

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

VÝVOJ A OPTIMALIZACE NOVÉ CHROMATOGRAFICKÉ
METODY PRO STANOVENÍ RETINOLU V MOČI

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

ZUZANA MIKANOVÁ

Prohlášení

„ Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2018

Zuzana Mikanová

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, připomínky, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala při psaní mé diplomové práce. Mé poděkování patří i Mgr. Kateřině Kučerové za ochotu, pomoc, trpělivost a spolupráci při získávání údajů pro experimentální část. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Zuzana Mikanová

Školitel: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a optimalizace nové chromatografické metody pro stanovení retinolu v moči

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody pro stanovení retinolu a kreatininu v moči pomocí ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie. Cílem bylo vytvořit optimální chromatografické podmínky pro klinický výzkum.

Experimenty byly prováděny na přístroji UHPLC Nexera, (Shimadzu, Japonsko) s hmotnostním spektrometrem LCMS-8030 (Shimadzu, Japonsko). Byly testovány 3 stacionární fáze. K separaci byla použita kolona Kinetex 2,6 μm PFP 100A 100x4,6 mm (Phenomenex, USA). Mobilní fáze byla připravena z acetonitrilu (s přidavkem kyseliny mravenčí 0,005 M) a octanu amonného (pH 6,69) v poměru 78:22. Teplota byla nastavena na 25°C, průtok na 0,5 ml/min a nástřík zvolen 3 μl . Po optimalizaci separačních podmínek byla metoda aplikována na moč, pro kterou byly testovány některé jednoduché úpravy vzorku. Metoda byla částečně validována.

Na metodě se dále pracuje a v budoucnu by měla být přínosná v oblasti stanovení renálního poškození v klinickém výzkumu i praxi. Zařazení kreatininu pro korekci a zároveň společné stanovení je velice výhodné. Zároveň nedochází k zátěži pacienta, jelikož stanovení probíhá z moči.

Klíčová slova: kreatinin, retinol, UHPLC-MS, moč, renální poškození

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Zuzana Mikanová

Supervisor: assoc. prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Title of the Diploma Thesis: Development and optimization of new chromatographic method for determination of retinol in human urine

This diploma thesis is based on the method development for determination of retinol and creatinine using HPLC. The aim of this project was to find optimal HPLC-MS/MS conditions for clinical research.

Experiment was carried out using UHPLC set Nexera with mass spectrometer LCMS-8030, (Shimadzu, Japan). Three stationary phases were tested. The chromatographic separation was achieved using a Kinetex 2.6 μm PFP 100A 100x4.6 mm (Phenomenex, USA). The used mobile phase consisted of acetonitrile (with addition of formic acid 0.005 M) and ammonium acetate (pH 6.69) in the ratio 78:22 (v/v). The temperature was maintained at 25°C, flow rate was set at 0.5 ml/min and 3 μl of sample was injected. After optimization of separation conditions, the method was applied to urine samples, and simple sample preparation procedures were tested

In these days is the work on method finishing and the new method will be used for determination of renal damage in clinical research and practice. The inclusion of creatinine for urine dilution correction is very beneficial mainly in combination with noninvasive determination in urine.

Keywords: creatinine, retinol, UHPLC-MS, urine, renal damage

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE.....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Retinol	12
2.2 Charakteristika a metabolismus.....	12
2.2.1 RBP	13
2.2.2 Retinol v moči.....	14
2.2.3 Megalin.....	15
2.2.4 Vylučování retinolu	15
2.3 Kreatinin.....	17
2.3.1 Charakteristika a metabolismus.....	17
2.3.2 Clearance endogenního kreatininu	18
2.3.3 Jaffého metoda – fotometrická.....	18
2.3.4 Sérový kreatinin	18
2.3.5 Prognostický význam převrácené hodnoty sérového kreatininu.....	19
2.3.6 Stanovení kreatininu v moči.....	19
2.4 Kapalinová chromatografie.....	20
2.4.1 HPLC	20
2.4.2 Současné trendy v kapalinové chromatografi.....	21
2.4.3 UHPLC.....	22
2.4.4 Kolony.....	23
2.4.5 Stacionární fáze použité v diplomové práci	24
2.4.6 Předkolony	26
2.4.7 Detektory.....	26
2.5 Hmotnostní spektrometrie	28
2.5.1 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) ..	29
2.5.2 Základní části MS.....	30
2.5.3 Ionizační techniky.....	30
2.5.4 Analyzátoři.....	33
2.5.5 Detektory.....	34
2.6 Preanalytická část laboratorního vyšetření	35
2.6.1 Odběr biologického materiálu (BM).....	35

2.6.2	Biologické vlivy	35
2.6.3	Transport materiálu	35
2.6.4	Skladování materiálu.....	35
2.6.5	Moč	35
2.7	Úprava biologického materiálu před analýzou	36
2.7.1	Deproteinace	36
2.7.2	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid–Liquid Extraction, LLE)	36
2.7.3	Extrakce na pevné fázi SPE	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1	Použité přístroje a pomůcky	39
3.1.1	Přístroje	39
3.1.2	Chromatografické kolony	40
3.2	Použité chemikálie	40
3.3	Příprava roztoků.....	40
3.3.1	Mobilní fáze.....	40
3.3.2	Zásobní roztoky standardů.....	40
3.3.3	Pracovní roztoky standardů	41
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
4.1	Optimalizace chromatografické metody.....	42
4.1.1	Detekční podmínky	42
4.1.2	Volba stacionární a složení mobilní fáze	43
4.2	Souhrn vybraných podmínek	49
4.3	Částečná validace metody	50
4.3.1	Zdánlivý počet teoretických pater.....	50
4.3.2	Výškový ekvivalent teoretického patra	50
4.3.3	Faktor symetrie	50
4.3.4	Rozlišení.....	51
4.3.5	Detekční limit	51
4.3.6	Kvantitativní limit	51
4.3.7	Opakovatelnost nástřiků	52
4.4	Úprava biologického materiálu	53
5	ZÁVĚR	56
6	SEZNAM LITERATURY	57

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
AMAC	Octan amonný
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BM	Biologický materiál
DL	Desolvation Line
ESI	Ionizace elektrosprejem
FA	Kyselina mravenčí
GFR	Glomerulární filtrace (Glomerular Filtration Rate)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LLE	Extrakce do kapaliny (Liquid-Liquid Extraction)
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze

Mr	Relativní molekulová hmotnost
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Hmotnostní spektrometrie
m/z	Poměr hmotnost/náboj
NAG	N-acetylglukosamin
PFP	Pentafluorophenyl
Q	Kvadrupól
QqQ	Trojité kvadrupól
Q1	První kvadrupól
q2	Druhý kvadrupól
Q3	Třetí kvadrupól
RBP	Retinol binding protein
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatoraphy)
UV	Ultrafialové spektrum (Ultra-Violet)

ÚVOD

Renální poškození často doprovází nejrůznější onemocnění jako je například diabetes mellitus či rakovina. V současné době je velmi často využíván jako biomarker renální dysfunkce kreatinin, který se vytváří ve svalech a filtruje se v glomerulech ledvin. Pokud ledviny fungují správně, v moči v zásadě nejsou žádné nízkomolekulární proteiny (<40 kDa). Velká část těchto proteinů je reabsorbována proximálními tubuly a jen nepatrná část projde do finální moči. Proto mohou být některé tyto proteiny využity k hodnocení renální dysfunkce. Mezi tyto proteiny se řadí i RBP (retinol binding protein). U zdravých osob se retinol v moči nenachází. Patologické změny vznikající v důsledku onemocnění ledvin, které jsou spojeny s poškozením proximálních tubulů, mají za následek vylučování retinolu do moči. Vylučování retinolu do moči by proto mohlo být jedním z parametrů poškození ledvin.

V klinických studiích, které jsou většinou několik let staré, se nacházejí metody, které stanovují retinol. Většinou jsou ale nevhodné, nejčastěji z analytického hlediska (například velké množství toxických a pro životní prostředí nevhodných rozpouštědel) či pro stanovení v jiné biologické matrici. V současné době neexistuje žádná metoda, která by umožnila stanovení retinolu v moči společně s kreatininem.

Moderní analytické separační metody, zejména ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem, nabízí řadu výhod jako je rychlost, citlivost a možnost stanovovat velké série vzorků.

1 ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo nalezení optimálních chromatografických podmínek pro separaci kreatininu a retinolu s využitím ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí s ohledem na využití metody pro klinický výzkum a praxi.

Dalším cílem byla částečná validace metody.

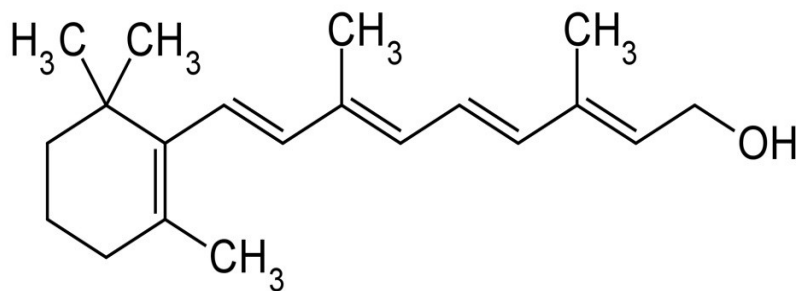
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Retinol

2.2 Charakteristika a metabolismus [1] [2]

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární sloučeniny, které jsou nezbytné pro správnou funkci organismu. Až na výjimky musí být do těla dodávány. Dělíme je obecně na vitaminy rozpustné v tucích a na rozpustné ve vodě. Vitamin A se řadí mezi vitamíny rozpustné v tucích, prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v etanolu a mísitelné s organickými rozpouštědly. Estery vitaminu A jsou velmi citlivé na působení vzduchu, oxidačních látek, kyselin, světla a tepla. V UV světle při 365 nm vykazují retinoidy intenzivní zelenou fluorescenci.

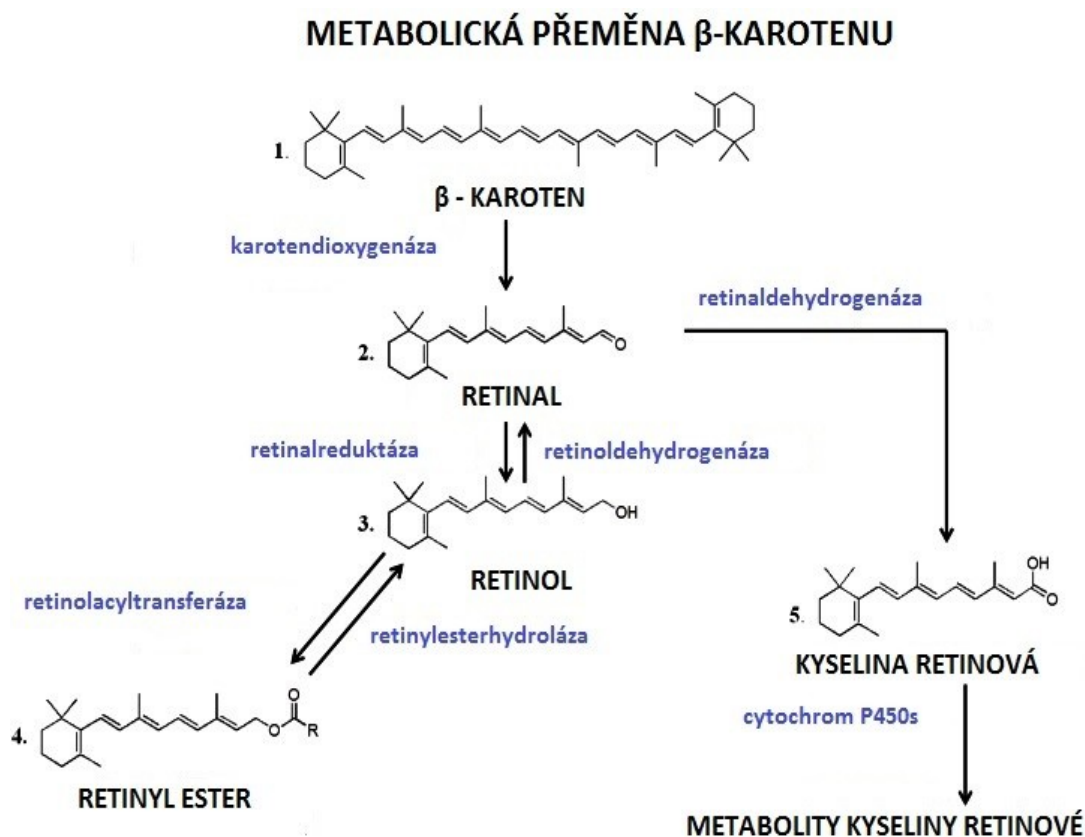
Jako vitamin A nebo retinoidy jsou označovány látky, které vykazují příslušnou metabolickou aktivitu. Pojem vitamin A tedy zahrnuje retinol, retinal, kyselinu retinovou a retinyl estery. Retinol je nejaktivnější forma vitaminu A. Společným znakem je polyisoprenová jednotka obsahující cyklohexanové jádro. Přítomnost konjugovaného systému pěti dvojných vazeb dává možnost vzniku různých geometrických izomerů. Nejčastější je konfigurace all-trans.



Obrázek č.1: Strukturální vzorec retinolu [3]

Vitamin A se do těla dostává buď z živočišných zdrojů nebo jako provitamin (nenasycený tetraterpen o 40 uhlících se dvěma β -iononovými kruhy) zvaný β -karoten. Retinol se vyskytuje nejčastěji ve formě esterů, které jsou rozpuštěny v tucích potravy a rozptýleny do kapiček žluči. Karotendioxygenasa štěpí za přítomnosti kyslíku a žlučových solí ve sliznici střeva β -karoten a další karotenoidy na dvě molekuly retinalu, které jsou dále redukovány retinaldehydreduktasou na retinol. Ten je dále esterifikován nasycenými mastnými kyselinami a včleněn do chylomikronů v lymfě,

kteřé pak vstupují do krve. Malá část retinalu je oxidována na kyselinu retinovou. Kyselina retinová je transportována v plasmě vázaná na albumin.



