

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Stanovení kyseliny močové v alantoické tekutině
a plazmě kapilární elektroforézou

Rigorózní práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Mgr. Jana Matějčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. RNDr. Petru Tůmovi, Ph.D., Doc. RNDr. Evě Samcové, CSc., kolektivu 3. LF UK Oddělení biochemie, buněčné a molekulární biologie a mé rodině, kteří mi ve všem podporovali.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně 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 20. srpna 2008


Mgr. Jana Matějčková

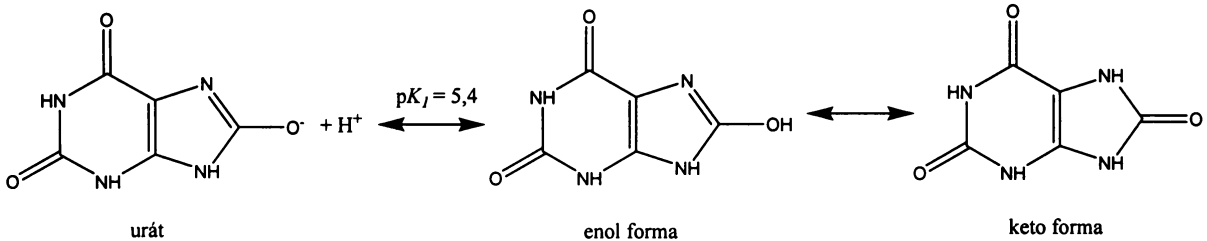
Obsah

Obsah.....	4
1 ÚVOD.....	5
1.1 Kyselina močová	5
1.2 Klinický význam kyseliny močové	5
1.3 Katabolismus purinových nukleotidů.....	6
1.4 Odpadní produkty metabolismu bílkovin u různých skupin živočichů.....	7
1.5 Alantois a alantoická tekutina	8
1.6 Krevní plazma kuřecích zárodků.....	9
1.7 Metody stanovení kyseliny močové	10
1.8 Stanovení kyseliny močové kapilární elektroforézou	11
2 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	13
2.1 Pufry	13
2.2 Kalibrační závislosti	15
2.3 Opakovatelnost a analytická výtěžnost CE stanovení kyseliny močové....	16
2.3 Srovnání metod stanovení kyseliny močové	17
2.4 Stanovení kyseliny močové v kuřecí plazmě a alantoické tekutině	17
3 ZÁVĚR.....	21
4 LITERATURA	22
5 PŘÍLOHA.....	24

1 ÚVOD

1.1 Kyselina močová

Kyselina močová (obrázek 1) je triviálním názvem 2,6,8-trihydroxypurin.



Obrázek 1 – 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.

Kyselina močová se v organismu vyskytuje jako konečný produkt metabolismu purinových nukleotidů. Za fyziologických podmínek se v organismu vyskytuje i v podobě močových solí 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 % kyseliny močové se vylučuje z organismu ve formě výkalů.^{1,2,3}

Většina syntetizované kyseliny močové (90 %) se v ledvinách zpětně vstřebává do krve a podílí se na antioxidační ochraně organismu. Kyselina močová je dobrý vychytávač radikálů a antioxidant v mnoha lidských tkáních.⁴ U lidí se část kyseliny močové neenzymaticky přeměňuje na alantoin a poměr alantoin/kyselina močová se používá jako indikátor oxidačního stresu.⁵

1.2 Klinický význam kyseliny močové

Kyselina močová je důležitým klinickým markerem pro řadu onemocnění. Při zvýšené koncentraci v tělních tekutinách 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 mellitu, při zvýšené hladině cholesterolu nebo vysokém krevním tlaku.^{6,7,8}

1.3 Katabolismus purinových nukleotidů

Kyselina močová je konečným produktem katabolismu purinových nukleotidů a deoxynukleotidů. Adenosin je nejprve deaminován adenosindeaminasou na inosin. Z inosinu nebo guanosinu se uvolní pomocí enzymu purinnukleosidfosforylasy ribosa-1-fosfát a purinová báze (hypoxanthin nebo guanin). Hypoxanthin se xanthinoxidasou, guanin guanasou, přemění na xanthin, který je xanthinoxidasou oxidován na kyselinu močovou.⁹

Savci s výjimkou primátů kyselinu močovou před vyloučením dále metabolizují. Oxidují ji na alantoin, který je z těla vylučován močí. Tato reakce je katalyzována enzymem urát oxidasou (urikasou), která obsahuje měď. Člověk postrádá enzym urát oxidasu, a proto je u něj konečným produktem purinového katabolismu kyselina močová.² Přítomnost alantoinu v plazmě člověka je výsledkem neenzymové oxidace.¹⁰

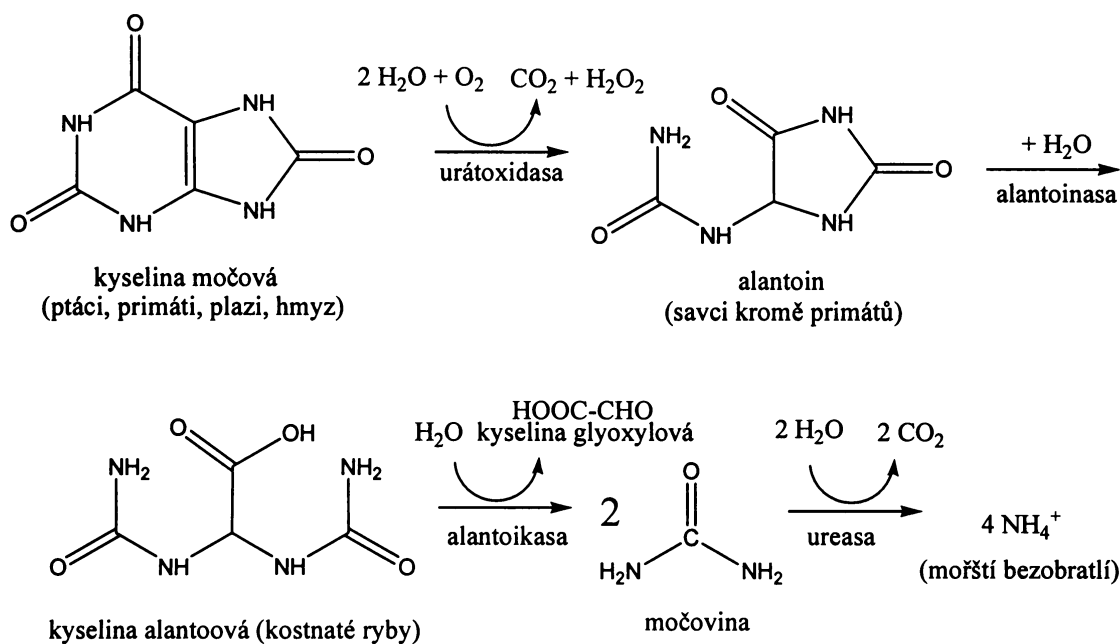
Ptáci, suchozemští plazi a mnohé druhy hmyzu také nemají enzym urát oxidasu a vylučují kyselinu močovou a také guanin jako konečné metabolity katabolismu purinů.

U kostnatých ryb je alantoin degradován alantoinasou na kyselinu alantoovou.

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

Mořští bezobratlí rozkládají močovinu a vylučují NH_4^+ .¹

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.¹

1.4 Odpadní produkty metabolismu bílkovin u různých skupin živočichů

Konečnými produkty, kterými živočichové vylučují dusík vázaný v aminokyselinách, mohou být amoniak (amonotelní živočichové), kyselina močová (urikotelní živočichové) nebo močovina (ureotelní živočichové).

