,5 \pm 54,1 \text{ mg L}^{-1}$) hodnota koncentrace kyseliny močové dokonce více než třikrát vyšší než u kontrolní skupiny ($19,6 \pm 11,1 \text{ mg L}^{-1}$) a tento rozdíl je na hladině významnosti 0,05 také statisticky významný. Ve skupině zárodků s agenezí ledviny byla ale pouze dvě embrya a tak tento údaj není příliš vypovídající. Ve sloupcovém grafu 12 je znázorněný rozdíl mezi skupinami s agenezí ledviny a kontrolní skupinou ve stáří 10 a 14 dnů.

U 14ti denních zárodků s agenezí ledviny je koncentrace kyseliny močové 1,7x vyšší ($72,5 \pm 54,1 \text{ mg L}^{-1}$) než u 10ti denních zárodků ($43,6 \pm 17,1 \text{ mg L}^{-1}$). Statisticky významný rozdíl ale nebyl prokázán, neboť ve skupině 14ti denních zárodků byla pouze 2 embrya.

Tyto výsledky potvrzují nedostatečnost jedné embryonální ledviny účinně odstraňovat kyselinu močovou z krve.

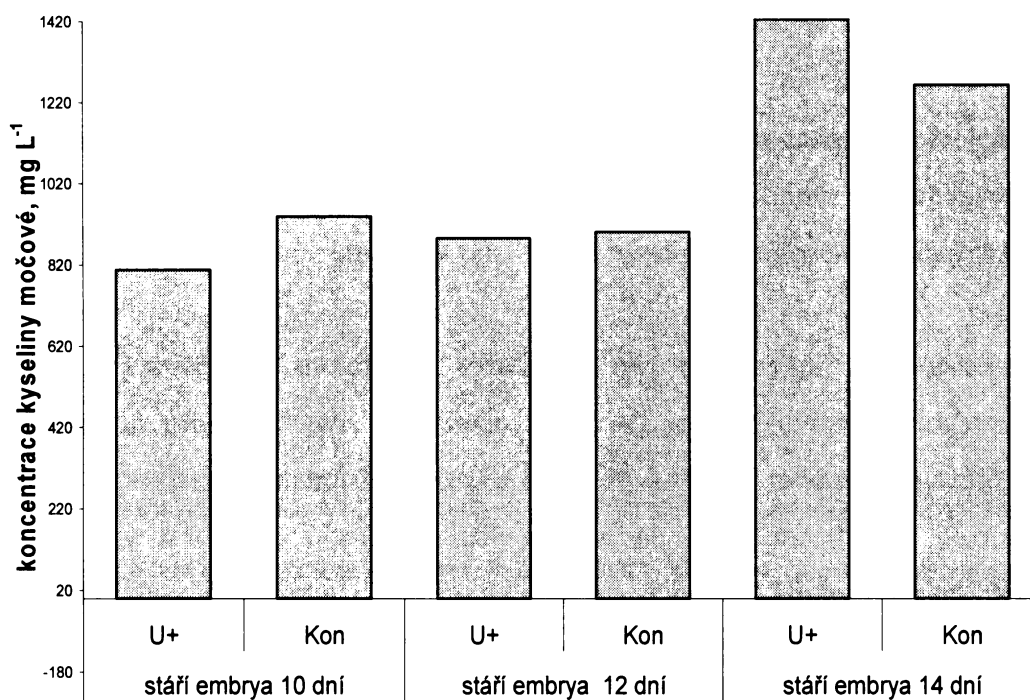


Graf 12 – Porovnání hodnot koncentrace kyseliny močové v plazmě mezi skupinou kuřecích zárodků s agenezí ledviny U⁺ a kontrolní skupinou Kon ve stáří embrya 10 a 14 dnů.

Koncentrace kyseliny močové v alantoické tekutině je u všech skupin 10 – 100 x vyšší než v plazmě.