Obrázek č.2: Metabolická přeměna β -karotenu [4]

Vitamin A se ukládá do zásoby v játrech ve formě esteru v lipocytech. Retinol je pro transport do tkání vázán na specifický apo-retinol vázající protein - RBP.

2.2.1 RBP

Retinol-binding protein je jediný polypeptidový řetězec s molekulovou hmotností blížkou 20 000, který silně interaguje s plazmatickým prealbuminem a běžně s ním cirkuluje v plasmě jako komplex. RBP je produkován v játrech a jeho hladiny v plasmě jsou tedy nízké při jejich poškození. Katabolizuje se převážně v ledvinách. Vysoké hladiny RBP se tedy vyskytují u pacientů s chronickým poškozením ledvin [5].

Navázáním retinolu na RBP vzniká holo-RBP, který je zpracován v Golgiho aparátu a vylučován do plasmy. V oběhu je komplex vázán na plasmový protein transtyrein. Tento protein přispívá ke stabilizaci. Receptory na povrchu buněk vychytávají holo-RBP. RBP- komplex je velice snadno filtrován skrz glomerulus a je téměř úplně reabsorbován v proximálních tubulech.

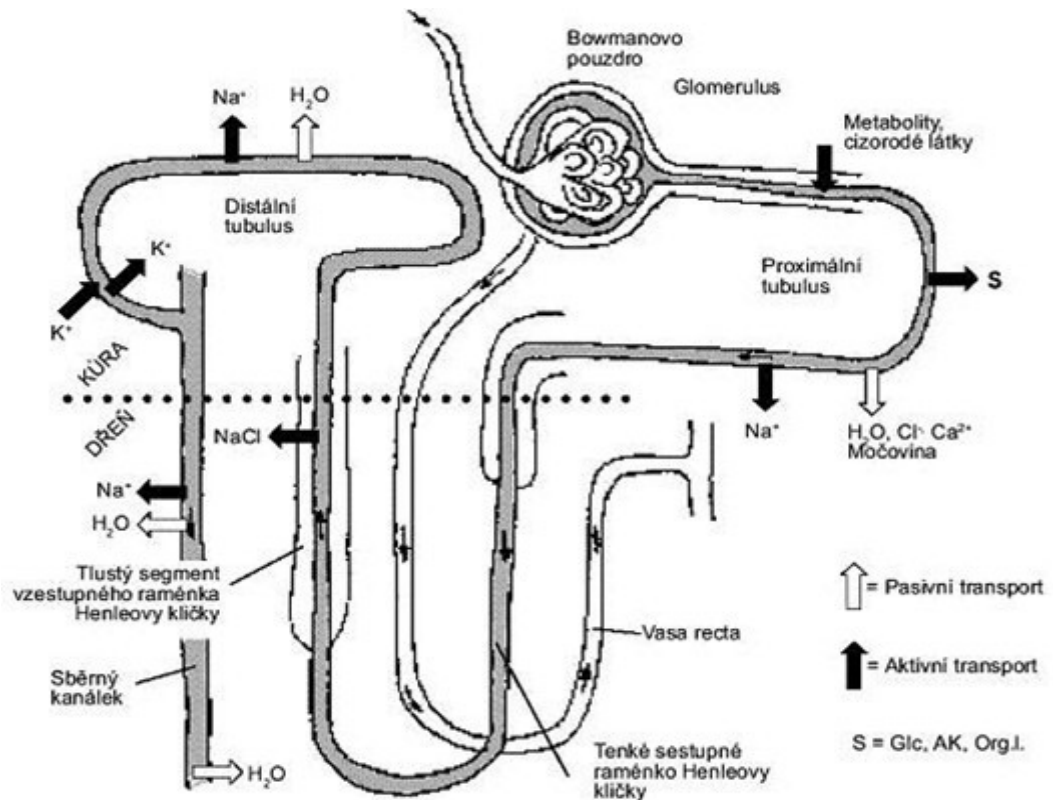
Vitamin A je vylučován močí i stolicí v různých formách. Hlavním exkrečním produktem je retinoyl-glukuronid, v menším množství i retinyl-fosfát. S rostoucím příjmem retinolu stoupá význam katabolismu v játrech. Katabolismus retinolu závisí na mikrosomálním cytochromu P450, díky kterému vznikají polární metabolity, které již mohou být vyloučeny. Metabolity s intaktním uhlíkovým řetězcem jsou vyloučeny do stolice, naopak metabolity se zkráceným řetězcem a kyselé metabolity jsou vyloučeny do moči. Poměr množství metabolitů vyloučených močí a stolicí závisí na jaterních zásobách a na příjmu vitamínu A [4].

Kyselina retinová, retinal a retinol mají své nezastupitelné biologické úkoly. Kyselina retinová podporuje růst, vývoj a diferenciaci tkání a v rozdílných tkáních působí odlišně. Retinal má naopak nezastupitelnou roli při vidění, tvoří rodopsin a jodopsin. Retinol podporuje rozmnožovací systém [6] [7].

Deficit vitamínu A je jedním z celosvětových zdravotních problémů a jednou z nejvýznamnějších, ale odstranitelných příčin slepoty. Již mírný deficit vede také ke zvýšené vnímavosti vůči infekčním chorobám. Jako odpověď na infekci je rovněž snížena syntéza RBP, v důsledku klesá koncentrace cirkulujícího vitamínu a objevují se další poruchy imunitní odpovědi [7].

2.2.2 Retinol v moči

Ledviny, zejména proximální tubuly hrají významnou roli při resorpci aminokyselin, glukózy, iontů, vody a hlavně bílkovin. Proto mohou být hladiny některých proteinů s nízkou molekulovou hmotností použity k hodnocení proximální tubulární dysfunkce. Obecně bílkoviny přecházejí přes filtrační bariéru omezeně. Komplex RBP i volný RBP snadno přechází přes glomerulus a je reabsorbován v proximálních tubulech za pomoci receptoru megalinu [8].



Obrázek č.3: Tvorba moči v nefronu [9]

2.2.3 Megalin

Megalin je receptor v proximálních tubulech, který zprostředkovává endocytózu v proximálních tubulárních epiteliálních buňkách (PTEC). Tato endocytóza je velice důležitá pro reabsorpci a metabolizaci proteinů a dalších látek, včetně vitaminů a stopových prvků vázaných na nosič, v glomerulárních filtrátech. Tento receptor také zprostředkovává renální příjem patologických látek nebo přetíženou endocytózu, která může způsobit buněčné poškození. Ztráta nebo absence tohoto receptoru může způsobit vylučování retinolu do moči [10].

2.2.4 Vylučování retinolu

Vylučování retinolu do moči způsobují patologické změny vznikající v důsledku onemocnění ledvin, které jsou spojeny s poškozením proximálních tubulů. U zdravých osob nedetekujeme žádné množství retinolu v moči. RBP je reabsorbován v proximálních tubulech. Homeostáza retinolu je narušena například u pacientů s myelomem, diabetickou nefropatií, při onemocnění jater a u akutních a závažných infekcí [4].

Studie Alfreda M. Bernarda a Adolfa A. Vyskočila se zabývá porovnáním tří markerů tubulárního poškození ledvin. Byl porovnán RBP, NAG (β -N-acetyl-o-glucosaminidase) a β_2 mikroglobulin. Díky citlivosti a stálosti v kyselé moči je dle této studie RBP nejvhodnější pro časnou detekci proximálního tubulárního poškození [11].

Během studie, zabývající se vylučováním retinolu a RBP ve vztahu k poškození ledvin u mnohočetného myelomu bylo zjištěno, že retinol je dobrým indikátorem počáteční renální dysfunkce u pacientů s mnohočetným myelomem. Někteří pacienti vykazovali zvýšené hladiny retinolu, aniž by měli zvýšenou sérovou hladinu kreatininu. Zdravé subjekty neměly v moči žádné detekovatelné množství retinolu [12].

Další studie se zabývala hladinou retinolu v moči u těhotných žen s komplikacemi i bez komplikací. Retinol byl vyšší u žen, které měly komplikace s vlivem na metabolismus. RBP v moči byl prokázán u všech skupin bez rozdílu [13].

Diabetická nefropatie, vyskytující se u pacientů s diabetem typu 2, je spojena s poškozením proximálních tubulů a následně s vyšší hladinou retinolu v moči. U pacientů s diabetem typu 2 je retinol citlivějším markerem poškození ledvin než hyperkreatinemie. Dále tato studie poukazuje na fakt, že pacienti s DM častěji trpí poškozením proximálních tubulů než glomerulů [14].

Mechanismus vylučování retinolu do moči během akutní infekce není objasněn, avšak několik studií poukazuje na jeho zvýšené množství. Studie Stephensona a kol. ukázala, že u dospělých s pneumonií a septicémií může být vylučování retinolu do moči spojeno s horečkou a postupem infekce [15].

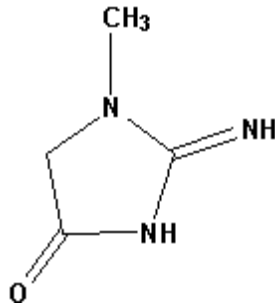
Retinol v moči byl pozorován i u dětí s průjmem způsobeným rotaviry. Studie Amal K. a kol se zabývá vylučováním retinolu u dětí s akutním vodnatým průjmem. Následná tubulární dysfunkce způsobila zvýšené vylučování retinolu [16].

Vzhledem k rostoucímu počtu drog a chemických látek v našem okolí, které jsou často nefrotoické roste tlak na vývoj spolehlivých analytických metod schopných určit renální poškození a to i v případě kdy ještě nedochází ke změnám v glomerulární filtrační rychlosti. Stanovení retinolu v moči by proto mohlo být slibným parametrem nejen v této oblasti.

2.3 Kreatinin

2.3.1 Charakteristika a metabolismus [6] [17]

Kreatinin je cyklická dusíkatá nebílkovinná organická látka s Mr 113,12. Je slabě rozpustný v etanolu, prakticky nerozpustný v acetonu, etheru a také chloroformu. Absorpční maximum kreatininu je při vlnové délce 235 nm.



Obrázek č.4: Strukturní vzorec kreatininu [18]

Kreatinin vzniká ve svalové tkáni z kreatinfosfátu ireverzibilní neenzymovou dehydratací odštěpením fosfátu. Kreatinfosfát slouží ve svalu jako zdroj energie pro svalovou kontrakci a jeho množství je úměrné množství svalové hmoty. Denní produkce kreatininu je kolem 25 mg/kg tělesné hmotnosti.

Za normálních podmínek je poměr produkce a exkrece kreatininu v rovnováze a konstantní. Exkrece probíhá ledvinami, nejčastěji glomerulární filtrací. Množství vyloučeného kreatininu závisí obecně na množství svalové hmoty, dietě a funkci ledvin. Muži mívají hodnoty kreatininu vyšší než ženy vzhledem k většímu množství svalové hmoty.

Vylučování kreatininu slouží jako obraz glomerulární filtrace ledvin. GFR je často používána jako parametr funkce ledvin, protože vzájemně souvisí s morfologickými parametry poškození ledvin.

2.3.2 Clearance endogenního kreatininu [2],[6],[19]

GFR je měřena nepřímo jako renální clearance, která je definována jako objem plazmy který je za časovou jednotku zcela očištěn od dané látky. V praxi se často používá clearance endogenního kreatininu.

$$GF = C_x [\text{ml/s}] = \frac{U_x \times V}{P_x}$$

C_x – clearance dané látky

U_x – koncentrace dané látky v moči

V – diuréza

P_x - koncentrace dané látky v plazmě

Aby se vyloučil vliv nestejně velikosti těla, přepočítá se tato hodnota na ideální povrch těla, tj. 1,73 m². Skutečný povrch těla S (m²) se odečítá z monogramu a existuje i řada vzorců.

$$GF = \left(\frac{GF}{S}\right) \times 1,73$$

Při normální funkci ledvin tedy odpovídá clearance kreatininu GFR. Avšak s pokračující renální insuficiencí klesá clearance kreatininu pomaleji než by odpovídalo skutečnému stavu GFR. Dalším důvodem, proč clearance kreatininu neodpovídá zcela GFR, je skutečnost, že nejčastěji používaná metoda stanovení – Jaffého reakce – není specifická pro kreatinin a stanovuje navíc i množství tzv. Jaffé – pozitivních chromogenů, jejichž podíl se mění v závislosti na chorobných stavech.

2.3.3 Jaffého metoda – fotometrická [2], [6], [17]

Princip této metody je založen na reakci kreatininu v alkalickém prostředí s kyselinou pikrovou, za vzniku žlutého zbarvení. Intenzita zbarvení se měří fotometricky. Normální koncentrace sérového kreatininu je pro muže mladší 50 let 74-110 μmol/l a pro ženy 58-96 μmol/l. Tato metoda není specifická, řada látek interferuje - Jaffé – pozitivní chromogeny, ketolátky, bilirubin aj.

2.3.4 Sérový kreatinin [2], [6], [19]

Sérová koncentrace kreatininu dobře koreluje s hodnotami GFR. Vztah těchto parametrů je vyjádřen nepřímou úměrou. Existuje více vzorců pro výpočet, nejčastěji používaným je podle Cockrofta a Gaulta, který bere v úvahu hmotnost a věk pacienta.

$$C_{cr} = \frac{(140 - \text{věk}) \times \text{hmotnost}}{49 \times P_{cr}}$$

C_{cr} – kalkulovaná clearance kreatininu

P_{cr} - sérová koncentrace kreatininu $\mu\text{mol/l}$

U žen se vypočtená clearance vynásobí indexem 0,85.

2.3.5 Prognostický význam převrácené hodnoty sérového kreatininu [2], [6]

Se zhoršením chronického onemocnění ledvin postupně stoupá sérový kreatinin a klesá GFR. Převrácené hodnoty sérové koncentrace kreatininu, vynesené v závislosti na čase, leží na přímce. Prodloužením této přímky lze zjistit, kdy nemocný dosáhne hodnoty kreatininu $700 \mu\text{mol/l}$, která je považována za hranici, kdy je zahájena u pacienta hemodialyzační léčba.