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

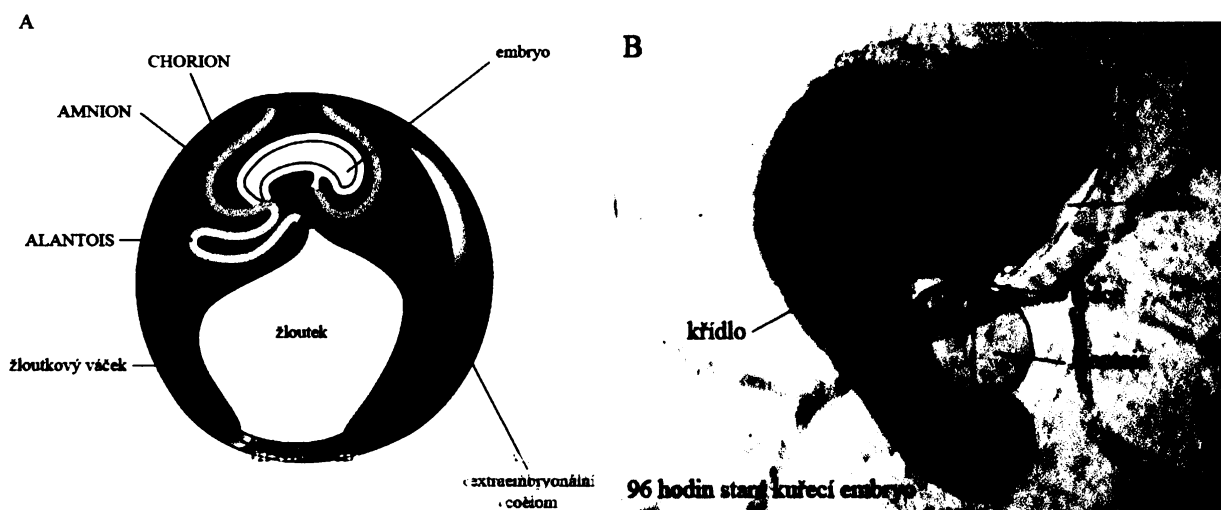
Tam, kde není voda hojně přítomna, bylo nutno během evoluce vytvořit systém přeměňující amoniak na méně toxické odpadní produkty. Tímto odpadním produktem je močovina, kterou vylučuje většina suchozemských obratlovců. Močovina se syntetizuje v játrech za pomoci enzymů močovinového cyklu. Poté se krevním oběhem dostává do ledvin, odkud se vylučuje z organismu močí.¹

Dalším produktem je kyselina močová, kterou vylučují ptáci a suchozemští plazi. Tento systém exkrece dusíku uchovává v těle vodu. Kyselina močová je pouze nepatrně rozpustná ve vodě, takže její vylučování v podobě krystalové pasty znamená jen malé ztráty vody.¹¹ Je tedy hlavním odpadním produktem u živočichů, kteří mají omezený přístup k vodě a musí ji šetřit.¹²

Mezi minoritní dusíkaté odpadní produkty patří trimethylamin oxid, guanin, kreatin, kreatinin a aminokyseliny.⁵

1.5 Alantois a alantoická tekutina

Zárodečné obaly jsou chápány jako přizpůsobení organismů suchozemskému způsobu života. Obsahují tekutiny, které nahrazují vyvíjejícímu se zárodku vodné prostředí, chrání zárodek 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 (obrázek 3).¹³



Obrázek 3 - A: Vývoj kuřecího embrya a jeho zárodečné obaly. **B:** Fotografie 96 hodin starého kuřecího embrya s vyznačeným alantoisem a amnionem.¹⁴

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 embryonálních ledvin. Dýchání se účastní pouze vnější stěna alantoisu, která plní během

embryonálního života funkci plic. Vnější stěna se spojuje s chorionem, který se nachází přímo pod skořepinovou membránou, a vytváří vnitřní povrch vaječné skořápky. Vnitřní stěna alantoisu má spíše jen mechanický význam.

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 zárodku začíná přitékat do alantoisu alantoická tekutina 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 (tabulka 1). 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 již vyplněna velkým množstvím pevných usazenin.^{15, 16}

1. 6 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 vzroste na více než dvojnásobek. Největší nárůst koncentrace pevných látek je kolem 15. dne inkubace.¹⁵

Fyziologické hodnoty koncentrace některých látek v plazmě alantoické tekutiny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 – Fyziologické hodnoty koncentrace některých látek v alantoické tekutině a plazmě kuřecích zárodků 10 a 15 dní po vylíhnutí.¹⁶

	Alantoická tekutina		Plazma	
	stáří 10 dní	stáří 15 dní	stáří 10 dní	stáří 15 dní
kyselina močová, mg L ⁻¹	1500	6300	15, 5	23, 6
glukosa, mg L ⁻¹	600	900	1500	2000
cholesterol, mg L ⁻¹	-	400	1600	3000
kyselina mléčná, mg L ⁻¹	400	-	150	150
celkový dusík, mg L ⁻¹	1000	2900	1300	1900
chloridy, mg L ⁻¹	2500	2600	430	340

1.7 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 a peroxid vodíku v přítomnosti enzymu urát oxidasy (viz obrázek 2). Alantoin může být následně stanovován kolorimetricky nebo pomocí průtokové injekční analýzy.^{17,18} Je možné stanovovat i vzniklý peroxid vodíku oxidační kopulací se sodnou solí N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidinu a 4-aminoantipyrinem za katalýzy enzymem peroxidasou.¹⁹ Jiný enzymatický test stanovuje peroxid vodíku (vzniklý reakcí kyseliny močové s enzymem urikasou) s kyselinou 2,4,6-tribrom-3-hydroxybenzoovou a 4-aminoantipyrinem také za katalýzy peroxidasy.²⁰ Tyto metody vyžadují kontrolovanou teplotu, drahé a nestabilní chemikálie a relativně velké množství vzorku (200 µL).

Dalšími používanými metodami jsou kapalinová chromatografie na chemicky vázaných fázích a iontově výměnná chromatografie. Vysokoučinná kapalinová 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. Mezi nevýhody tohoto stanovení patří např. dlouhá doba analýzy, malá separační účinnost a poměrně krátká životnost kolony.²¹

1. 8 Stanovení kyseliny močové kapilární elektroforézou

Kapilární elektroforéza (CE) byla již několikrát použita ke stanovení kyseliny močové a dalších látek purinového metabolismu (xantinu, hypoxantinu).^{6,7,22}

Pro detekci kyseliny močové v CE se běžně používají fotometrické detektory pracující v UV oblasti spektra.^{21,22} Další možností je použití elektrochemických detektorů s uhlíkovou, měděnou nebo platinovou elektrodou.^{7, 22, 25, 26} V tabulce 2 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 2 – Vybrané analytické metody pro stanovení kyseliny močové v biologických vzorcích.

metoda	pufř / mobilní fáze	detekce	vzorek	LOD	lit.
enzymatické stanovení		UV – 550 nm	krev, moč	1,8 μ M	19
enzymatické stanovení		UV – 520 nm	krev	citlivost 4,16 μ M	20
voltametrické stanovení	0,1 M fosfátový pufř, pH = 7,2	fullerem C ₆₀ upravená elektroda z leštěného C	moč	0,12 μ M	27
injekční analýza	0,5 M kyselina sírová	amperometrická	moč	0,40 μ M	28
HPLC	1 mM citrát sodný a acetonitril (1:1), pH = 6,5	MS	moč, sliny	0,42 μ M	29
HPLC	10 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH = 4,7	UV – 220 nm	moč	0,65 μ M	30
CE	50 mM MES/NaOH, 2 mM cetyltrimethylamonium bromid, pH = 7	amperometrická	krev	0,25 μ M	7
CE	100 mM borax (H ₃ BO ₃ -Na ₂ B ₄ O ₇), pH = 8	UV – 292 nm	krev	2,97 μ M	21
CE	50 mM glycinyglycin sodný, pH = 8	UV – 288 nm	krev	1,50 μ M	24
CE	80 mM borax (H ₃ BO ₃ -Na ₂ B ₄ O ₇), pH = 9,2	amperometrická	krev	0,50 μ M	22
CE	80 mM borax (H ₃ BO ₃ -Na ₂ B ₄ O ₇), pH = 7,8	amperometrická	sliny	0,10 μ M	6
CE	80 mM N-tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin, pH = 8	amperometrická	moč, krev	1,19 μ M	25

Experimentální podmínky viz Příloha.