Rozdíl hladiny koncentrace kyseliny močové mezi skupinou kuřecích zárodků ve věku 10 dnů s agenezí ledviny ($808,7 \pm 313,4 \text{ mg L}^{-1}$) a kontrolní skupinou ($939,8 \pm 278,9 \text{ mg L}^{-1}$) není na hladině významnosti 0,05 statisticky významný podle obou testů (ANOVA i t-testu). Ani rozdíly mezi koncentrací kyseliny močové v alantoické tekutině kuřecích zárodků s agenezí ledviny a kontrolní skupinou ve věku 12 a 14 dní nejsou statisticky významné. Ve sloupcovém grafu 13 je znázorněný rozdíl mezi skupinami s agenezí ledviny a kontrolní skupinou u embryí ve stáří 10, 12 a 14 dnů.

U odběru alantoické tekutiny mohlo dojít k neúplnému odebrání veškeré alantoické tekutiny. Zároveň je možné, že byla kyselina močová vysrážena ve formě krystalků na dně alantoického vaku. Vzorek nebyl tedy zcela homogenní, a proto koncentrace kyseliny močové v alantoické tekutině nevykazuje žádné statisticky významné rozdíly.



Graf 13 - Porovnání hodnot koncentrace kyseliny močové v alantoické tekutině mezi skupinou kuřecích zárodků s agenezí ledviny U⁺ a kontrolní skupinou Kon ve stáří embrya 10, 12 a 14 dnů.

4 ZÁVĚR

Při CE stanovení kyseliny močové v biologických vzorcích se osvědčil separační pufr MES/Tris. Nízká vodivost obou složek separačního pufru umožňuje použít vysokou koncentraci pufru a tím výrazně chrání vnitřní povrch křemenné kapiláry před nežádoucí adsorpcí proteinů.

V optimalizovaném separačním pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1) bylo dosaženo úplného oddělení kyseliny močové, askorbové a p-aminosalicylové za dobu kratší než 15 minut. Dosažený limit detekce pro kyselinu močovou $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ je dostatečně nízký pro použití vypracované metody při analýzách reálných klinických vzorků.

Variační koeficient pro opakovatelnost CE metody stanovení kyseliny močové určený z plochy píků je 2,64 % pro plazmu a 4,05 % pro alantoickou tekutinu kuřecích zárodků. Tyto hodnoty vykazují, že přesnost metody je zcela vyhovující. Průměrná hodnota analytické výtěžnosti metody pro plazmu je $98,5 \pm 1 \%$ a pro alantoickou tekutinu $100,8 \pm 0,6 \%$. I tyto hodnoty jsou zcela vyhovující.

Pomocí této metody je možné stanovovat hladinu kyseliny močové ve velmi malém množství vzorku. Analýzy byly prováděny v $1 \mu\text{L}$ plazmy kuřecích zárodků. Metoda byla použita pro CE stanovení kyseliny močové u časných kuřecích zárodků ve stáří 10, 12 a 14 dnů v jejich plazmě a alantoické tekutině. Kuřecí zárodky byly rozděleny do 2 skupin - embrya s operativně vyvolanou agenezí ledviny a kontrolní skupina.