2.3.6 Stanovení kreatininu v moči [2], [6]

Využití:

- pro odhad glomerulární filtrace výpočtem (clearance endogenního kreatininu)
- při odhadu úplnosti sběru moči - odpad kreatininu vztažený na kg hmotnosti se pohybuje v úzkém rozmezí, pokud je odpad nižší o více než 30% jde s největší pravděpodobností o neúplný sběr
- pro standardizaci odpadu látek moči: pokud neznáme objem vyšetřované moči a 24hodinový sběr není možný, lze koncentrace látek vylučovaných močí vztáhnout na 1 mmol vyloučeného kreatininu, což eliminuje míru zředění či zakoncentrování moči

2.4 Kapalinová chromatografie

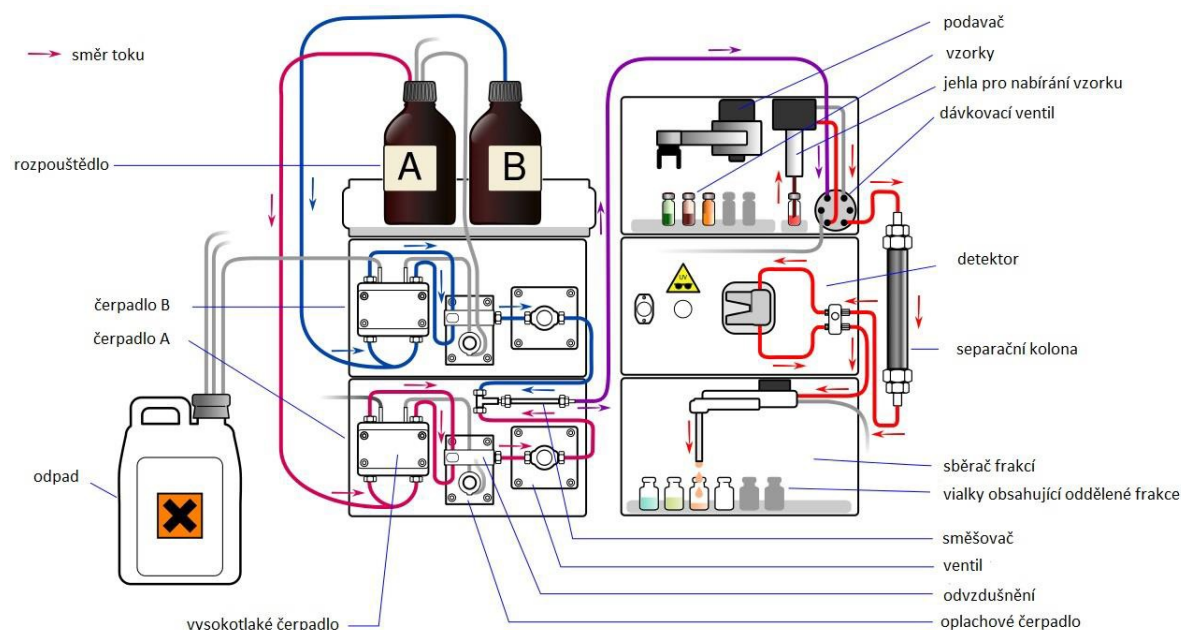
Chromatografie patří mezi separační techniky, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi 2 různými fázemi: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina. Stacionární fáze může být buď tuhá látka, nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Stacionární fáze je umístěna do chromatografické kolony ve formě sorbentu. Během chromatografického procesu dochází mnohokrát k ustavování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Mezi složkami dělené směsi, stacionární a mobilní fází nastávají interakce, kdy na základě různé afinity složek k oběma fázím dochází k jejich oddělení. Dělení látek nastává v závislosti na brzdicí síle neboli retenci, která působí selektivně. Čím se látka pevněji váže na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje. Separace a eluce jednotlivých složek směsi je ovlivněna jak povahou mobilní fáze, tak povahou stacionární fáze. V rámci kapalinové chromatografie lze zmínit dva systémy. Normální systém, ve kterém je stacionární fáze polárnější než mobilní a systém reverzní, kdy je stacionární fáze nepolární a polární rozpouštědlo tvoří mobilní fázi.

Nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). V tomto uspořádání je mobilní fáze vháněna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku [26], [27].

2.4.1 HPLC [27][28]

Tato separační technika má mnoho výhod, díky kterým se stala jednou z nejpoužívanějších separačních metod. Umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Výhodou je vysoká citlivost a selektivita v relativně krátkém čase. Pro měření stačí malé množství vzorku, výhodou je i možnost použití automatického dávkovače pro velké série vzorků a tím celou metodu plně automatizovat. HPLC záznam, neboli chromatogram je časová závislost intenzity veličiny, která je sledována detektorem a znázorňuje jednotlivé analyty nejčastěji ve formě tzv. chromatografických píků. Eluce může probíhat buď mobilní fází o konstantním složení – isokratická eluce, nebo mobilní fází o zvyšující se eluční síle při gradientové eluci, kdy je složení mobilní fáze programově měněno.

Zařízení pro HPLC se nazývá kapalinový chromatograf. Skládá se ze zásobníků mobilní fáze, odplyňovacího zařízení, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a počítače.



Obrázek č.5 Schéma kapalinového chromatografu [29]

2.4.2 Současné trendy v kapalinové chromatografii [27]

Cílem nejnovějších trendů v kapalinové chromatografii je nejčastěji co nejrychlejší analýza, při zachování nebo zlepšení její kvality z hlediska účinnosti a rozlišení, ale i citlivosti daného měření. Hlavním směrem bylo zmenšování částic chromatografického sorbentu až na velikost menší než 2 μm . Tento směr se dokázal však prosadit až po zavedení UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography). Současně se rozvíjely i technologie, které dosahují rychlejší separace jiným způsobem, a to buď pomocí zvýšené teploty (vysokoúčinná kapalinová chromatografie za zvýšené teploty), aplikace velmi vysokých průtoků mobilní fáze na porézní nečasticové stacionární fázi (využití monolitických stacionárních fází) nebo s využitím částic povrchově porézních. V neposlední řadě vysokého rozvoje dosáhla i superkritická fluidní chromatografie, kde extrakčním činidlem je tekutina v superkritickém stavu.

2.4.3 UHPLC [27] [30]

Metoda UHPLC byla odvozena od HPLC. Oproti HPLC má několik výhod a těmi jsou například kratší doba analýzy, nižší spotřeba rozpouštědel a s tím i spojené nižší náklady, vyšší separační účinnost, vyšší citlivost a více kvalitativních informací. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků, které dosahují 400-1000 bar, ale i více. UHPLC systém musí být v první řadě schopen pracovat za ultra-vysokých tlaků a musí splňovat i následující požadavky:

- robustní čerpadlo a dávkovací systém
- rychlé dávkovací cykly a přesné dávkování velmi malých objemů
- co nejmenší zpoždění gradientu
- vysoká frekvence sběru dat
- minimální mimokolonové objemy
- vhodné stacionární fáze

Čas analýzy je možné vyjádřit podle následujícího vztahu:

$$t_a = \frac{L}{u} \times (1 + k)$$

L- délka kolony

u- rychlost lineárního průtoku

k- retenční faktor posledního eluovaného píku

Z uvedeného vztahu je zřejmé, že čas analýzy je možné zkrátit použitím kratší kolony, zvýšením průtoku mobilní fáze nebo úpravou retence analytů. Zkrácení délky kolony však vede ke ztrátě rozlišení, které může být kompenzováno využitím vysoce selektivní detekce.

V UHPLC je pro zvýšení separace využíváno krátkých kolon s částicemi menšími než 2 μm . Využití takto malých částic však způsobí výrazný nárůst zpětného tlaku v systému a podle Darcyho zákona tento nárůst bude nepřímo úměrný druhé mocnině velikosti částic.

$$\Delta P = \phi \frac{\eta L u}{d_p^2}$$

Jednotlivé členy rovnice mají následující význam:

ϕ - faktor odporu kolony

η - viskozita mobilní fáze

L- délka kolony

u- lineární průtoková rychlost mobilní fáze

d_p – velikost částic

2.4.4 Kolony

Kolony patří mezi základní součásti UHPLC systému. Dochází v nich ke kontaktu mobilní a stacionární fáze, čímž je umožněno dosažení samotné separace. Kolony jsou nejčastěji tvořeny ocelovou nebo plastovou trubicí, ve které je pomocí frit uzavřena náplň. Délka trubice je nejčastěji v rozmezí 150 – 300 mm a vnitřní průměr 2,1-4,6 mm, pro některé analýzy i 100 μ m. Kolony pro UHPLC jsou zpravidla kratší, plněny za vysokého tlaku a koncové spoje jsou přizpůsobeny vysokým tlakům. S nástupem techniky LC-MS roste obliba kolon o průměru 2 mm a menších. Náplň kolony je tvořena sorbentem, jehož povrch může být modifikován vhodnou stacionární fází nebo může sloužit přímo jako stacionární fáze. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrolytické stability, hydrofobicity a chemické interakce s analytem. Trendem ve vývoji nových fází je snaha o zkrácení doby analýzy při zachování vysokého rozlišení a selektivity [31][27][17].



Obrázek č.6: Chromatografická kolona [32]

Analytické kolony můžeme rozdělit na:

- stacionární fáze na bázi silikagelu
- stacionární fáze na bázi modifikovaného silikagelu
- stacionární fáze na bázi oxidů kovů
- polymerní stacionární fáze
- hybridní stacionární fáze
- stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu
- monolitické stacionární fáze
- stacionární fáze pro HILIC [31], [33], [34].

2.4.5 Stacionární fáze použité v diplomové práci

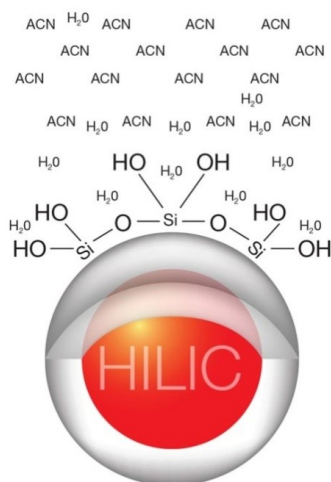
2.4.5.1 Kolony s povrchově porézními částicemi

Takovéto kolony jsou naplněny částicemi s porézním povrchem, neporézním vnitřním jádrem a homogenní velikostí. Patří mezi chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, což s sebou nese jisté nevýhody (chemická a teplotní nestabilita). Porézní povrch umožňuje rychlejší přenos hmoty a snížení rozmývání píků na rozdíl od plně porézních částic. Dochází ke zlepšení rozlišení, kapacity a citlivosti. Další výhodou je nižší spotřeba rozpouštědel, menší zpětný tlak a výrazné zrychlení analýzy, oproti použití plně porézních částic stejné velikosti. Během testování byly vyzkoušeny kolony Kinetex 2,6 µm Phenyl-Hexyl 100A 100X 4,6 mm, Kinetex 2,6 µm PFP 100A 100x4,6 mm a Kinetex 2,6 µm HILIC 100A 100x4,6 mm [35].

2.4.5.1.1 HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*) [34], [36], [37]

Separace pomocí HILIC je určena především pro polární, hydrofilní látky. Pro separace se využívají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze, které obsahují vysoký podíl organických rozpouštědel. Stacionární fáze musí být více polární než fáze mobilní. Nejvhodnější MF pro HILIC je acetonitril, který má nízkou viskozitu a používá se v koncentraci od 50% do 90%, avšak lze použít všechny organicko-vodné fáze. Stacionární fáze má nejčastěji podobu modifikovaného silikagelu. Nepolární látky, které nemají afinitu ke stacionární fázi, nejsou zadržovány, polární analyty jsou naopak dělené s vysokým rozlišením. Separace HILIC je řízena hydrofilní interakcí mezi stacionární fází a solutem. Na povrchu stacionární fáze se musí vytvořit hydratovaná

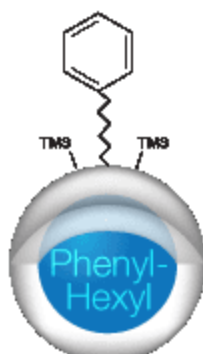
vrstva, aby mohlo dojít k hydrofilní interakci. Na separaci se kromě rozdělování podílejí i interakce dipól-dipól mezi vodnou vrstvou a molekulami analyzované látky a interakce typu vodíkových můstků. Přídavkem amonných solí organických kyselin (mravenčan, octan) se omezí elektrostatické odpuzování separovaných složek. Mezi faktory ovlivňující sílu interakce, a tím i separace tedy patří dipólový moment, pH mobilní fáze, polarita a přítomnost funkčních skupin schopných tvořit vodíkové můstky.



Obrázek č.7: Strukturální složení kolony HILIC [35]

2.4.5.1.2 Phenyl-Hexyl

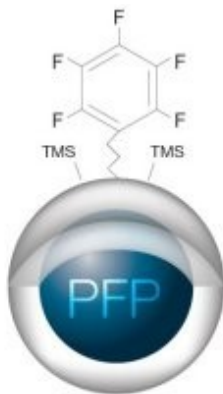
Fenylové fáze nabízejí mnohem lepší selektivitu než běžné alkyl-fáze. Phenyl-Hexyl fáze používá hexylovou skupinu ke spojení s povrchem silikagelu. Fenylová skupina je specifická pro selektivitu aromatických sloučenin a aminů. C6 řetězec způsobuje delší retenci [35].



Obrázek č.8: Strukturální složení kolony Phenyl-Hexyl [35]

2.4.5.1.3 Pentafluorofenyl - PFP

PFP kolona disponuje lepší selektivitou než tradiční alkylové stacionární fáze. Obsahuje pentafluorofenylový ligand navázaný na silikagel, který poskytuje vysoký stupeň stérické selektivity k oddělení strukturálních izomerů. Elektronegativita fluoru je rozhodující pro selektivitu kationových sloučenin. Využívá několik selektivních mechanismů (vodíkové vazby, aromatické a dipólové interakce) včetně hydrofobních interakcí, čímž je zajištěno vysoké rozlišení obtížně separovatelných sloučenin např. komplexní přírodní produkty, halogenované sloučeniny, izomery, aromatické sloučeniny, vysoce polární sloučeniny, atd. [32].