2 VÝSLEDKY A DISKUSE

2.1 Pufry

Pro stanovení kyseliny močové, askorbové a p-aminosalicylové (vnitřní standard) byly testovány dva separační pufry – 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina (CHES) / Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) a 2-morfolinethansulfonová kyselina (MES) / Tris(hydroxymethyl)aminomethan (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 přerostl únosnou mez. Výhodou použití separačního pufru o vysoké koncentraci jednotlivých složek je účinné potlačování adsorpce látek ze vzorku biologického materiálu na stěnu kapiláry.

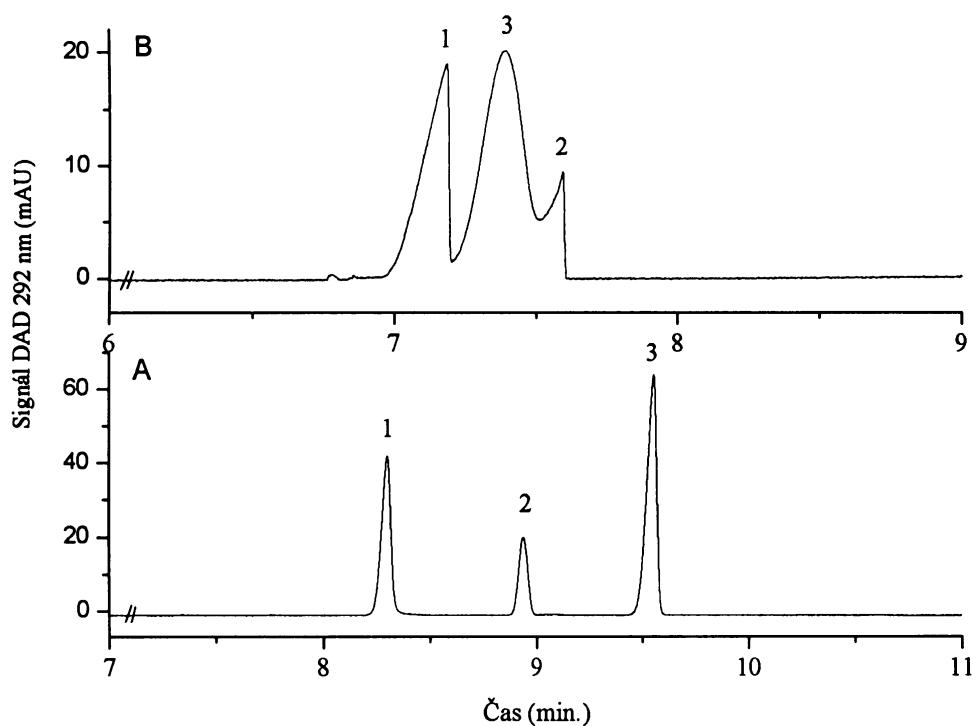
Koncentrace MES nebo CHES byla zvolena konstantní (60 mM) a optimalizována byla koncentrace Tris v rozmezí 10 – 50 mM. Optimálního složení separačního pufru bylo dosaženo s 60 mM MES + 30 mM Tris (pH = 6,1), nebo 60 mM CHES + 30 mM Tris (pH = 8,6).

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 těchto aniontů.

Při použití pufru CHES/Tris se látky od sebe úplně neoddělily, a proto byl pro další analýzy používán pufr MES/Tris. Posun migračních časů sledovaných analytů v pufrech MES/Tris (pH = 6,1) a CHES/Tris (pH = 8,6) je způsobený rozdílnými hodnotami pH těchto pufrů (obrázek 4).

Při použití pufru 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % (w/v) polybren vykazovala směs vyšší separační účinnost pro kyselinu močovou a lepší rozlišení kyseliny močové a askorbové. Při použití pufru 60 mM CHES + 30 mM Tris + 0,001 % (w/v) polybren vykazoval systém účinnost více než 10x nižší. Nižší účinnost může být způsobena vyšší elektrod disperzí analytů vedoucí k rozmývání píku kyseliny močové. Tabulka 3 ukazuje průměrné hodnoty ($n = 3$) počtu teoretických pater a rozlišení vzhledem ke kyselině močové pro CE separaci modelového vzorku v separačním pufru CHES/Tris (pH 8,6) a v separačním pufru MES/Tris (pH 6,1).

Protože mnohem lepší separace sledovaných analytů bylo dosaženo v separačním pufru 60 mM MES + 30 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.



Obrázek 4 - Elektroferogram separace kyseliny p-aminosalicylové (20 mg L^{-1}), močové (25 mg L^{-1}) a askorbové (50 mg L^{-1}). Separační pufr: A – 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 6,1); B – 60 mM CHES + 30 mM Tris + 0,001 % polybren (pH 8,6). Identifikace píků: 1 – kyselina p-aminosalicylová, 2 – kyselina askorbová, 3 – kyselina močová.

Tabulka 3 - Hodnoty počtu teoretických pater (N) a rozlišení ($r_{1/2}$) 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). N bylo vypočteno podle vzorce $N = 16 (t^2 / w^2)$ a $r_{1/2}$ podle vzorce $r_{1/2} = 2 (t_1 - t_2) / (w_1 + w_2)$, kde t je migrační čas a w je šířka píku při základně.

	N		$r_{1/2}$	
	MES/Tris	CHES/Tris	MES/Tris	CHES/Tris
kyselina p-aminosalicylová	132 000	27 100	11,1	0,77
kyselina močová	156 000	10 500	-	-
kyselina askorbová	164 600	84 600	5,6	0,83

2.2 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly naměřeny pro modelový vzorek kyseliny močové, plazmu a alantoickou tekutinu (tabulka 4). V modelovém vzorku byla provedena kalibrace metodou kalibrační přímky, ve vzorku plazmy a alantoické tekutiny 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.^{4,6,7,19-30}

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

Tabulka 4 – Parametry lineární kalibrační závislosti pro stanovení kyseliny močové v modelovém vzorku, vzorku plazmy a alantoické tekutiny kuřecích zárodků v separační pufr 60 mM MES + 30 mM Tris + 0,001% polybren (pH 6,1); v závorkách jsou uvedeny hodnoty standardních odchylek.

	modelový vzorek	plazma	alantoická tekutina
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	0,5 – 100	1 – 100	1 – 200
citlivost, mAU s L mg ⁻¹	9,00 (0,03)	8,82 (0,26)	9,23 (0,20)
úsek, mAU s	0,15 (1,59)	0,36 (0,76)	-7,84(9,57)
směrodatná odchylka, mAU s	3,11	0,39	2,95
korelační koeficient	0,999	0,999	0,999

2.3 Opakovatelnost a analytická výtěžnost CE stanovení kyseliny močové

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 (viz Příloha). Vzorek byl po přípravě okamžitě analyzován a všechna měření byla provedena v jeden den.

Hodnoty variačního koeficientu pro plochu píku a pro migrační čas jsou uvedeny v tabulce 5. Vypočtené hodnoty variačního koeficientu dokládají, že je přesnost metody vyhovující a že lze vyvinutou metodou stanovovat kyselinu močovou v biologických vzorcích.

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 Příloha). Tyto hodnoty jsou zcela vyhovující.

Tabulka 5 – Opakovatelnost CE metody pro 10 po sobě následujících stanovení vzorku 10x ředěné plazmy a vzorku 20x ředěné alantoické tekutiny. Stanovená koncentrace kyseliny močové v plazmě je $19,05 \pm 0,51 \text{ mg L}^{-1}$ a v alantoické tekutině $692,4 \pm 27,7 \text{ mg L}^{-1}$. V závorkách jsou uvedeny standardní odchylky.