Vypracovaná metoda je využitelná pro odhalování hyperurikémie, jejíž výskyt má přímou souvislost s nedostatečností jedné ledviny odstraňovat z krve odpadní produkty metabolismu dusíku. Hodnoty kyseliny močové v plazmě kuřecích zárodků se statisticky významně lišily na hladině významnosti 0,05 mezi skupinou kuřecích zárodků s agenezí ledviny a kontrolní skupinou. Hodnoty kyseliny močové v alantoické tekutině se statisticky významně nelišily na hladině významnosti 0,05 u žádných skupin.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Gaš, B.: *Vesmír*, 80, 2001, 370 – 371
2. Li, S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis – Principles, Practice and Applications*, 1992, J. Chromatogr. Library, 52, Elsevier, Amsterdam
3. Heiger, D.: *High performance capillary electrophoresis*, 2000, Agilent Technologies
4. Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, 2002, Karolinum Praha
5. Petersen, J. R., Okorodudu, A. O., Mohammad A., Payne, D. A.: *Clin. Chim. Acta*, 2003, 330, 1 – 30
6. Gong, X. Y.; Hauser, P. C.: *Electrophoresis*, 2006, 27, 468 – 473
7. Tůma, P., Samcová E., Andělová K.: *J. Chromatogr. B*, 2006, 839, 12 – 18
8. Samcová, E., Tůma, P.: *Electroanalysis*, 2006, 18, 152 – 157
9. Tůma, P., Samcová, E., Balínová, P.: *J. Chromatogr. B*, 2005, 821, 53 – 59
10. Sládeček, F.: *Rozmnožování a vývoj živočichů*, 1986, Academia Praha
11. Romanoff, A. L.: *The Avian Embryo – Structural and functional development*, 1960, The Maxmilian Company, New York
12. Romanoff, A. L.: *Biochemistry of the Avian Embryo*, 1960, Interscience Publishers a division of John Wiley and Sons, New York, London, Sydney
13. Voet, D., Voetová J. G.: *Biochemie*, 1995, Victoria Publishing
14. Simoyi, M. F., Van Dyke, K., Klandorf H.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002; 282, 791 – 796
15. Kodíček, M.: *Biochemické pojmy*, 2004, Vydavatelství VŠCHT Praha
16. Wright, P. A.: *J. Exp. Biol.*, 1995, 198, 273 – 281
17. Devlin, T. M.: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 1992, Wiley-Liss, New York
18. Hediger, M. A., Johnson, J. R., Miyazaki, H., Endou, H.: *Physiol.*, 2005, 20, 125 – 133
19. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova biochemie*; 2002, vydavatelství H + H

20. Šebesta, I.: *Poruchy metabolismu purinů*, Ústav klinické a biochemie VFN a 1.LF UK Praha, <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text8.htm>
21. Thasar, E., Arad, Z., Izhaki, I., Guglielmo, Ch. G.: *J. Comp. Physiol. B*, 2006, 176, 653 – 661
22. Guan, Y., Chu, Q., Ye, J.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 380, 913 – 917
23. Boughton, J. L., Robinson, B. W., Strein, G. T.: *Electrophoresis*, 2002, 23, 3705 – 3710
24. Luo, Y-Ch., Do, J-S., Liu Ch.: *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22, 482 – 488
25. Duncan, P. H., Gochman, N., Cooper, T., Smith, E., Bayse, D.: *Clin. Chem.*, 1982, 28, 284 – 290
26. Pérez-Bendito, D., Gómez-Hens, A., Gutiérrez, M. C., Antón, S.: *Clin. Chem.*, 1989, 35, 230 – 233
27. Zinellu, A., Carru, C., Sotgia, S., Deiana, L.: *Anal. Biochem.*, 2004, 330, 298 – 305
28. Chen, M. L., Liu, T. Z., Lu, F. J., Chiu, D. T.: *Clin. Biochem.*, 1999, 32, 473 – 476
29. Zinellu, A., Sotgia, S., Caddeo, S., Deiana, L., Carru, C.: *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 2193 – 2199
30. Guan, Y., Wu, T., Ye, J.: *J. Chromatogr. B*, 2005, 821, 229 – 234
31. Xu, D. K., Hua, L., Li, Z. M., Chen, H. Y.: *J. Chromatogr. B*, 1997, 694, 461 – 466
32. Fanguy, J. C., Henry, Ch. S.: *Electrophoresis*, 2002, 23, 767 – 773
33. Goyal, R. N., Gupta, V. K., Sangal, A., Bachheti, N.: *Electroanalysis*, 2005, 17, 2217 – 2223
34. Silva, M. L. S., Garcia M. B. Q., Lima, J. L. F. C., Santos, J. L. M., Barrado, E.: *Electroanalysis*, 2005, 17, 2156 – 2162
35. Perreló, J., Sanchis, P., Grases, F.: *J. Chromatogr. B*, 2005, 824, 175 – 180
36. George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K., Ramgaokar, J. S.: *J. Chromatogr. B*, 2006, 832, 134 – 137