Obrázek č.9: Strukturní složení kolony PFP [35]

2.4.6 Předkolony

Kolonu lze chránit v případě potřeby (např. analýzy biologických vzorků) předkolonou. Jedná se o kratší kolonu 10-20 mm umístěnou před kolonou. Předkolona by měla mít stejný vnitřní průměr a náplň jako analytická kolona. Zachytává nečistoty a silně zadržované látky a zvyšuje životnost analytické kolony.

2.4.7 Detektory [38]

V kapalinové chromatografii je známo mnoho způsobů detekce látek. Detektory fungují jako takzvané převodníky, které převádějí fyzikální nebo chemické vlastnosti analytů nebo mobilní fáze na elektrický signál, jenž je úměrný koncentraci analytů v mobilní fázi. Mezi hlavní požadavky na detektor patří vysoká citlivost, minimální objem detekční cely, rychlá odezva, stabilita a reprodukovatelnost odezvy.

Typy detektorů v kapalinové chromatografii:

- refraktometrické
- spektrometrické
- fluorescenční
- elektrochemické (konduktometrické, potenciometrické, ampérometrické,...)
- hmotnostně spektrometrické
- charged aerosol detektor – CAD
- evaporative light scattering detector – ELSD

K detekci retinolu v diplomové práci byl použit hmotnostní spektrometr.

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je moderní vysoce výkonná fyzikálně-chemická analytická metoda. Je založena na separaci různě těžkých a elektricky nabitých iontů v magnetickém nebo elektrickém poli či v jejich kombinaci. Tato metoda je vysoce citlivá a spojení s HPLC se stalo jednou z nejpoužívanějších technik. Poskytuje údaje o elementárním složení vzorku, struktuře organických látek a biomolekul, kvalitativním a kvantitativním složení vzorku, struktuře a složení povrchů a izotopických poměrech atomů ve vzorku. Je to velice citlivá, specifická a rychlá metoda [39].

Výhody hmotnostní spektrometrie:

- vysoká selektivita a citlivost
- malá spotřeba vzorku
- poskytuje reprodukovatelné informace o molekulové hmotnosti a struktuře analytů
- spojení s moderními separačními metodami umožňuje provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu látek ve směsích
- umožňuje separaci látek, jejich kvantifikaci a identifikaci pomocí standardů a hmotnostních spekter
- moderní iontové zdroje rozšiřují oblast využitelnosti MS na vysokomolekulární netěkavé látky
- použitelnost pro všechny typy vzorků – těkavé, netěkavé, nepolární, polární, pevné, kapalné, plynné
- umožňuje také určit izotopový poměr prvků ve vzorku [39], [40]

Naopak mezi nevýhody hmotnostní spektrometrie patří například vysoká pořizovací cena, vysoké nároky na operátora, vyšší provozní náklady, vyšší nároky na čištění a destrukce analytu.

Základním principem MS je ionizace neutrálních molekul a následná separace elektricky nabitých iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) při jejich průchodu magnetickým nebo elektrickým polem [40].

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru m/z .

Obecný postup měření [41], [42]:

- 1) tvorba iontů - ionizace
- 2) filtrace iontů - hmotnostní analýza
- 3) měření četnosti iontů v závislosti na hodnotě m/z
- 4) hmotnostní spektrum - osa X vyznačuje hodnotu m/z a osa y četnost iontů.

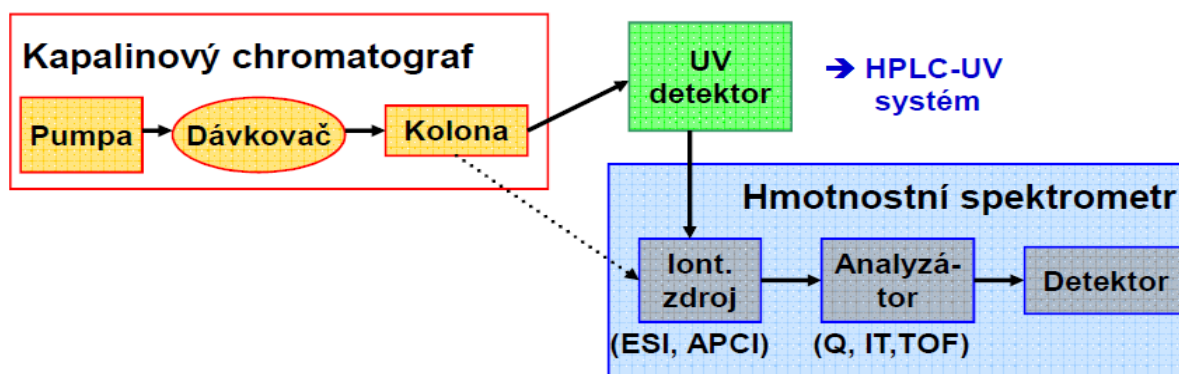
2.5.1 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [39], [42]

LC-MS patří v současnosti k hlavním trendům farmaceutické analýzy. Toto spojení umožňuje provádět vysoce selektivní a citlivé kvalitativní i kvantitativní analýzy složitých směsí jako jsou například biologické tkáně či tekutiny.

Ve spojení LC-MS se mobilní fáze obvykle přímo účastní ionizačního procesu. Z tohoto důvodu není možné použít úplně bez výhrad klasické mobilní fáze pro HPLC. Vhodnými mobilními fázemi jsou těkavá rozpouštědla s přidávkou těkavých aditiv (kyselina mravenčí, kyselina octová, atd.), jejichž koncentrace by měla být velmi nízká, jinak dochází k soupeření o náboj při procesu ionizace, a tím k nežádoucímu poklesu signálu.

Hlavní výhody spojení LC-MS:

- možnost analýzy složitých směsí
- zlepšení kvality spektrálních dat
- minimalizace potlačení signálu
- lepší spolehlivost kvantitativní analýzy díky izotopicky značeným vnitřním standardům
- možnost odhalení koeluce píků díky MS detekci
- větší jistota identifikace látek díky strukturální informaci MS a retenčnímu času



Obrázek č.10: Schéma UHPLC-MS [42]

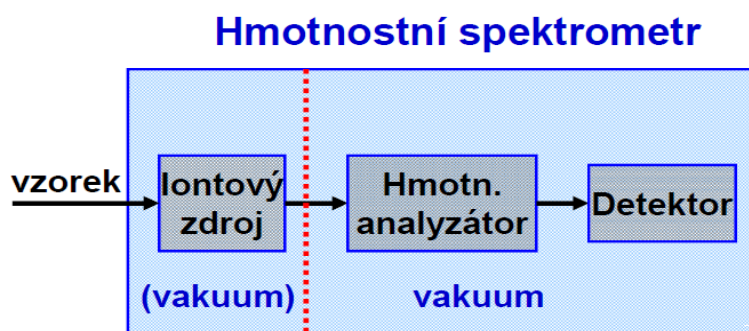
2.5.2 Základní části MS

1) iontový zdroj- slouží k převedení molekul analytu na nabitě částice = ionizaci, zdroj se liší podle použité ionizační techniky

2) hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle m/z

3) detektor - slouží k detekci iontů podle jejich rozdělení dle m/z a k určení četnosti jednotlivých iontů

Další důležité součásti - vakuový systém, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač [42].

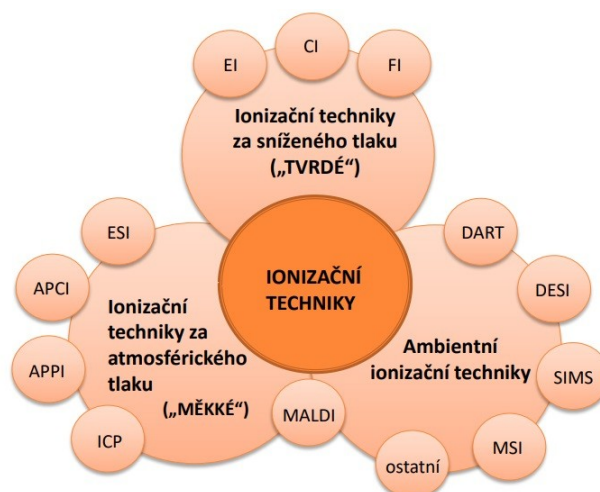


Obrázek č.11: Schéma hmotnostního spektrometru [42]

2.5.3 Ionizační techniky

Pro analýzu je nezbytné z neutrální molekuly vytvořit ionty. Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj. Aplikací elektrických a magnetických sil se energie a rychlost iontů dají kontrolovat a obojí tak přispívá k jejich separaci a detekci. Ionizace je také důležitá k eliminaci rozpouštědla. Většinu látek je možné ionizovat pomocí více ionizačních technik, které se volí podle povahy látky (těkavost, rozpustnost, polarita, velikost atd.) a dle separační techniky. V iontovém zdroji dochází k fragmentaci původní molekuly na menší částice, které jsou pro každou látku specifické. Podle množství dodané energie se obvykle dělí ionizační techniky na měkké a tvrdé [42][27].

Ionizační techniky lze rozdělit (obrázek č.12):

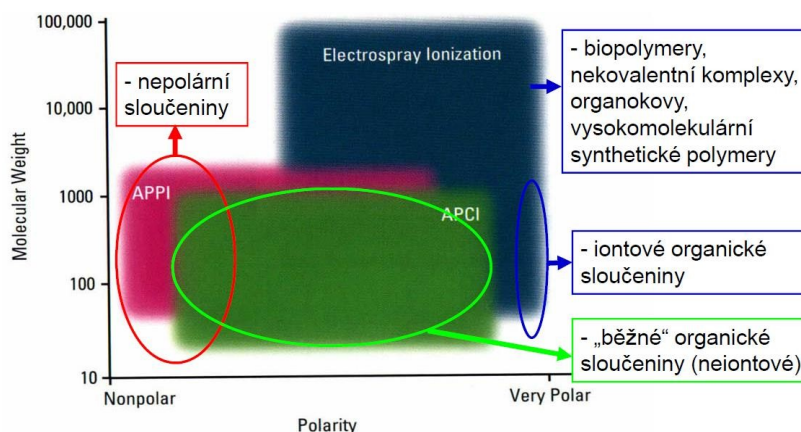


Obrázek č.12: Rozdělení ionizačních technik [43]

Nejpoužívanějšími ionizačními technikami ve spojení s HPLC jsou techniky ionizace za atmosférického tlaku (nebo-li API techniky) [27].

2.5.3.1 API (atmospheric pressure ionization,) techniky [42], [43]

Techniky za atmosférického tlaku znamenaly průlom v řešení spojení HPLC/MS. ESI a APCI představují standart pro HPLC/MS systémy. APPI je považována za alternativu pro nepolární nebo velmi labilní látky. Vznikají především ionty se sudým počtem elektronů.



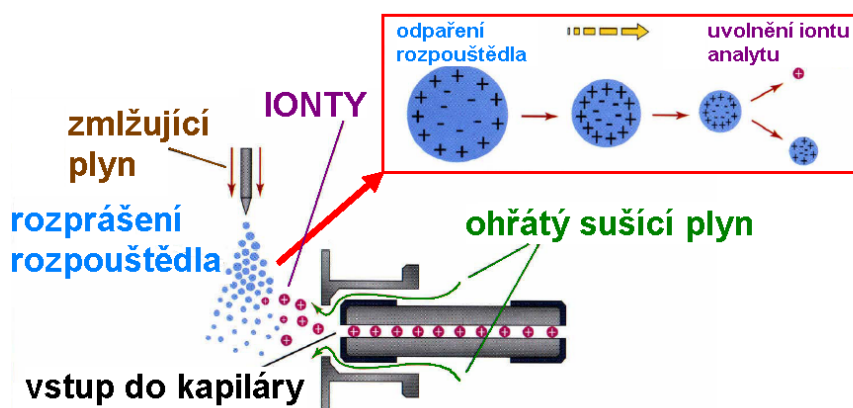
Obrázek č.13: Rozdělení API technik [42]

2.5.3.2 ESI – ionizace elektrosprejem [39], [41], [42]

Nejčastěji používaná ionizační metoda pro spojení HPLC/MS, vhodná pro látky středně polární až iontové, aplikovatelná v širokém rozsahu m/z. Vznikají vícenásobně nabitě ionty. Metoda je vhodná pro ionizaci biomakromolekul a proteomickou analýzu.

2.5.3.2.1 Mechanismus ESI

Roztok vzorku vstupuje pomocí kovové kapiláry s vloženým napětím (3-5 kV) do iontového zdroje. Za pomoci zmlžujícího (nebulizačního) plynu vznikají nabité kapičky na konci sprejovací kapiláry. Odpařením rozpouštědla proudem dusíku a vysoké teploty dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakováním tohoto procesu vede až k uvolnění iontů. Jednotlivé ionty jsou pak unášeny směrem k analyzátoru a detektoru MS. Na průběh ionizace ESI má velký vliv pH mobilní fáze. Hodnota pH by měla být upravena podle charakteru analytu. Kyselé pH podporuje ionizaci bazických sloučenin. Zásadité pH naopak podporuje ionizaci kyselých sloučenin. Při ESI má na průběh ionizace vliv i rozpouštědlo. Acetonitril je proton akceptorové rozpouštědlo a podporuje deprotonaci, naproti tomu metanol je proton donorové rozpouštědlo a podporuje vznik kladných iontů.



Obrázek č.14: Schéma ESI [42]

2.5.3.3 APCI [42]

APCI na rozdíl od ESI probíhá v plynné fázi, není proto vhodná pro ionizaci biomolekul. Metoda je vhodná pro nepolární až středně polární látky. Během ionizace vznikají pouze jedny nabití ionty. Analyt je v mobilní fázi rozprašován do vyhřívané komory zdroje. Mobilní fáze je odpařována. K ionizaci dochází až pomocí koronového výboje, který vzniká na výbojové elektrodě. První jsou ionizovány molekuly mobilní fáze, které následně ionizují analyt. Modifikací APCI je APPI, kde je koronový výboj nahrazen UV zářením.