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

2.3 Srovnání metod stanovení kyseliny močové

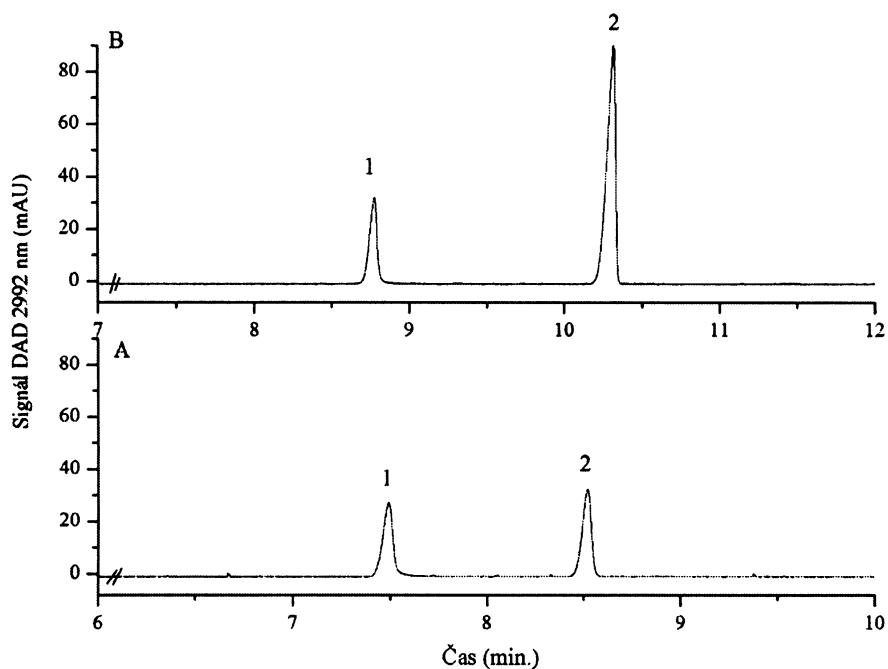
Pro stanovení kyseliny močové v biologických materiálech existuje řada metod popsaných výše. V tabulce 6 jsou shrnuty parametry těchto stanovení, které jsou srovnány s vyvinutou metodou. Předností vyvinuté metody je malé množství vzorku (1 μL), které je u ostatních metod mnohem větší. I doba CE stanovení je velice krátká. Chemikálie, které se při tomto stanovení používají, jsou na rozdíl od enzymů levnější a jejich spotřeba je nízká.

Tabulka 6 – Parametry metod stanovení kyseliny močové v biologických materiálech.

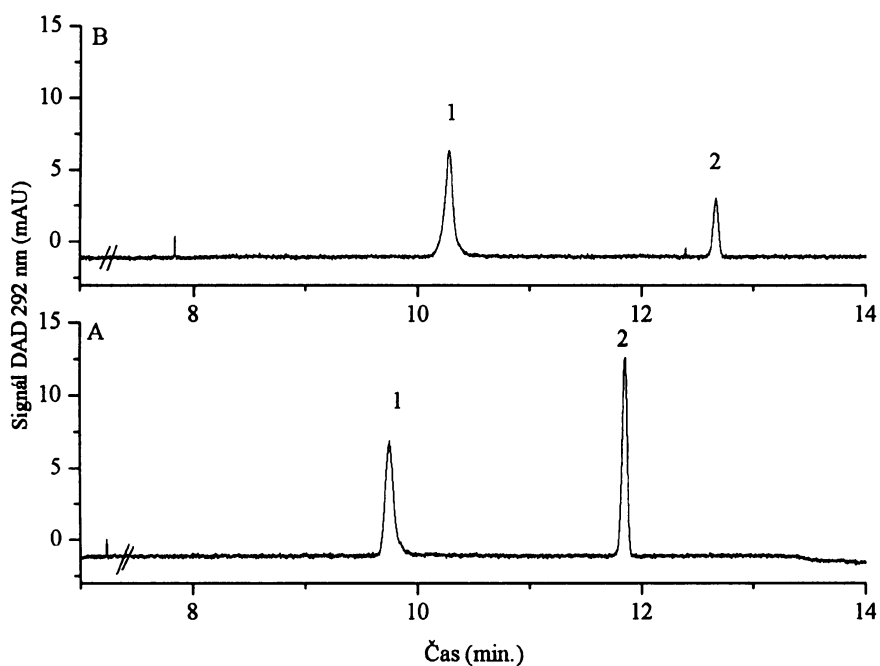
metoda	množství vzorku	doba stanovení	LOD	literatura
enzymatická	200 μL	1 hod.	4,2 μM	20
enzymatická	200 μL	15 min.	1,8 μM	19
HPLC	20 μL	15 min.	0,7 μM	30
CE	1 μL	15 min.	0,2 μM	Příloha

2.4 Stanovení kyseliny močové v kuřecí plazmě a alantoické tekutině

Vyvinutá CE metoda stanovení kyseliny močové byla použita pro stanovení kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích embryí (stáří 10 – 14 dní). Obrázek 5 ukazuje elektroferogram CE separace v alantoické tekutině kuřecích zárodků s nízkou a vysokou koncentrací. Na obrázku 6 je vidět elektroferogram stanovení kyseliny močové v plazmě kuřecích zárodků. Odezva UV detektoru byla zaznamenávána při 292 nm.



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



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

V tabulce 7 a 8 jsou uvedeny rozmezí, průměr a odchylky hodnot koncentrace kyseliny močové v plazmě a alantoické tekutině kuřecích zárodků o stáří 10 a 14 dnů. Vzorky byly rozdělené do dvou skupin: embrya s vyvolanou agenezí ledviny a kontrolní skupina (viz Příloha).

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.

Statistické vyhodnocení ukázalo, že průměrná hodnota koncentrace kyseliny močové v plazmě u skupiny embryí s agenezí ledviny je dvakrát vyšší než u kontrolní skupiny ve stáří 10 i 14 dní a tento rozdíl je na hladině významnosti 0,05 statisticky významný. Hodnoty koncentrace kyseliny močové u skupiny zárodků s agenezí ledviny jsou u 14ti denních embryí o třetinu vyšší než u 10ti denních embryí. Znamená to, že čím je embryo starší, tím méně odstraňuje kyselinu močovou z krve. V kontrolní skupině byla koncentrace kyseliny močové v plazmě u 10ti i 14ti denních embryí téměř shodná. Tyto výsledky potvrzují nedostatečnost jedné embryonální ledviny účinně odstraňovat kyselinu močovou z krve.

Koncentrace kyseliny močové v alantoické tekutině je mnohem vyšší než v plazmě. Rozdíl hladiny koncentrace kyseliny močové mezi skupinou embryí s agenezí ledviny a kontrolní skupinou není na hladině významnosti 0,05 statisticky významný ani u skupiny ve stáří 10 ani 14 dní. 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. U embryí ve stáří 10ti dnů byla koncentrace kyseliny močové nižší než u 14ti denních embryí u obou skupin. Alantoická tekutina starších embryí obsahuje stále více odpadních produktů, a proto je i koncentrace kyseliny močové vyšší.

Tabulka 7 - 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		
průměr, mg L ⁻¹	43,6 (17,1)	66,3 (43,5)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	12,3 – 82,5	14,1 – 131,5
počet embryí	14	7
kontrolní skupina, Kon		
průměr, mg L ⁻¹	22,3 (10,2)	22,8 (11,1)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	11,7 – 46,5	10,5 – 40,3
počet embryí	11	10

Tabulka 8 - 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 a 14 dní.

	stáří 10 dní	stáří 14 dní
Zárodky s agenezí ledviny		
průměr, mg L ⁻¹	808,7 (313,4)	1502,3 (566,3)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	143,4 – 1208,5	835,4 – 2131,6
počet embryí	14	7
kontrolní skupina, Kon		
průměr, mg L ⁻¹	939,8 (278,9)	1391,9 (436,2)
koncentrační rozmezí, mg L ⁻¹	542,4 – 1397,8	977,7 – 2061,8
počet embryí	10	10

3 ZÁVĚR

Při CE stanovení kyseliny močové v biologických vzorcích se osvědčil separační pufr MES/Tris. 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. Dosažený limit detekce pro kyselinu močovou $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ je dostatečně nízký pro použití vypracované metody při analýzách reálných klinických vzorků.

Tato metoda vyžaduje pouze minimální úpravu vzorku. Vzorek se pouze naředit a byl připraven rovnou k analýze. Celková doba CE analýza kyseliny močové trvá pouze 15 minut.

Pomocí této metody je možné stanovovat hladinu kyseliny močové ve velmi malém množství vzorku. Analýzy byly prováděné v $1 \mu\text{L}$ plazmy kuřecích zárodků. V tomto případě stanovení kyseliny močové je vzorku plazmy kuřecích zárodků velice malé množství, které by nestačilo pro analýzu metodou HPLC nebo pro stanovení enzymatickými metodami.

Metoda byla použita pro CE stanovení kyseliny močové u časných kuřecích zárodků ve stáří 10 a 14 dnů v jejich plazmě a alantoické tekutině. Kuřecí zárodky byly rozděleny do dvou 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.

4 LITERATURA

1. Voet, D., Voetová J. G.: *Biochemie*, 1995, Victoria Publishing
2. Devlin, T. M.: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 1992, Wiley-Liss, New York
3. Šebesta, I.: *Poruchy metabolismu purinů*, Ústav klinické a biochemie VFN a 1.LF UK Praha, <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text8.htm> - červen 2008
4. Wright, P. A.: *J. Exp. Biol.*, 1995, 198, 273 – 281
5. Thasar, E., Arad, Z., Izhaki, I., Guglielmo, Ch. G.: *J. Comp. Physiol. B*, 2006, 176, 653 – 661
6. Guan, Y., Chu, Q., Ye, J.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 380, 913 – 917
7. Boughton, J. L., Robinson, B. W., Strein, G. T.: *Electrophoresis*, 2002, 23, 3705 – 3710
8. Luo, Y-Ch., Do, J-S., Liu Ch.: *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22, 482 – 488
9. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova biochemie*; 2002, vydavatelství H + H
10. Hediger, M. A., Johnson, J. R., Miyazaki, H., Endou, H.: *Physiol.*, 2005, 20, 125 – 133
11. Simoyi, M. F., Van Dyke, K., Klandorf H.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002; 282, 791 – 796
12. Kodíček, M.: *Biochemické pojmy*, 2004, Vydavatelství VŠCHT Praha
13. Sládeček, F.: *Rozmnožování a vývoj živočichů*, 1986, Academia Praha
14. Laurin, M.: <http://www.tolweb.org/Amniota/14990> - červen 2008
15. Romanoff, A. L.: *The Avian Embryo – Structural and functional development*, 1960, The Maxmilian Company, New York
16. Romanoff, A. L.: *Biochemistry of the Avian Embryo*, 1960, Interscience Publishers a division of John Wiley and Sons, New York, London, Sydney
17. Duncan, P. H., Gochman, N., Cooper, T., Smith, E., Bayse, D.: *Clin. Chem.*, 1982, 28, 284 – 290
18. Pérez-Bendito, D., Gómez-Hens, A., Gutiérrez, M. C., Antón, S.: *Clin. Chem.*, 1989, 35, 230 – 233

19. BioLAtest, Kyselina močová liquid 500 (UA L 500), PLIVA-Lachema Diagnostika s. r. o., Brno, červenec 2008,
<http://www.lachema.com/file.php/331/UA%20L%20500-CZ.pdf>
20. Dialab spol. s r. o., Kyselina močová, Praha 5, červenec 2008,
<http://www.dialab.cz/bio/fotom/fotometrie/navody/kmTHBHAD95459.pdf>
21. Zinellu, A., Carru, C., Sotgia, S., Deiana, L.: *Anal. Biochem.*, 2004, 330, 298 – 305
22. Guan, Y., Wu, T., Ye, J.: *J. Chromatogr. B*, 2005, 821, 229 – 234
23. Chen, M. L., Liu, T. Z., Lu, F. J., Chiu, D. T.: *Clin. Biochem.*, 1999, 32, 473 – 476
24. Zinellu, A., Sotgia, S., Caddeo, S., Deiana, L., Carru, C.: *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 2193 – 2199
25. Xu, D. K., Hua, L., Li, Z. M., Chen, H. Y.: *J. Chromatogr. B*, 1997, 694, 461 – 466
26. Fanguy, J. C., Henry, Ch. S.: *Electrophoresis*, 2002, 23, 767 – 773
27. Goyal, R. N., Gupta, V. K., Sangal, A., Bachheti, N.: *Electroanalysis*, 2005, 17, 2217 – 2223
28. Silva, M. L. S., Garcia M. B. Q., Lima, J. L. F. C., Santos, J. L. M., Barrado, E.: *Electroanalysis*, 2005, 17, 2156 – 2162
29. Perreló, J., Sanchis, P., Grases, F.: *J. Chromatogr. B*, 2005, 824, 175 – 180
30. George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K., Ramgaokar, J. S.: *J. Chromatogr. B*, 2006, 832, 134 – 137
31. Samcová, E., Tůma, P.: *Electroanalysis*, 2006, 18, 152 – 157

5 PŘÍLOHA

J. Sep. Sci., 2007, 30, 1947 - 1952

Determination of Uric Acid in Plasma and Allantoic Fluid of Chicken Embryos by Capillary Electrophoresis

Jana Matějčková, Petr Tůma, Eva Samcová, Zdeňka Zemanová

Jana Matějčková¹
 Petr Tůma²
 Eva Samcová²
 Zdeňka Zemanová³

¹Department of Analytical Chemistry, Charles University, Czech Republic

²Institute of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

³Institute of Physiology, Academy of Sciences of Czech Republic, Prague, Czech Republic

Original Paper

Determination of uric acid in plasma and allantoic fluid of chicken embryos by capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis with diode array detection (DAD) was used to determine uric acid (UA) in chicken plasma and the allantoic fluid of chicken embryos. Complete separation of uric and ascorbic acids was attained in less than 10 min in the optimized BGE containing 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1). The limit of UA detection (0.2 mg/L) was found to be low enough for sensitive analysis of native plasma and allantoic fluid samples. Range of linearity (1–200 mg/L), repeatability for peak area (CV <4.1%) and migration time (CV <2.5%), as well as recovery of UA from biological samples (97–100%), were found to be satisfactory. The method was applied to detect the elevated UA concentrations (hyperuricemia) in chicken embryos with induced unilateral renal agenesis. CE/DAD analysis of the chicken plasma can be carried out with a relatively small volume of samples (1 μ L).

Keywords: Allantoic fluid / Chicken embryo / Hyperuricemia / Plasma / Uric acid

Received: January 30, 2007; revised: February 26, 2007; accepted: February 26, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700046

1 Introduction

Uric acid (UA, Fig. 1) is the end product of catabolism of purine nucleosides adenosine and guanosine [1]. In clinical practice, UA tests are used to evaluate the elevated blood levels of uric acid to detect hypertension, vascular disease, Lesh–Nyham syndrome, or gout, as well as to assess uric acid levels in urine for kidney stone formation [2]. The urine test is most often used to monitor patients already diagnosed with kidney stones, but it can also serve to detect the metabolic disorders that affect the body's production of uric acid and to help measure kidney function [3]. Apart from the role of UA as a marker of a series of diseases, it has been shown that UA exhibits antioxidant activity and protects living organisms from reactive free radicals [4, 5]. In several groups of living animals (birds, reptiles, some amphibian species, and most insects), UA is the major end product of nitrogen metabolism including catabolism of proteins [6].

Correspondence: Dr. Eva Samcová, Institute of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic
 E-mail: eva.samcova@lf3.cuni.cz
 Fax: +420 267 102-460

Abbreviations: CE/DAD, capillary electrophoresis with diode array detection; UA, uric acid; AA, ascorbic acid; PAS, *p*-aminosalicylic acid; DAD, diode array detector

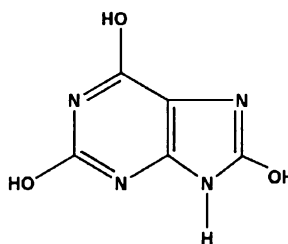


Figure 1. Molecular structure of uric acid.