2.5.4 Analyzátoři [27], [42] [44]

Hmotnostní analyzátor bývá někdy označován jako srdce MS. Nachází se mezi iontovým zdrojem a detektorem. Úkolem analyzátoru je rozdělení iontů podle poměru m/z a následně jejich urychlení a fokusace. Využívají elektrické, magnetické pole nebo jejich kombinaci. Pracují za vysokého vakua.

Při výběru analyzátoru jsou důležité tyto parametry:

- maximální měřitelná hodnota m/z
- rozlišení – schopnost separovat dva sousední ionty
- účinnost
- správnost hodnoty
- lineární dynamický rozsah
- rychlost, citlivost

Analyzátoři fungují na základě několika základních principů:

- zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli či jejich kombinaci
- různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnoměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí
- různá doba letu iontů v oblasti bez pole
- různá absorpce energie při cyklotronálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli
- rozdělení iontů na základě různé frekvence harmonických oscilací

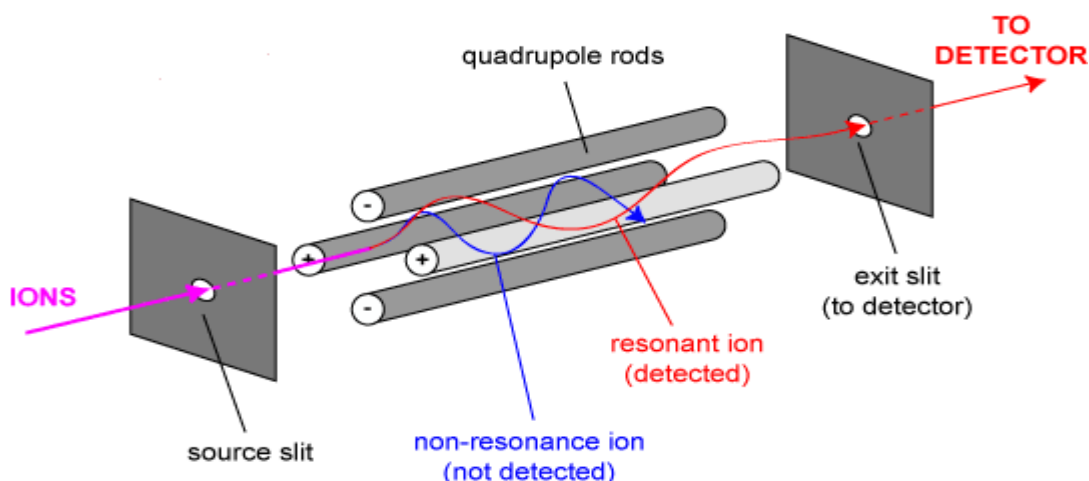
Základní typy hmotnostních analyzátorů:

- magnetický sektorový analyzátor
- kvadrupól
- 3D a lineární iontová past
- analyzátor doby letu
- orbitrap
- cyklotronová resonance
- hybridní analyzátoři
- analyzátoři pohyblivosti iontů

2.5.4.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je oblíbený pro svou jednoduchost a nízkou cenu. Jedná se o nejčastěji používaný analyzátor v uspořádání LC/MS. Skládá se ze 4 paralelně vedoucích tyčí délky 20-30 cm. Na dvou protilehlých tyčích je vloženo

kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionť je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. Při určité kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí dosáhnou ionty určité m/z stabilních oscilací a projdou na detektor MS. Zatímco ionty jiných m/z oscilují s rostoucí amplitudou a jsou zachyceny na tyčích. Zařizování se chová jako hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu m/z . Výhodou je rychlý záznam spektra, nízká cena a jednoduchá konstrukce. Nevýhodou je malý rozsah m/z a nízké rozlišení [39], [42].



Obrázek č.15: Schéma kvadrupólového analyzátoru [45]

2.5.4.2 Trojitý kvadrupól – QqQ [40], [42]

Tři kvadrupóly řazeny za sebou, prostřední z nich (q_2) slouží jako kolizní cela, do které je zaveden kolizní plyn. Tento plyn způsobuje kolizní excitaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q_1 a jejich následnou fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí Q_3 .

2.5.5 Detektory [39], [42]

Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z v analyzátozu, převádí signál proudu iontů na elektrický signál, který může být zesílen, uložen a zobrazen v počítači. Dále slouží k určení relativní intenzity jednotlivých iontů.

2.5.5.1 Detekce iontů

- elektronový násobič – ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí elektron
- fotonásobič – ionty dopadají na konverzní dynodu, uvolní se elektron, který dopadem na fosforovou destičku uvolní foton
- Faradayova klec – dopadající ionty narážejí na povrch dynody, emituje se elektron a indukuje se proud

2.6 Preanalytická část laboratorního vyšetření

Preanalytické období zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr, zaslání odebraného biologického materiálu do laboratoře a skladování před analýzou. Výsledek měření může ovlivnit celá řada faktorů, biologických vlivů a zejména chyb, které nastanou právě během preanalytické fáze. [2].

2.6.1 Odběr biologického materiálu (BM) [6]

Nejčastěji vznikají chyby během odběru biologického materiálu a jeho označení. Důležitá je přesná a jednoznačná identifikace vzorku, která zabrání jeho záměně. Při odběru musíme brát ohled na typ BM, druh odběrového materiálu a použití odpovídající techniky odběru. V neposlední řadě hraje důležitou roli také poučení a příprava pacienta. Vlastní odběr může být ovlivněn dobou odběru i polohou pacienta.

2.6.2 Biologické vlivy

Biologické vlivy rozdělujeme na neovlivnitelné a proměnné. Mezi neovlivnitelné faktory řadíme rasu, pohlaví, věk, cyklické změny a biologický poločas stanovované látky. Hmotnost, životní styl, dietní návyky, léky a zevní prostředí naopak mezi proměnné [2], [6].

2.6.3 Transport materiálu

Transport materiálu musí být rychlý a šetrný. Materiálu, který je transportován neprodleně, postačí pokojová teplota. Některé analyty (kyselá fosfatáza, homocystein atd.) vyžadují pro transport teplotu 4°C [2], [6].

2.6.4 Skladování materiálu

Teplota skladování BM závisí na stabilitě analytu a době provedení analýzy. Teplota 4°C je dostačující pro většinu analytů, které jsou zpracovány do 24-48 hodin, popř. do týdne. Pro dlouhodobé skladování je vhodná teplota -20°C. Při skladování je nutné, aby BM byl dobře uzavřen a tím bylo zabráněno jeho odpařování, mikrobiologické kontaminaci, difúzi plynů a vlivu světla [2], [6].

2.6.5 Moč [20]

Moč je průhledný vodný roztok metabolických odpadů, organických látek a rozpuštěných solí, který je vylučován ledvinami, k odstranění odpadních molekul a k udržení homeostázy. Barva moči je od světle žluté po jantarovou a pH v rozmezí 5-6. Moč můžeme získat jednorázově nebo sběrem za určitý časový úsek. Je to nestálá tekutina, která po odběru podléhá rychlým změnám. Moč je výborným prostředím pro množení mikroorganismů, které rozkládají látky v ní obsažené.

2.7 Úprava biologického materiálu před analýzou

Biologický vzorek je velmi složitá matrice obsahující celou řadu endogenních látek. Tyto látky jsou v nadbytku vzhledem ke stanovované proměnné. Příslušná analytická metoda proto musí být vysoce selektivní a citlivá. Před vlastní analýzou HPLC je nutné provést úpravu vzorku, která sníží obsah endogenních látek a tím zlepší selektivitu a zabrání poškození instrumentu. Cílem úpravy vzorku je izolovat čistý analyt od interferujících látek, rozpustit ho a zakoncentrovat. Finální rozpouštědlo vzorku by nemělo ovlivnit retenci analytu. Většinou je úprava nejdůležitějším, ale také i nejkritičtějším bodem analýzy. Mezi hlavní metody úpravy biologického vzorku patří deproteinace, extrakce na pevné fázi a extrakce kapalina-kapalina [17], [21].

2.7.1 Deproteinace

Precipitace vzorku je jedna z nejjednodušších a nejrychlejších metod odstranění proteinů. Proteiny jsou během této metody vysráženy přidávkem precipitačního činidla a následně odděleny centrifugací. Mezi precipitační činidla mimo jiné patří organická rozpouštědla (metanol, aceton, acetonitril atd.) nebo nasycené roztoky solí (CuSO_4 , Na_2WO_4 , ZnSO_4 v NaOH atd.). Výběr precipitačního činidla je ovlivněn charakterem biologického vzorku i analyzované látky. Nevýhodou této metody je nižší čistota a i určité naředění vzorku [22].

Při deproteinaci musí být splněny tyto podmínky:

- vzniklý precipitát neadsorbuje na svůj povrch sledovaný analyt
- úplné odstranění bílkovin
- deproteinační činidlo neovlivňuje sledovaný analyt, neinterferuje s ním při detekci a neovlivňuje výtěžnost analýzy [22]

Nedokonalé odstranění proteinů může negativně ovlivnit analýzu. Například při detekci látek hmotnostní spektrometrií dochází vlivem matrice k poklesu účinnosti ionizačního procesu, což vede ke snížení reprodukovatelnosti, účinnosti a ke zhoršení limitu detekce. [17]

Proteiny ze vzorku lze také odstranit pomocí ultrafiltrace nebo enzymaticky.

2.7.2 Extrakce kapalina-kapalina (Liquid–Liquid Extraction, LLE)

Extrakce kapalina-kapalina je metoda, založená na extrakci stanovované látky z biologického materiálu do s vodou nemísitelného organického rozpouštědla. Dochází k oddělení analytů od nečistot ve vzorku matrice [21].

Extrakce analytu z vodné fáze do organické závisí na polaritě organického rozpouštědla, pH vodné fáze a rozpustnosti analytu v organickém rozpouštědle.

Při extrakci organickými rozpouštědly se nejdříve ke vzorku přidá určité organické rozpouštědlo, následuje třepání, centrifugace a odebrání supernatantu. Nadbytek rozpouštědla se odpaří. V některých případech se používá i zpětná extrakce.

Distribuce stanovené látky mezi dvě kapaliny je vyjádřena Nerstovou distribuční konstantou [21].

$$K_D = \frac{\text{koncentrace analytu v organické fázi}}{\text{koncentrace analytu ve vodné fázi}}$$

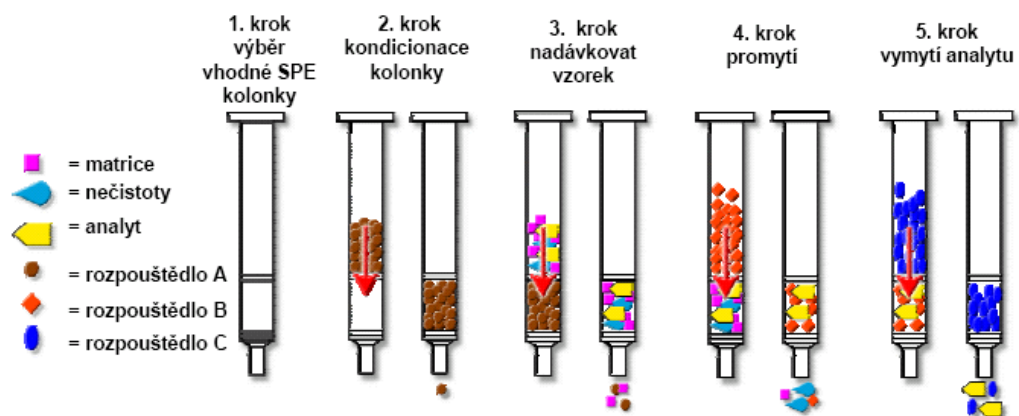
Možnosti zvýšení hodnoty K_D a tím i zvýšení výtěžnosti extrakce:

- pokud je analyt v iontové formě, může být extrahován použitím iontového páru, nebo je snaha potlačit tuto ionizaci, aby byl více rozpustný v organické fázi např. změnou pH
- použitím organického rozpouštědla, ve kterém je analyt nejvíce rozpustný
- vysolování sníží koncentraci analytu ve vodné fázi
- kovové ionty umožní vznik komplexu s hydrofóbními látkami [23]

Hlavními výhodami LLE je relativní jednoduchost, finanční nenáročnost a široké uplatnění v bioanalýze. Mezi její nevýhody patří vysoká spotřeba rozpouštědel a možný vznik emulzí [24].

2.7.3 Extrakce na pevné fázi SPE [21], [24]

SPE je jednou z nejpoužívanějších metod úprav biologického materiálu současnosti. Oproti LLE vyniká nižší spotřebou rozpouštědel, redukcí času extrakce a vyšší účinností. Při extrakci na pevné fázi je nutné nejprve připravit vzorek tak, aby nedošlo k zanesení extrakční kolonky. Extrakční kolonka má tvar injekční stříkačky. Úprava vzorku může zahrnovat změnu pH, zředění vzorku či filtraci. Aktivace kolonky je dalším nutným krokem při extrakci. Kolonka se aktivuje vhodným rozpouštědlem a tak dochází k solvataci funkčních skupin, které pak reagují s analyzovanou látkou. Poté může být aplikován vzorek. Analyt se naváže na sorbent, který může mít mnoho modifikací. Balastní látky jsou vymyty z kolony. Princip je analogický HPLC separaci na koloně, avšak za nižších tlaků. K dispozici je celá řada sorbentů charakteru reverzních i normálních fází a iontoměničů. Celý proces probíhá ve speciálním zařízení, kde je průtok vzorku i rozpouštědel urychlován pod tlakem. Tímto procesem vznikne poměrně čistý extrakt. Výhodou je i možnost spojit extrakci s HPLC a její miniaturizace.



Obrázek č.16: Postup extrakce na pevné fázi [25]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a pomůcky

3.1.1 Přístroje

UHPLC systém Nexera, Shimadzu (Japonsko) složený z:

- Komunikační jednotka CBM-20A
- Degasser DGU-20A3
- Dvě vysokotlaké pumpy LC-30 AD
- Dávkovač typu SIL-30 AC pro vialky
- Rack Changer II pro mikrotitrační destičky
- Kolonový termostat CTO-20 AC
- Selekční ventil
- Detektory
 - UV/VIS detektor SPD-20A
 - Hmotnostní spektrometr LCMS-8030 trojitý kvadrupól, Shimadzu (Japonsko) s ionizačním zdrojem ESI
- Počítačový software LabSolutions 5.41 SP1

Analytické váhy Sartorius AG CPA 623S (Německo)

Magnetická míchačka, Ika Werke (Německo)

Manifold pro mikrotitrační destičky, Multi-well Filter Plate Vacuum Manifold, Pall Life Science (USA)

Centrifuga 5810R Eppendorf (Německo)

Mikrocentrifuga D3024R High Speed Refrigerated Micro-Centrifuge Scilogex (USA)

pH metr Sentron SI (Nizozemsko)

Ultrazvuková lázeň DU-100, Chromservis (Česká republika)

Vakuová pumpa Vacc Space 50, Chromservis (Česká republika)

Vakuová odparka Concentrator plus, Eppendorf (Německo)

Vortex Lab Dancer, Ika Werke (Německo)

3.1.2 Chromatografické kolony

Kinetex HILIC 2,6 μm 100A 100x4,6 mm Phenomenex (USA)

Kinetex Phenyl-Hexyl 2,6 μm 100A 100x4,6 mm Phenomenex (USA)

Kinetex PFP 2,6 μm 100A 100x4,6 mm Phenomenex (USA)

3.2 Použité chemikálie

Acetonitril (LC-MS Chromasolv®), Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

Octan amonný ($\geq 99\%$), Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

Jodid draselný (99,5%), Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

Kyselina mravenčí (98-100%) Emsure®, Merck (Česká republika)

Methanol (LC-MS Chromasolv®), Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

Voda (LC-MS Chromasolv®) Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

Kreatinin, Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

Retinol, Fluka analytical – Sigma Aldrich (Česká republika)

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Mobilní fáze

Jako mobilní fáze byly vyzkoušeny různé poměry methanolu, kyseliny mravenčí (FA) v acetonitrilu, vody nebo octanu amonného (AMAC).

Octan amonný 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,1927 g ve 250 ml vody a následným přefiltrováním přes membránové filtry o velikosti póru 0,2 μm .

Dále byla použita i kyselina mravenčí 0,005 M, která se připravila doplněním 36 μl FA na 200 ml acetonitrilem.

3.3.2 Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztok retinolu o $c = 100 \mu\text{mol/l}$ byl připraven rozpuštěním 2,86 mg retinolu ve 100 ml methanolu LC-MS kvality.

Zásobní roztok kreatininu o $c = 25 \text{ mmol/l}$ byl připraven rozpuštěním 0,28 g kreatininu ve 100 ml vody LC-MS kvality.

Všechny takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány při -20°C v mrazáku.

3.3.3 Pracovní roztoky standardů

Pracovní roztoky retinolu byly připraveny naředěním zásobního roztoku methanolem LC-MS kvality na výsledné koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$ a 1 $\mu\text{mol/l}$.

Pracovní roztok kreatininu byl připraven naředěním zásobního roztoku vodou LC-MS kvality na výslednou koncentraci 0,88 mmol/l.

Směsný pracovní roztok byl připraven naředěním a smísením zásobních roztoků. Výsledná koncentrace kreatininu v směsném pracovním roztoku byla 0,88 mmol/l. a retinolu 1 $\mu\text{mol/l}$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace chromatografické metody

Optimalizace je proces, během kterého jsou nastaveny vhodné podmínky pro separaci zkoumaných látek. Během vývoje metody byly optimalizovány detekční podmínky, složení mobilní fáze a stacionární fáze.

Nejprve byly zjištěny informace o základních vlastnostech analyzovaných látek včetně jejich struktur. Na základě těchto informací z odborné literatury byly zkoumány různé druhy stacionárních fází a složení mobilních fází.

4.1.1 Detekční podmínky

4.1.1.1 MS detekce retinolu

Pro zjištění vhodných podmínek byla použita automatická optimalizace detekce s využitím standardního roztoku retinolu. Byly vyhodnoceny tzv. MRM přechody (multiple reaction monitoring), které byly porovnány s odbornou literaturou a další důležité podmínky detekce jako je napětí na kvadrupólu, kolizní energie apod. Byla zvolena kombinace několika přechodů pro větší selektivitu. Přechody jsou uvedeny v tabulce 1. Další parametry MS detektoru jsou v tabulce 2.

Tabulka č. 1: MRM přechody retinolu

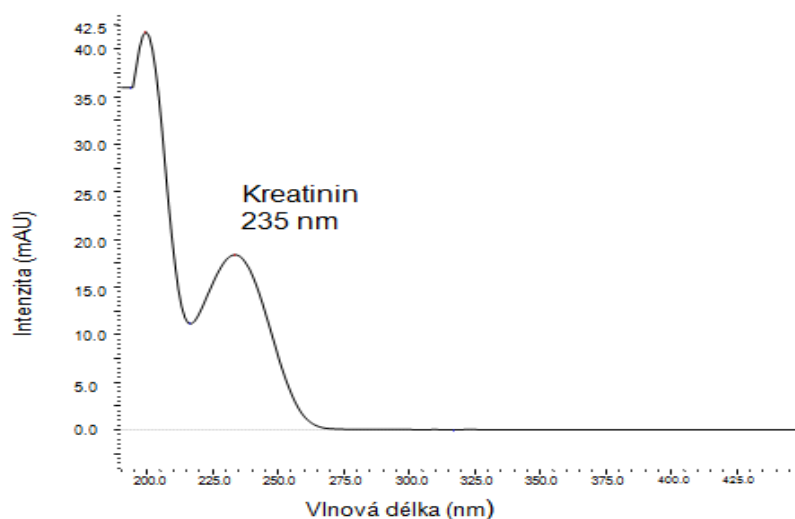
Prekurzor	Produkt
Retinol	
269,10	107,00
269,10	93,25

Tabulka č. 2: Nastavení parametrů detekce

Typ ionizace	ESI +
Napětí na kapiláře	4,5 kV
Teplota na DL (Desolvation Line)	250°C
Teplota na Heat bloku	400°C
Průtok sušícího plynu	15 l/min
Průtok nebulizačního plynu	3 l/min

4.1.1.2 UV detekce kreatininu

Zjištění optimální vlnové délky pro vlastní analýzu kreatininu spočívalo v proměření absorpčního spektra kreatininu a jeho porovnání s literaturou. Ze zjištěných dat lze určit absorpční maximum při 235nm (Obrázek č. 17).



Obrázek č.17: Absorpční spektrum kreatininu

4.1.2 Volba stacionární a složení mobilní fáze

4.1.2.1.1 Kinetex 2,6 µm HILIC 100A 100x4,6 mm

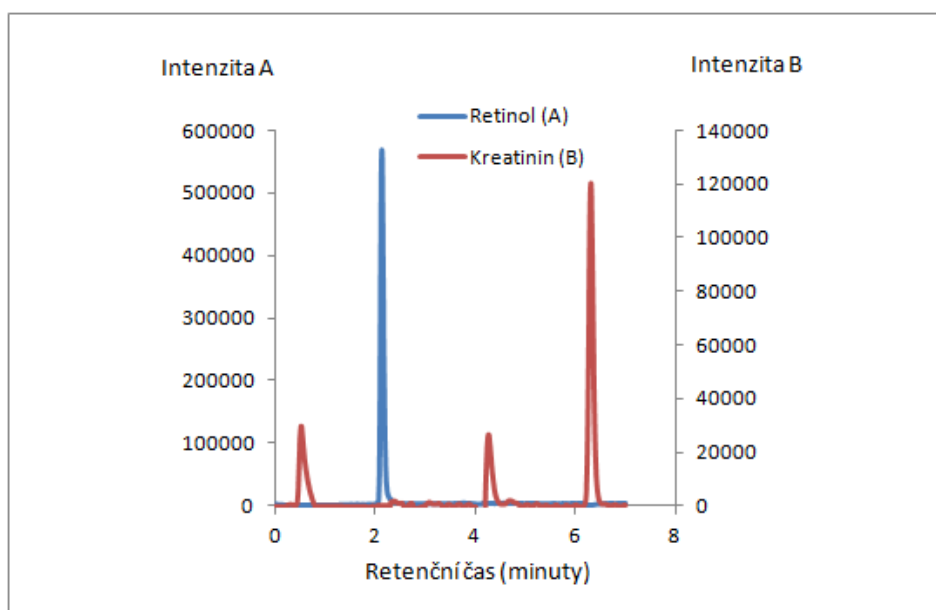
Jako první byla testována kolona s povrchově porézními částicemi Kinetex 2,6 µm HILIC 100A 100x4,6 mm. Separace pomocí fáze HILIC je vhodná pro polární, ve vodě dobře rozpustné látky, zahrnující biologicky aktivní sloučeniny jako jsou aminokyseliny, peptidy atd. Vodné mobilní fáze obsahující vysoký podíl organického rozpouštědla. Upřednostňuje se především ACN.

Byla testována řada mobilních fází. V první fázi byla vyzkoušena kombinace ACN (s 0,005 M FA) s vodou v různých poměrech, jak uvádí tab. 3. S použitím vody v mobilní fázi nebylo dosaženo vhodné separace.

Ve druhé fázi se přešlo ke kombinaci ACN (s 0,005 M FA, obrázek č.18) nebo methanolu s AMAC, také v různých poměrech. Přehled těchto poměrů je také uveden v tabulce 3. Tvar píků se s použitím methanolu zhoršil a na separaci neměl vliv.

Tabulka č. 3: Poměry MF složené z ACN nebo methanolu a AMAC/H₂O

ROZPOUŠTĚDLO	POMĚR				
ACN (FA)	90	85	80	75	70
H ₂ O	10	15	20	25	30
AMAC	10	15	20	25	20
METANOL			80		



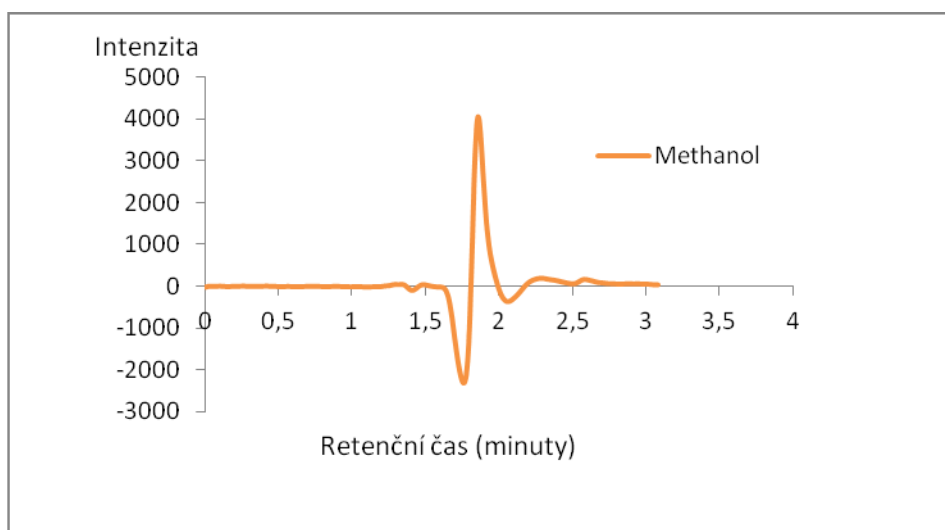
Obrázek č.18: Chromatogram 1

retinol (1 μmol/l), kreatinin (0,88 mmol/l)

80% MeOH + 20% AMAC (10 mmol/l, pH 6,69), 0,5 ml/min, 3 μl

Kinetex 2,6μm HILIC 100A 100x4,6 mm

Pomocí methanolu při průtoku 0,5 ml/min byl změřen mrtvý čas (obrázek č. 19). Byl velice blízko retenčnímu času retinolu. Mrtvý čas metanolu byl 1,95 minuty a retenční čas retinolu byl 2,05 minuty.



Obrázek č.19 Chromatogram 2

methanol

80% MeOH + 20% AMAC (10 mmol/l, pH 6,69), 0,5 ml/min, 3 μ l

Kinetex 2,6 μ m HILIC 100A 100x4,6 mm

Na základě těchto výsledků byla vyzkoušena jiná kolona.

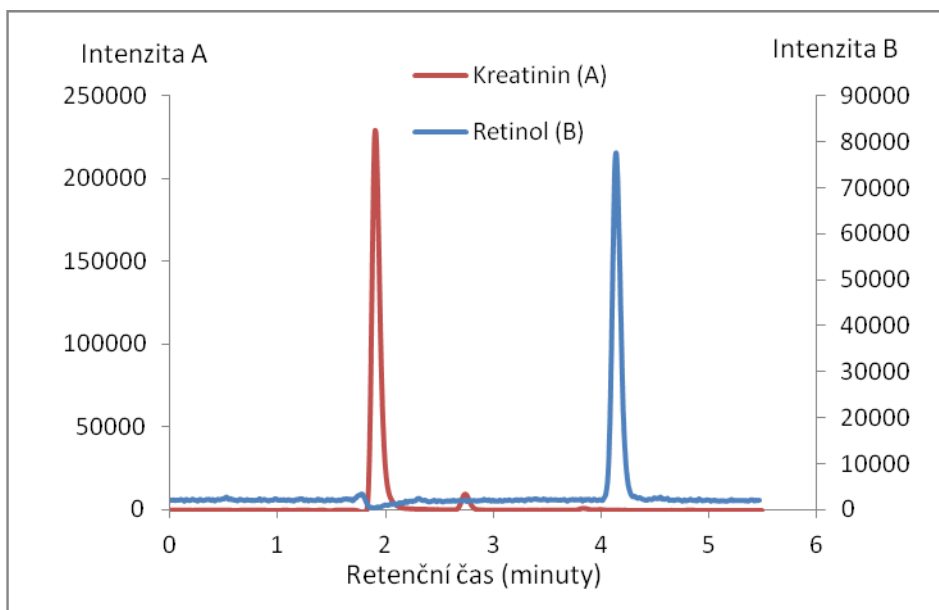
4.1.2.1.2 Kinetex 2,6 μ m Phenyl-Hexyl 100A 100x4,6 mm

Druhou zkoušenou kolonou byla kolona Kinetex 2,6 μ m Phenyl-Hexyl 100A 100 x 4,6 mm. Jedná se také o kolonu s povrchově porézními částicemi. Fenylová skupina je specifická pro selektivitu aromatických sloučenin a aminů.