Conventional methods for determination of UA in biological samples are based on the catalytic oxidation of UA to allantoin in the presence of the enzyme uricase, using colorimetry and flow injection analysis [2, 7–9]. These methods suffer from some drawbacks, such as the pronounced effect of temperature, the need for unstable and expensive reagents, and the necessity to perform the analysis with relatively large volumes of samples (100 μ L). Therefore, a number of alternative methods have been developed. Simultaneous determination of UA and related metabolites by ion chromatography and chromatography on chemically bonded phases was reported [10–12]. GC/MS has been shown to be a suitable method for determination of ¹⁵N isotopic enrichment and concentration of allantoin and UA in urine [13]. The direct and selective method for determination of UA in plasma and urine could also be based on the electro-

chemical oxidation of UA [14]. Capillary electrophoresis (CE) has turned out to be a method of choice, which offers high separation efficiency, short analysis time, low sample consumption, and requires only simple pre-treatment of biological samples. CE separation in open silica capillaries has been used for a simultaneous determination of UA and ascorbic acid (AA) [15–18]. Detection of UA in CE could be based on either UV light absorption [15–24] or the electrochemical oxidation of UA at a carbon, Cu, or Pt electrode [25–29], both attaining LOD values in the μM range. A fast electrophoretic separation of urinary UA using the micro-fluidic technique with the electrochemical detection was also reported [30].

The aim of this work was to test the CE method with the diode array detector (DAD) for monitoring of UA in chicken plasma and the allantoic fluid of chicken embryos. Measurements of UA concentration have already been used for an assessment of the capacity of embryonic kidneys to excrete UA from blood to urine. The efficiency of this process was demonstrated on the embryonic kidney, the mesonephros, already at embryonic day 6 or even at day 5 [31]. In our experimental protocol we determined the UA concentration in the plasma and urine of the chicken embryos with induced unilateral renal agenesis in order to reveal the functional capacity of remnant embryonic kidney, the mesonephros [32]. The increased concentration of UA in blood plasma of experimental embryos (hyperuricemia) indicated the insufficiency of the single kidney to clear blood from nitrogen wastes properly. We shall show that CE/DAD can be used for a detection of UA in a very small volume of the plasma sample (1 μL).

2 Experimental

2.1 Instrumentation for CE

CE measurements were carried out using an HP^{3D}CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a built-in DAD and controlled by the ChemStation CE software. A fused-silica capillary covered by a protective polyimide layer (77.5 cm in total length, 69.0 cm to DAD, 75 μm id \times 375 μm od, Composite Metal Services, UK) was used at a controlled temperature of 25°C. Before its first use and before changing the BGE, the capillary was conditioned by washing with 0.1 M NaOH (20 min), then with deionized water (20 min), and finally filled with BGE overnight. Between each two CE analyses of biological samples, the capillary was washed in sequence with 0.1 M NaOH (2 min), deionized water (2 min), and BGE (4 min). The introduction of sample into the capillary was performed under a pressure of 50 mbar for 20 s in all experiments. CE separation was performed in the anodic mode with applied voltage –25 kV.

2.2 Chemicals

All chemicals used were of analytical grade. Uric acid (UA), Tris, CHES, hexadimethrin bromide (polybrene), cysteine, NaOH, and acetonitrile (ACN) were purchased from Fluka; MES, ascorbic acid sodium salt, *p*-aminosalicylic acid (PAS), and EDTA were purchased from Sigma; sulfosalicylic acid and perchloric acid were purchased from Lachema (Brno, Czech Republic). Deionized Milli-Q water (Millipore, Bedford, USA) was used for preparation of BGEs and stock solutions of analytes. Stock solutions of UA (1 mg/mL) and PAS (1 mg/mL) were dissolved in water alkalized with NaOH. Stock solutions of ascorbic acid (AA) (1 mg/mL) were prepared by dissolving the substance in a solution containing 100 mM cysteine and 10 mM EDTA in order to avoid AA oxidation. Model mixtures containing AA were diluted in 10 mM cysteine and 1 mM EDTA. Stock solution of polybrene at concentration 0.1% (w/v) was used for preparation of BGEs. All BGEs and stock solutions were stored in a refrigerator at 4°C. A laboratory pH meter (pMX 3000, WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Germany) was employed to measure pH of BGEs, where polybrene was replaced with the same amount of deionized water. All BGEs and samples were filtered through 0.45- μm membrane filters (TESSEK, Czech Republic).

2.3 Sample collection

Chicken embryos from the Grey Leghorn breed (Kolec Farm, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, Czech Republic) were incubated at a temperature of $37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and a relative humidity of 55–65%. The surgery bringing about the unilateral renal agenesis was performed according to Bishop-Calame [33] by interrupting the path of the caudal migration of the mesonephric duct at age 36–42 h through a drilled window in the shell above the embryo [32]. The windows in the eggs were then covered with parafilm squares sealed to the shell at their periphery. Both operated and intact control embryos were incubated until day 12 or 14. Then the sealed windows were opened and fluids collected. The allantoic fluid was collected from the superficially exposed allantoic sac using a sharpened glass micropipette of capacity about 1 mL. Blood was collected using the fine sharpened micropipettes with the tip diameter of about 20 μm . Blood plasma was separated by centrifugation from blood cells and after reading of hematocrite it was also collected into 0.1 mL microtubes (Eppendorf). All samples of plasma and allantoic fluid were stored at -80°C .

2.4 Deproteinization of chicken plasma with acetonitrile

A 5- μL volume of the plasma sample was mixed with 10 μL of ACN in a microtube. The mixture was centri-

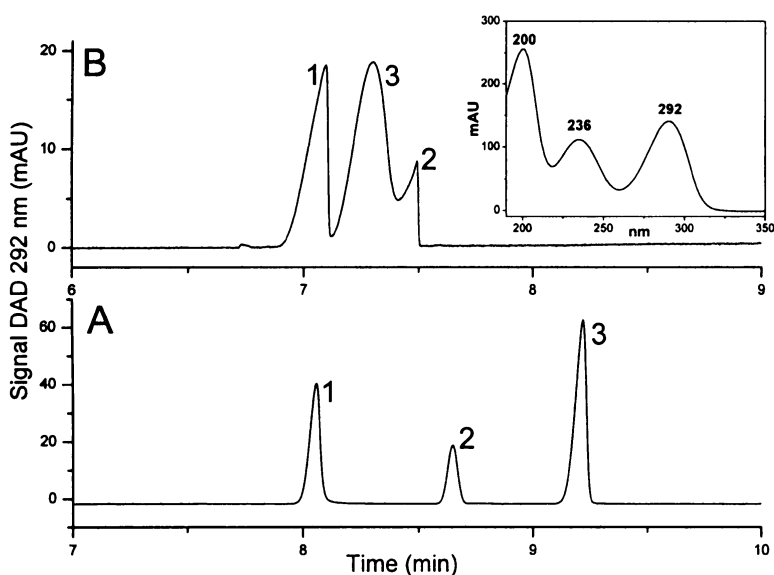


Figure 2. CE separation of model mixture of UA (25 mg/L), AA (50 mg/L), and PAS (20 mg/L). BGE: (A) 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1); (B) 60 mM CHES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 8.6). Hydrodynamic injection, 1000 mbar · s; –25 kV. Peak identification: (1) PAS; (2) AA; (3) UA. Insert: absorption spectrum of UA (25 mg/L) in BGE (A).

fused for 5 min at 4000 g, and the supernatant was injected directly into the separation capillary.

2.5 Preparation of chicken plasma and allantoinic fluid samples by dilution and alkalinization

Owing to the low solubility of UA in the water/organic solvent mixtures and acid media, the samples of the chicken plasma and allantoinic fluid were treated by alkalinization and dilution before CE analysis. Alkalinization was performed by addition of NaOH in an amount giving a final concentration of 0.01 M, which was sufficient for total dissolution of UA in biological samples. Deterioration of CE separation was observed at concentrations of NaOH higher than 0.1 M.

Chicken plasma (1 μ L) was mixed with 1 μ L of composite solution (0.1 M NaOH and 50 mg/L PAS) and diluted with 8 μ L of water. Sample was prepared in a plastic vial with insert, which was employed for sample injection in CE. The final concentration of NaOH in the sample was 0.01 M, the concentration of PAS was 5 mg/L, and the plasma was 10-times diluted.