Jako první mobilní fáze byla vyzkoušena kombinace ACN (s 0,005 M FA) a vody v různých poměrech. Píky byly hůře identifikovatelné a byl pozorován vyšší šum základní linie. Voda byla proto vyměněna za AMAC (obrázek č. 20) a opět byly vyzkoušeny různé poměry. Přehled poměrů je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Poměry MF složené z ACN a AMAC/H₂O

ROZPOUŠTĚDLO	POMĚR		
ACN (FA)	90	80	70
H ₂ O	10	20	30
AMAC	10	20	30



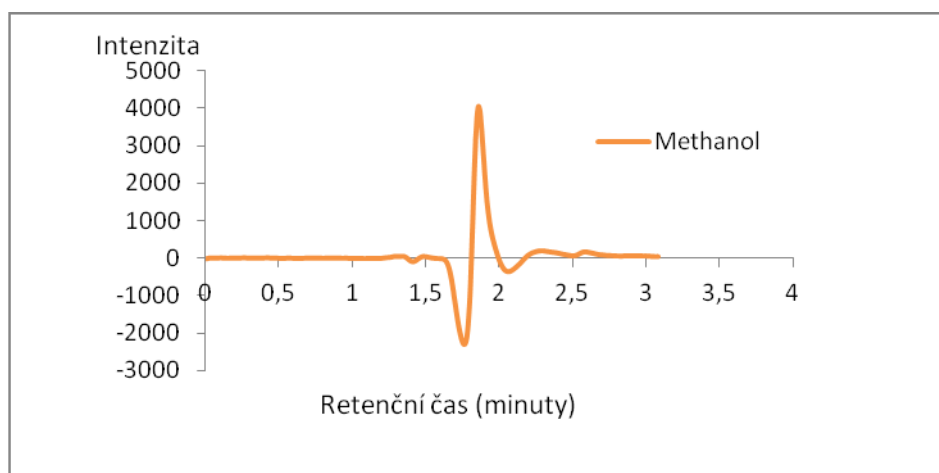
Obrázek č.20: Chromatogram 4

retinol (1 $\mu\text{mol/l}$), kreatinin (0,88 mmol/l)

80% ACN (0,005 M FA) + 20% AMAC (10 mmol/l , pH 6,69), 0,5 ml/min , 3 μl

Kinetex 2,6 μm Phenyl-Hexyl 100A 100x4,6 mm

Pomocí methanolu při průtoku 0,5 ml/l byl opět změřen mrtvý čas (obrázek č. 21). Bohužel bylo zjištěno, že retenční čas nyní kreatininu v 1,95 minutě odpovídá mrtvému času.



Obrázek č.21 : Chromatogram 5

methanol

80% ACN (0,005 M FA) + 20% AMAC (10 mmol/l , pH 6,69), 0,5 ml/min , 3 μl

Kinetex 2,6 μm Phenyl-Hexyl 100A 100x4,6 mm

Na základě těchto výsledků byla vyzkoušena jiná kolona.

4.1.2.1.3 Kinetex 2,6 µm PFP 100A 100x4,6 mm

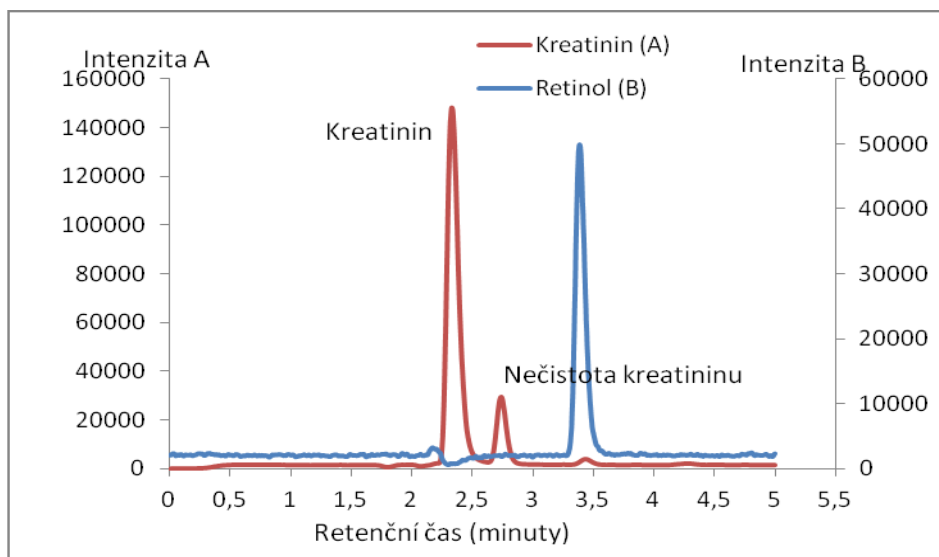
Dále byla vyzkoušena kolona Kinetex 2,6 µm PFP 100A 100x4,6 mm, Phenomenex (USA). Tato kolona opět patří mezi kolony s povrchově porézními částicemi. Stacionární fáze je zde modifikována pentafluorfenylem (PFP). Výhodou této kolony je rychlá a účinná separace. Vyznačuje se aromatickou a polární selektivitou.

Opět byla testována řada mobilních fází. Nejprve byla zkoušena kombinace ACN (s 0,005 M FA) s vodou. Nebylo ale dosaženo optimální separace, proto byla voda zaměněna za AMAC a opět bylo vyzkoušeno několik poměrů ACN (FA) s AMAC. Přehled těchto poměrů je uveden v tabulce 5.

Tabulka č. 5: Poměry MF složené z ACN a AMAC/H₂O

ROZPOUŠTĚDLO	POMĚR				
ACN (FA)	90	80	78	75	70
H ₂ O	10	20			30
AMAC	10	20	22	25	30

Optimální separace nastala při složení MF v poměru ACN (0,005 M FA) 78:22 AMAC (Obrázek č. 22)



Obrázek č.22: Chromatogram 6

retinol (1 µmol/l), kreatinin (0,88 mmol/l)

78% ACN (0,005 M FA) + 22% AMAC (10 mmol/l, pH 6,69), 0,5 ml/min, 3 µl

Kinetex 2,6 µm PFP 100A 100x4,6 mm

Pomocí methanolu při průtoku 0,5ml/min byl změřen mrtvý čas. Retenční časy analytu byly rozdílné oproti mrtvému času. Tato kolona byla proto zvolena jako finální, z důvodu dobré separace, optimální doby analýzy a intenzity píků analytů.

4.2 Souhrn vybraných podmínek

Tabulka č. 6: Souhrn vybraných podmínek

Analytická kolona	Kinetex 2,6 μ m PFP 100A 100x4,6 mm
Předkolona	Kinetex PFP 4,6 mm
Mobilní fáze	10 mM AMAC (pH 6,4) a ACN (0,005 M FA) v poměru 22:78
Průtok	0,5 ml/min
pH	6,69
Detekce	235 nm pro kreatinin, retinol dle MRM přechodů
Teplota	25°C
Nastříkovaný objem	3 μ l
Retenční čas	kreatinin 2,40 min, retinol 3,45 min

4.3 Částečná validace metody [34][47][48]

4.3.1 Zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony vyjadřuje bezrozměrná veličina - zdánlivý počet teoretických pater (N). Vždy se vztahuje k jednotlivé koloně a stanovované látce. Čím větší počet teoretických pater kolona má, tím je její účinnost vyšší.

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R retenční čas

w_h šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivé počty teoretických pater byly spočítány pro kreatinin 2450 a pro retinol 3872.

4.3.2 Výškový ekvivalent teoretického patra

Délku kolony připadající na jedno patro určuje výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra (HEPT, H). Lze tedy porovnávat účinnost chromatografických kolon.

$$H = \frac{l}{N} (\mu\text{m})$$

l délka kolony

N zdánlivý počet teoretických pater

Výškový ekvivalent teoretického patra pro retinol byl spočítán 3,9 μm a pro kreatinin 1,6 μm .

4.3.3 Faktor symetrie

Faktor symetrie (A_s) je bezrozměrná veličina, která popisuje symetrii chromatografického píku. Je důležitý při určování kvantity měřeného analytu. Ideální hodnota A_s se rovná 1,0. Je-li hodnota vyšší než 1,0 dochází k chvostování píku analytu, je-li hodnota nižší než 1,0 dochází k rozmývání píku.

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Faktor symetrie pro pík kreatininu měl hodnotu 1,43 a pro pík retinolu 1,19.

Hodnoty, jež byly naměřeny, splňují požadavky Českého lékopisu 2009, které jsou 0,8 - 1,5.

4.3.4 Rozlišení

Rozlišení (R_s) je bezrozměrná veličina vyjadřující míru separace dvou po sobě eluujících analytů. Jedním z požadavků je separace až na základní linii. Cílem je získat hodnoty rozlišení 1,5 a vyšší.

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

t_{R1} a t_{R2} retenční časy

w_{h1} a w_{h2} šířky píků v polovině výšky

Rozlišení pro pík kreatininu a přítomné nečistoty mělo hodnotu 1,55. Pro retinol nebylo rozlišení měřeno. Vzájemné rozlišení píků retinolu a kreatininu nebylo měřeno z důvodu detekce na odlišných detektorech.

4.3.5 Detekční limit

Jedním z parametrů citlivosti je mez detekce LOD (limit of detection). Mez detekce vyjadřuje míru citlivosti metody (nejnižší detekovatelnou koncentraci látky). Pro biologický materiál je vypočítán jako poměr signálu k šumu krát 3.

Detekční limit pro kreatinin měl hodnotu 9,81 $\mu\text{mol/l}$ a pro retinol 0,05 $\mu\text{mol/l}$.

4.3.6 Kvantitativní limit

Dalším parametrem citlivosti je kvantitativní limit neboli mez stanovitelnosti LOQ (limit of quantification). Hodnota udává nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Pro biologický materiál je vypočítána jako poměr signálu k šumu krát 10.

Kvantitativní limit pro kreatinin měl hodnotu 32,69 $\mu\text{mol/l}$ a pro retinol 0,16 $\mu\text{mol/l}$.

4.3.7 Opakovatelnost nástřiků

Opakovatelnost se vyjadřuje stejně jako výpočet relativní směrodatné odchylky.

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Tabulka č. 8: Opakovatelnost nástřiků

	RETINOL		KREATININ	
	Plocha	retenční čas	Plocha	retenční čas
	96 546	3,383	1 032 255	2,411
	95 862	3,385	1 021 405	2,426
	96 314	3,383	1 016 898	2,390
	96 910	3,384	1 019 787	2,403
	96 370	3,387	1 018 677	2,410
	96 375	3,382	1 018 797	2,401
	96 463	3,385	1 016 604	2,386
	96 725	3,384	1 017 624	2,395
SD	310,005	0,002	5 094,52	0,005
RSD (%)	0,32	0,05	0,50	0,01
Průměr	96 446	3,384	1 020 256	2,403

Podmínky: 1 µmol/l retinol, 0,88 mM kreatinin, Kinetex 2,6 µm PFP 100A
100x4,6 mm, MF: 78% ACN (0,005 M FA), 22% AMAC, 0,5 ml/min, 3 µl

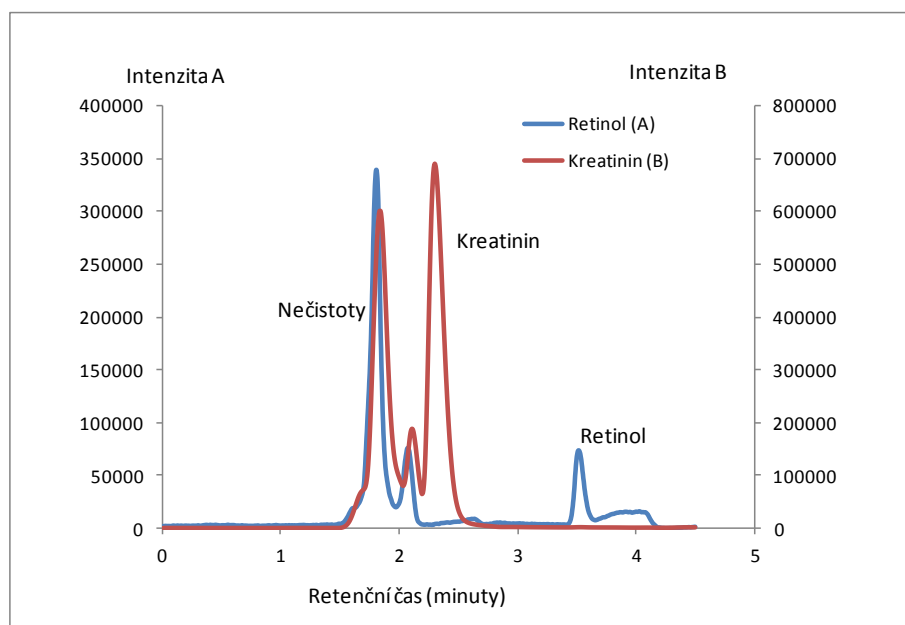
Opakovatelnost nástřiku vzorku kreatininu i retinolu vyhovuje požadavkům
relativní směrodatné odchylky do 1 %.

4.4 Úprava biologického materiálu

Před samotnou analýzou biologického materiálu je nezbytné jej upravit. Balastní látky by mohly nevratně poškodit chromatografický systém nebo interferovat během analýzy.