Allantoinic fluid (50 μ L) was mixed with 50 μ L of 0.2 M NaOH; after that 20 μ L of PAS (1 mg/mL) and 880 μ L of water were added. This mixture was injected directly into the capillary. The final concentration of NaOH in the sample was 0.01 M, the concentration of PAS was 20 mg/L, and allantoinic fluid was 20-times diluted.

3 Results

3.1 CE determination of UA in a model mixture

Figure 2 shows the CE separation of UA in a model mixture of UA, AA, and PAS with either MES/Tris or CHES/

Tris as a separation electrolyte. Unlike inorganic ions of the phosphate, borate, trycine, or glycylglycine buffers, which have been previously used for the CE determination of UA in the human plasma and urine [15–24], the MES/Tris or CHES/Tris buffer ions exhibit a low mobility and can be used in high concentrations without generating significant currents. Actually, higher concentrations of the buffer components could suppress the effect of adsorption of proteins from the biological samples on the silica capillary walls. In order to optimize the composition of employed BGEs, the concentration of Tris was varied in the range 10–50 mM, while the concentration of MES or CHES was kept constant (60 mM). AA is a common component of the clinical samples, and PAS was used as an internal standard. Polybrene added to the BGE is a cationic surfactant. Its adsorption on the silica capillary walls can reverse the electroosmotic flow (EOF), which then has the same direction as the migration of anions. As a result, the migration time of the anionic species including UA, AA, and PAS can be reduced.

Of the studied BGEs, the 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1) mixture yielded a considerably better separation efficiency of $(1.58 \pm 0.13) \times 10^5$ theoretical plates, and a resolution of UA and AA of 5.60 ± 0.38 . In the CHES/Tris system, the separation efficiency is more than 10 times lower, and the resolution of UA and AA is only 0.94 ± 0.02 . Lower efficiency can be ascribed to a higher electrodispersion of analytes leading to a broadening of the UA peak (Fig. 2, panel B). The effect could be also responsible for the skewed shape of the PAS and AA peaks. On the other hand, the difference in pH between the MES/Tris (pH 6.1) and CHES/Tris (pH 8.6) buffer is responsible for changes of the mobility of tested weak acids.

Table 1. Parameters of the linear calibration curve for a CE/DAD determination of UA in a model mixture and samples of chicken plasma and allantoinic fluid. All concentrations were measured in triplicate; standard deviations are given in parentheses. The standard addition method was used for evaluating the peak areas in samples of plasma and allantoinic fluid.

Parameter	Model mixture	Plasma	Allantoinic fluid
Concentration range tested (mg/L)	0.5–100	1–100	1–200
Slope (sensitivity) (mAU · s · L · mg ⁻¹)	9.00 (0.03)	8.82 (0.26)	9.23 (0.20)
Intercept (mAU · s)	0.15 (1.59)	0.36 (0.76)	-7.84 (9.57)
Standard error (mAU · s)	3.11	0.39	2.95
Correlation coefficient	0.9999	0.9991	0.9995
LOD (mg/L)	0.2	0.2	0.2
LOD (μM)	1.2	1.2	1.2

The parameters of the linear calibration curve for a CE/DAD determination of UA in the model mixture in 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1) are summarized in Table 1. Peak areas for UA were evaluated at a wavelength of 292 nm (cf. the absorption spectrum of UA shown in the insert of Fig. 2). The given parameters were obtained by evaluating the peak areas for all the concentrations being measured in triplicate. The LOD was estimated from the peak height corresponding to three times the detector noise. The attained LOD value of 0.2 mg/L (1.2 μM) is in good agreement with that reported for optical or electrochemical detectors [15–29].

3.2 CE determination of UA in chicken plasma treated with ACN

Acetonitrile (ACN) has often been added to the plasma samples for the purpose of deproteinization and with the aim of eliminating the irreversible adsorption of proteins on the silica capillary walls. Therefore, the plasma samples treated with ACN were analyzed first using the optimized BGE of composition 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1). Figure 3 shows the electropherograms of chicken plasma mixed with ACN, which were measured immediately after sample preparation (panel A), after 12 min from the sample preparation (panel B), and after 24 min from the sample preparation (panel C). Apparently, the measurable UA concentration in the sample decreases with time and, after 12 or 24 min, only 56 or 16%, respectively, of the initial UA amount is detected. Addition of ACN seems to gradually bring UA back out of solution by converting it into its insoluble neutral form. Deproteinization of the plasma sample by a strong acid (HClO₄, sulfosalicylic acid) had a similar effect. Therefore, we had to rely on suppression of the protein adsorption effect by relatively high concentrations of the buffer components and by extended washing of the capillary after the analysis.

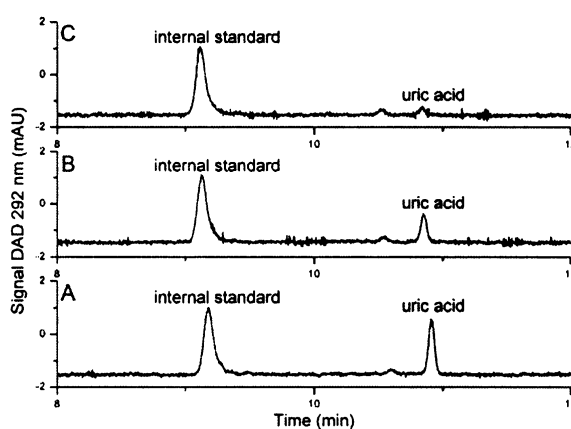


Figure 3. Electropherograms of the chicken plasma mixed with ACN: (A) immediately after the sample preparation; (B) after 12 min from the sample preparation; (C) after 24 min from the sample preparation. BGE: 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1); hydrodynamic injection, 1000 mbar · s; -25 kV.

3.3 Linearity, repeatability, and recovery of the CE method

Table 1 summarizes the parameters of the linear calibration curves for the CE/DAD determinations of UA in the chicken plasma and allantoinic fluid, as measured by the standard addition method and by evaluating the peak areas. The attained sensitivity (slope) and LOD are practically the same for the plasma, allantoinic fluid, and model mixture. The repeatability of the CE/DAD method was examined by repeated treatment and immediate CE analysis of the selected sample on the same day. Low values of the coefficients of variation (CV) of the peak area and the migration time for both the plasma and the allantoinic fluid (Table 2) indicate that the accuracy of the CE/DAD method for the determination of UA is satisfactory. Somewhat slower migration of UA in plasma could be due to the more pronounced effect of protein adsorption on the capillary walls, leading to a lower EOF. Finally, the

Table 2. Repeatability of the CE determination of UA in the chicken plasma and the allantoic fluid of the chicken embryos with the estimated mean concentration of UA in plasma (19.05 ± 0.51 mg/L) and allantoic fluid (684.4 ± 27.7) mg/L. Standard deviations are given in parentheses.

Parameter	Plasma	Allantoic fluid
Mean peak area, (mAU · s)	17.29 (0.46)	308.12 (12.48)
CV (%)	2.64	4.05
Mean migration time (min)	11.50 (0.28)	10.92 (0.13)
CV (%)	2.43	1.19
Number of repeats	7	6

standard addition method was used to examine the recovery of the CE/DAD determination of UA in both the plasma and allantoic fluid by evaluating the peak areas (Table 3). Mean values of the recovery found for the plasma and the allantoic fluid, $98.5 \pm 1.0\%$ and $100.8 \pm 0.6\%$, respectively, are quite acceptable.

3.4 Detection of hyperuricemia in chicken plasma and allantoic fluid

The CE/DAD method was used to detect UA in the chicken embryos (embryonic day 12–14). Figure 4 shows the electropherograms of the chicken plasma and the allantoic fluid with a low (panels A and C) and high (panels B and D) level of UA. The optical detection at 292 nm reveals the dominant peak of UA, which can be easily identified by UV absorption spectroscopy. The peak of AA is not pronounced, because the detection of AA would require addition of an antioxidant agent to the collected sample to prevent the oxidation of AA by atmospheric oxygen. Table 4 compares the range, mean, and variance of the UA concentrations in plasma and the allantoic fluid of the chicken embryos with and without induced unilateral renal agenesis. Determined concentrations were statistically processed by ANOVA and *t*-test at the significance level of 0.05 using Origin software (Origin 6.1, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Statistical

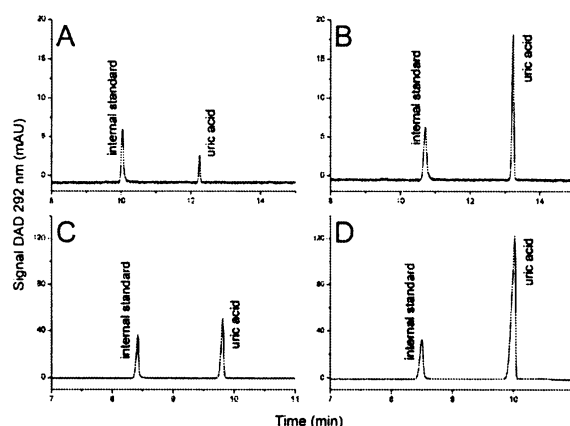


Figure 4. Electropherograms of the chicken plasma and allantoic fluid with a low and high UA level (in parentheses): (A) plasma (16.0 mg/L); (B) plasma (81.8 mg/L); (C) allantoic fluid (374.8 mg/L); (D) allantoic fluid (1064.6 mg/L). Hydrodynamic injection, 1000 mbar · s; –25 kV.

Table 4. Range, mean and standard deviation (in parentheses) of the UA concentrations determined by the CE/DAD method in plasma and the allantoic fluid of the chicken embryos (embryonic day between 12 and 14) with and without (control group) induced unilateral renal agenesis.

	Plasma	Allantoic fluid
<i>Chicken embryos with unilateral renal agenesis</i>		
Mean concentration (mg/L)	45.4 (16.8)	854.7 (209.1)
Concentration range (mg/L)	25.9–81.8	491.9–1164.6
Number of embryos	9	9
<i>Control group</i>		
Mean concentration (mg/L)	19.7 (6.5)	929.4 (262.0)
Concentration range (mg/L)	11.8–30.6	536.2–1383.2
Number of embryos	9	9

evaluation shows that the mean UA plasma concentration in the group of the chicken embryos with the agenesis is 2.3 times higher than in the control group, and that this difference is statistically significant. Typically, the UA levels in the allantoic fluid in both groups are about

Table 3. Recovery of UA from plasma and allantoic fluid samples by the standard addition method evaluating the CE/DAD peak areas. Standard deviations are given in parentheses.

Plasma			Allantoic fluid		
Added (mg/L)	Measured (mg/L)	Recovered (%)	Added (mg/L)	Measured (mg/L)	Recovered (%)
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
Mean (%)		98.5 (1.0)			100.8 (0.6)

10–100 times higher than those in plasma, but the differences in the UA concentration between the two groups are statistically insignificant.

4 Concluding remarks

The volume of plasma collected from a single chicken embryo amounts to approximately 10 μ L. Such small volumes cannot be analyzed using the standard enzymatic or chromatographic methods available in clinical laboratories. On the other hand, the volume of the sample injected into a CE capillary can be of the order of units to tens of nL, and the CE analysis can be performed with plasma samples as small as 1 μ L. Complete separation of UA and AA can be attained in less than 10 min in the optimized BGE containing 60 mM MES + 30 mM Tris + 0.001% (w/v) polybrene (pH 6.1). The limit of detection of UA (0.2 mg/L) is low enough for reliable monitoring of UA and for detection of the elevated UA levels (hyperuricemia) in plasma and allantoic fluid samples. Linearity, repeatability, and accuracy/recovery of the method are quite acceptable. Since the MES/Tris or CHES/Tris buffer ions exhibit a low mobility, they can be used in high concentrations without generating significant currents, with the advantage of improved protection of the silica capillary walls from the adsorption of the plasma proteins. The CE determinations of the UA concentration in plasma and the allantoic fluid of the chicken embryos with and without the induced unilateral renal agenesis confirm the insufficiency of the single kidney to efficiently clear the blood plasma from UA.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grants No. 203/07/0896 and 304/04/0972), and by the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic, Research Project No. MSM0021620814.

5 References

- [1] Devlin, T. M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley-Liss, New York 1992, pp. 544–547.
- [2] McClatchey, K. D., *Clinical Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, Baltimore 1994, pp. 371–385.
- [3] Huck, C. W., Bakry, R., Bonn, G. K., *Electrophoresis* 2006, 27, 111–125.
- [4] Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78, 6858–6862.
- [5] Davies, K. J., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F., Hochstein, P., *Biochem. J.* 1986, 235, 747–754.
- [6] Wright, P. A., *J. Exp. Biol.* 1995, 198, 273–281.
- [7] Duncan, P. H., Gochman, N., Cooper, T., Smith, E., Bayse, D., *Clin. Chem.* 1982, 28, 284–290.
- [8] Pérez-Bendito, D., Gómez-Hens, A., Gutiérrez, M. C., Antón, S., *Clin. Chem.* 1989, 35, 230–233.
- [9] Hasebe, Y., Nawa, K., Ujita, S., Uchiyama, S., *Analyst* 1998, 123, 1775–1780.
- [10] Hatch, L. L., Sevanian, A., *Anal. Biochem.* 1984, 138, 324–328.
- [11] Chen, Y. M., Pietrzyk, R. A., Whitson, P. A., *J. Chromatogr. A* 1997, 763, 187–192.
- [12] Pachla, L. A., Kissinger, P. T., *Clin. Chem.* 1979, 25, 1847–1852.
- [13] Ellerbe, P., Cohen, A., Welch, M. J., White, E., *Anal. Chem.* 1990, 62, 2173–2177.
- [14] Popa, E., Kubota, Y., Tryk, D. A., Fujishima, A., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1724–1727.
- [15] Cheng, M. L., Liu, T. Z., Lu, F. J., Chiu, D. T., *Clin. Biochem.* 1999, 32, 473–476.
- [16] Krouwer, J. S., Monti, K. L., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995, 33, 525–527.
- [17] Zinellu, A., Sotgia, S., Caddeo, S., Deiana, L., Carru, C., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 2193–2199.
- [18] Zinellu, A., Carru, C., Sotgia, S., Deiana, L., *Anal. Biochem.* 2004, 330, 298–305.
- [19] Jia, L., Chen, X., Wang, X., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 1999, 22, 2433–2442.
- [20] Fujii, T., Kawabe, S., Horike, T., Takushi, H., Taguchi, T., Ogata, M., *J. Chromatogr. B* 1999, 730, 41–47.
- [21] Petucci, C. J., Kantes, H. L., Strein, T. G., Veening, H., *J. Chromatogr. B* 1995, 668, 241–251.
- [22] Kong, Y., Zheng, N., Zhang, Z., Gao, R., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 477–483.
- [23] Grune, T., Ross, G., Schmidt, H., Siems, W., Perrett, D., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 105–111.
- [24] Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 425–428.
- [25] Hong, J., Baldwin, R. P., *J. Capil. Electrophor.* 1997, 4, 65–71.
- [26] Xu, D. K., Hua, L., Li, Z. M., Chen, H. Y., *J. Chromatogr. B* 1997, 694, 461–466.
- [27] Chen, G., Chu, Q. C., Zhang, L. Y., Ye, J. N., *Anal. Chim. Acta* 2002, 457, 225–233.
- [28] Boughton, J. L., Robinson, B. W., Strein, T. G., *Electrophoresis* 2002, 23, 3705–3710.
- [29] Guan, Y. Q., Wu, T., Ye, J. N., *J. Chromatogr. B* 2005, 821, 229–234.
- [30] Fanguy, J. C., Henry, C. S., *Electrophoresis* 2002, 23, 767–773.
- [31] Fisher, J. R., Eakin, R. E., *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1957, 5, 215–224.
- [32] Zemanová, Z., Murphy, M. J., in: Yahav, S., Tzschentke, B. (Eds.), *New Insights into Fundamental Physiology and Peri-natal Adaptation of Domestic Fowl*, Nottingham University Press, Nottingham 2006, pp. 141–150.
- [33] Bishop-Calame, S., *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 1966, 55, 215–309.