Nejprve byla vyzkoušena na pracovišti ověřená metoda pro stanovení vitamínu A, E v séru, která byla pro účely tohoto experimentu trochu pozměněna [46]. Do zábrusové zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml moči, která byla následně naředěna chlazeným etanolem (0,5 ml) denaturovaným metanolem a po dobu 5 minut uložena do lednice (4°C). Poté bylo přidáno 2,5 ml hexanu a následovalo 5 minut třepání. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 1300 x g a 0°C). Po centrifugaci byl odebrán supernatant (2 ml) z horní hexanové vrstvy, který byl následně odpařen při 45°C a rozpuštěn v acetonitrilu (0,4 ml). Dle předpokladu kreatinin zůstal ve vodné fázi (spodní vrstvě) a retinol přešel do hexanové vrstvy. I tak se s touto metodou dále pracovalo, hlavně se spodní vrstvou obsahující kreatinin.

Byla vyzkoušena výše zmíněná extrakce bez přídavku etanolu denaturovaného metanolem. Po odebrání hexanové vrstvy byla spodní vrstva naředěna mobilní fází v poměru 1:1, znovu centrifugována a smíšena s odparkem. Tento postup také nebyl vhodný pro společnou extrakci retinolu a kreatininu z důvodu malé výtěžnosti a velkého množství balastních látek (Obrázek č. 23) .



Obrázek č. 23 Chromatogram 7

Extrakce BM

78% ACN (0,005 M FA) + 22% AMAC (10 mmol/l, pH 6,69), 0,5 ml/min, 3 μ l

Kinetex 2,6 μ m PFP 100A 100x4,6 mm

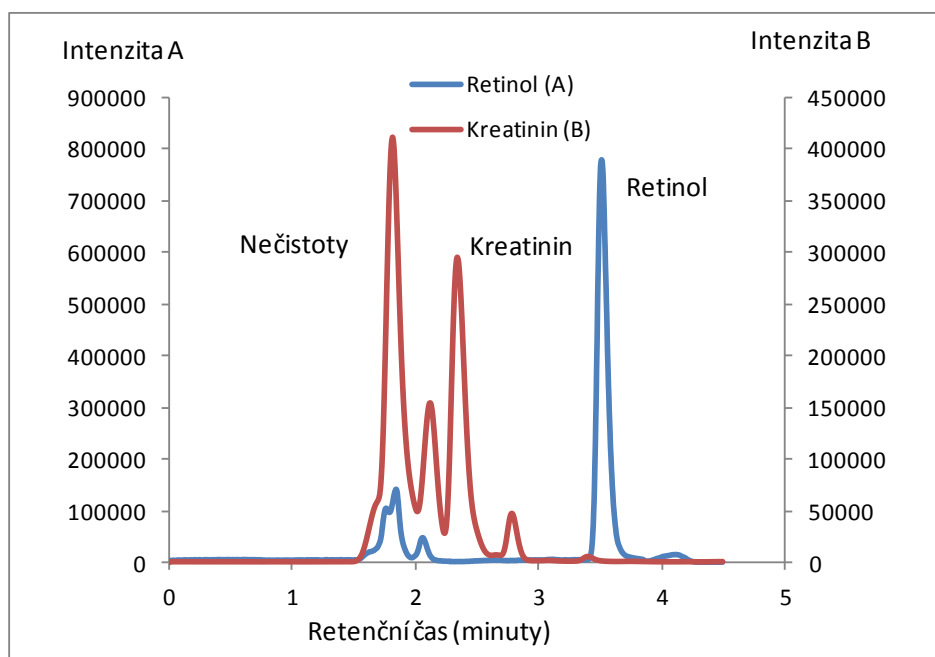
Dále bylo vyzkoušeno několik extrakčních postupů, kdy bylo smíšeno 200 μ l moči s vybranými organickými či anorganickými látkami, viz tabulka č. 7. Směs byla vložena na 5 minut do lednice. Následně byla centrifugována (15 min, 21380 x g, 4°C) a filtrována.

Tabulka č. 7: Testované extrakční podmínky

MOČ	PŘÍDAVEK
200 μ l	AMAC 200 μ l
200 μ l	methanol 200 μ l
200 μ l	ACN 200 μ l
200 μ l	ethanol absolute chlazený 200 μ l
200 μ l	4% ZnSO ₄ 50 μ l
200 μ l	4% ZnSO ₄ 50 μ l + 400 μ l metanolu
200 μ l	aceton 200 μ l
200 μ l	600 μ l ethanol absolute
200 μ l	150 μ l ethanol absolute + 50 μ l ACN
200 μ l	100 μ l ethanol absolute + 100 μ l ACN

Nejllepší výsledky byly dosaženy při extrakčním postupu, kdy bylo smíseno 200 μ l moči se 100 μ l ethanolu absolute a 100 μ l ACN LC-MS. Následně byla směs uložena na 5 minut do lednice a poté centrifugována (15 min, 21380xg., 4°C) a filtrována.

Jelikož byly pozorovány nečistoty v blízkosti píku kreatininu, byl vzorek moči během extrakčního postupu (před centrifugací) vložen do ultrazvukové lázně (10 min, 25°C). Část nečistot v blízkosti píku se pomocí lázně podařilo odstranit (Obrázek č. 24).



Obrázek č. 24 Chromatogram 8

Extrakce BM s ultrazvukovou lázní

78% ACN (0,005 M FA) + 22% AMAC (10 mmol/l, pH 6,69), 0,5 ml/min, 3 μ l

Kinetex 2,6 μ m PFP 100A 100x4,6 mm

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly optimalizovány detekční a separační podmínky pro stanovení retinolu a kreatininu. Byla vybrána vhodná stacionární fáze a složení mobilní fáze. Tyto podmínky slouží jako základ nové metody pro stanovení retinolu a kreatininu v moči.

Jako optimální podmínky pro stanovení byly zvoleny:

Analytická kolona	Kinetex 2,6 μ m PFP 100A 100x4,6 mm
Předkolona	Kinetex PFP 4,6 mm
Mobilní fáze	10 mM AMAC (pH 6,4) a ACN (0,005 M FA) v poměru 22:78
Průtok	0,5 ml/min
pH	6,69
Detekce	235 nm pro kreatinin, retinol dle MRM přechodů
Teplota	25°C
Nastříkovaný objem	3 μ l
Retenční čas	kreatinin 2,40 min, retinol 3,45 min

Metoda byla částečně validována. Byla ověřena opakovatelnost, stanoven limit detekce a kvantifikace a vypočítán zdánlivý počet teoretických pater, faktor symetrie a rozlišení píků. Byly testovány i úpravy biologického materiálu, na kterých se bude dále pracovat.

Stanovení retinolu v moči by mohlo být slibným parametrem v oblasti renálního poškození. Na metodě se dále pracuje a v budoucnu by mohla sloužit v klinickém výzkumu i praxi. Výhodou této metody je zařazení kreatininu pro korekci a zároveň společného stanovení. Stanovení z moči je přínosné i pro pacienty, kdy nedochází k jejich zátěži.

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] R. K. Murray, A. D. Bender, et al., *Harperova ilustrovaná biochemie*, 5.vydání. Praha: Galén, 2013.
- [2] T. Zima, *Laboratorní diagnostika*, 3. vydání, Praha: Galén, 2013.
- [3] “Retinol.” [Online]. Dostupné z:
<http://www.stabilis.org/Monographie.php?IdMolecule=867&codeLangue=CZ-cz>.
[Cit. 10-12-2017].
- [4] S. M. O’Byrne and W. S. Blaner, “Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology,” *J. Lipid Res.*, ročník 54, č. 7, str. 1731–1743, 2013.
- [5] M. Kanai, A. Raz, and D. S. Goodman, “Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma,” *J. Clin. Invest.*, ročník 47, č. 9, str. 2025–2044, 1968.
- [6] J. Racek, et al, *Klinická biochemie I*, 2. vydání. Praha: Galén, 2006.
- [7] M. Suchánková, “Využití stanovení hladin vitamínu A v klinické praxi,” Masarykova univerzita, 2011.
- [8] O. Schüick, V. Tesař, et al, *Klinická nefrologie*. Praha: Grada, 2006.
- [9] Š. Soukup, “Vylučovací soustava.” [Online]. Dostupné z:
<http://slideplayer.cz/slide/2487168/>. [Cit. 08-12-2017].
- [10] S. De, S. Kuwahara, and A. Saito, “The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells,” *Membranes (Basel)*., ročník 4, č. 3, str. 333–335, 2014.
- [11] A. M. Bernard, A. A. Vyskocil, P. Mahieu, and R. R. Lauwerys, “Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury.” *Clin. Chem.*, ročník 33, č. 6, str. 775–779, 1987.
- [12] V. Gavrilov, T. Yermiahu, and R. Gorodischer, “Renal pathology and retinol status in multiple myeloma patients,” *Kidney Int.*, ročník 69, č. 1, str. 173–177, 2006.
- [13] J. Raila, K. Wirth, F. Chen, U. Buscher, J. W. Dudenhausen, and F. J. Schweigert, “Excretion of vitamin A in urine of women during normal pregnancy and pregnancy complications.” *Ann. Nutr. Metab.*, ročník 48, č. 5, str. 357–64, 2004.
- [14] V. Gavrilov *et al.*, “Kidney function and retinol status in type 2 diabetes mellitus patients,” *Acta Diabetol.*, ročník 49, č. 2, str. 137–143, 2012.

- [15] C. B. Stephensen, J. O. Alvarez, J. Kohatsu, R. Hardmeier, J. I. Kennedy, and R. B. Gammon, "Vitamin A is excreted in the urine during acute infection," *Am. J. Clin. Nutr.*, ročník 60, č. 3, str. 388–392, 1994.
- [16] J. O. Alvarez, E. Salazar-Lindo, J. Kohatsu, P. Miranda, and C. B. Stephensen, "Urinary excretion of retinol in children with acute diarrhea," *Am. J. Clin. Nutr.*, ročník 61, č. 6, str. 1273–1276, 1995.
- [17] Mgr. Lenka Krčmová, "Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení biologicky aktivních látek v klinické praxi," Univerzita Karlova, 2010.
- [18] "Číselníky - Kreatinin." [Online]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJDJX.htm. [Cit. 15-12-2017].
- [19] L. Fialová and M. Vejražka, "Nebílkovinné dusíkaté látky," 2009. [Online]. Dostupné z: <https://el.lf1.cuni.cz/p45355481/>.
- [20] J. Homolka, Z. Kulenda and E. Bielik, *Klinická biochemie I*. Praha: Avicenum, 1984.
- [21] P. Kovaříková and J. Stariat, "Využití HPLC v analýze léčiv v biologickém materiálu, úprava vzorku."
- [22] J. Babjuk, F. Perlík, and Z. Šídlo, *Bioanalytika léků*. Praha: Avicenum, 1990.
- [23] S. Lakshmana and T. N. K. Suriyaprakash, "Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review," in *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*, InTech, 2012.
- [24] Bc. S. Klabačová, "Vývoj extrakčního postupu pro stanovení tokoferolů v lidském séru," Univerzita Karlova, 2016.
- [25] Cs. Ing. V. Marešová, "Principy řízených extrakcí tox z biologického materiálu pro různé typy toxikologických analýz," 2006.
- [26] J. Klimeš, et al., *Kontrola léčiv I.*, 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006.
- [27] L. Nováková, M. Douša, et al., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 1. vydání. Praha, 2013.
- [28] doc. PharmDr. H. Sklenářová, "Separační analytické metody," Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2017.
- [29] K. Kučerová, "Vývoj HPLC metody pro stanovení vankomy cinu v klinickém výzkumu," Univerzita Karlova, 2015.
- [30] P. Kovaříková and J. Stariat, "Rychlá chromatografie, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie," Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2016.

- [31] P. Kovaříková and J. Stariat, “HPLC- stacionární fáze a separační módy.” Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2016
- [32] “Chromservis.” [Online]. Dostupné z: www.chromservis.eu. [Cit. 12-1-2018].
- [33] Prof. RNDr. P. Solich, “Pokroky v kapalinové chromatografii,” Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2008.
- [34] “HPLC.” [Online]. Dostupné : <http://www.hplc.cz/>. [Cit. 20-2-2018].
- [35] “Phenomenex.” [Online]. Dostupné z: <http://phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>. [Cit. 28-1-2018].
- [36] J. Vacek, L. Onofrejová, B. Klejdus, and V. Kubáň, “Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek,” *Chem. List.*, č. 295, str. 381–385, 2009.
- [37] “HPLC columns.” [Online]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/sequant-zic-hilic-hplc-columns/wK6b.qB.PM0AAAE_R_Z3.Lxi,nav?ReferrerURL=http%3A%2F%2Fwww.sequant.com%2F. [Cit. 21-1-2018].
- [38] P. Kovaříková and J. Stariat, “HPLC-DETEKTORY,” Univerzita Karlova, Hradec Králové, str. 1–5, 2016.
- [39] D. Milde, “Hmotnostní spektrometrie,” Olomouc, 2010.
- [40] L. Ořapka, “UPLC-MS jako nový trend v separačních technikách – aplikace v analýze biologicky aktivních látek,” Univerzita Karlova, Hradec Králové 2008.
- [41] J. Poustka, “Hmotnostní spektrometrie - Mass Spectrometry (MS),” VŠCHT, Praha, 2007.
- [42] M. Holčapek, “Hmotnostní spektrometrie,” Univerzita Pardubice, Pardubice, 2010.
- [43] H. Kočová Vlčková RNDr., “Ambientní ionizační techniky.” [Online]. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5Chmotnostní+spektrometrie>. [Cit. 04-2-2018].
- [44] “Analyzátory v hmotnostní spektrometrii,” 2017. [Online]. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5Chmotnostní+spektrometrie>. [Cit. 03-1-2018].

- [45] “University of Bristol.” [Online]. Dostupné z:
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>. [Cit. 01-3-2018].
- [46] L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, I. Svobodová, and P. Solich, “Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection,” *Anal. Chim. Acta*, č. 573–574, str. 267–272, Jul. 2006.
- [47] J. Klimeš, et al., *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*, 1.vydání. Hradec Králové, 2011.
- [48] *Český lékopis*, 1. vydání 2009.