



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Anna Makrlíková

STANOVENÍ VYBRANÝCH KOMPONENT V LIDSKÉ MOČI  
ELEKTROFORÉZOU V KRÁTKÉ KAPILÁŘE

Determination of selected components in human urine with  
electrophoresis in short capillary

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. František Opekar, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

Praha 2015

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 27. dubna 2015.

Anna Makrlíková

## Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza má široké uplatnění v různých analýzách. V této práci byl navržen hydrodynamický způsob zavedení vzorku do krátké elektroforetické kapiláry řízený tlakovým pulsem. Separální pufr promývá dávkovací smyčku šesticestného ventilu a zóna vzorku je nesena k dávkovacímu konci kapiláry. V čase, kdy se zóna vzorku nachází u vstupu do kapiláry, je v toku elektrolytu generován krátký tlakový puls, což vede k nadávkování vzorku do kapiláry. Následně je tok elektrolytu zastaven a současně je zapnuto separální napětí. Množství nadávkovaného vzorku je závislé na době trvání tlakového pulsu.

Tato nově vyvinutá metoda byla testována pro stanovení amonných iontů, histidinu, kreatininu, kyseliny močové a kyseliny hippurové v lidské moči a pro rychlé sledování anorganických iontů v mozkomíšním moku a krevní plazmě. Stanovení bylo provedeno v kapiláře o celkové délce 10,5 cm a vyzkoušeny byly dva separální elektrolyty – 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10) a 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40). Použitím duální detekce, bezkontaktní vodivostní a spektrometrické UV detekce, bylo možno současně detegovat anorganické i organické látky ve vzorku.

## Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, krátká kapilára, hydrodynamické dávkování, duální detekce, amonné ionty, histidin, kreatinin, kyselina močová, kyselina hippurová, moč, mozkomíšní mok, krevní plazma

## Abstract

Capillary zone electrophoresis is frequently used in various analyses. In this diploma thesis a hydrodynamic sample introduction method controlled by pressure pulse has been proposed for short-capillary electrophoresis. The base electrolyte flushes sample from the loop of a six-way sampling valve and is carried to the injection end of the capillary. At the time when the sample zone reached the capillary, a short pressure impulse is generated in the electrolyte stream, which provides injection of the sample into the capillary. Then the electrolyte flow is stopped and the separation voltage is turned on. The amount of sample introduced to the capillary is controlled by the duration of the pressure pulse.

This new sample introduction method was tested in the determination of ammonia, histidine, creatinine, uric acid and hippuric acid in human urine and for rapid screening of the contents of the inorganic ions in cerebrospinal fluid and blood plasma. The determination was performed in a capillary with an overall length of 10,5 cm and two base electrolytes was tested – 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10) and 1 M acetic acid + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40). Using dual detection techniques contactless conductivity and UV spectrometric detection, anorganic and organic substances in the sample could be detected simultaneously.

## Key words

Capillary electrophoresis, Short capillary, Hydrodynamic injection, Dual detection, Ammonia ions, Histidine, Creatinine, Uric acid, Hippuric acid, Urine, Cerebrospinal fluid, Blood plasma

## Poděkování

Touto cestou děkuji prof. RNDr. Františku Opekarovi, CSc., vedoucímu této diplomové práce, za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a připomínky, trpělivost, ochotu a čas. Dále děkuji doc. RNDr. Ing. Petru Tůmovi, Ph.D., konzultantovi této diplomové práce, za nápady při optimalizování metody a za poskytnuté chemikálie a vzorky.

Mé rodině a příteli děkuji za velkou podporu.

Tato diplomová práce byla finančně podpořena Univerzitou Karlovou v Praze, projektem SVV 260205 a PRVOUK 31 a GAČR, grant 15-03139S.

# Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Cíl práce .....	10
2	Teoretická část .....	11
2.1	Kapilární elektromigrační metody.....	11
2.2	Kapilární zónová elektroforéza .....	11
2.2.1	Elektroforetická pohyblivost.....	12
2.2.2	Elektroosmotický tok.....	13
2.3	Způsoby dávkování vzorku v kapilární elektroforéze.....	14
2.3.1	Elektrokinetické dávkování.....	14
2.3.2	Hydrodynamické dávkování .....	14
2.4	Metody detekce v kapilární zónové elektroforéze .....	15
2.4.1	Fluorescenční detekce.....	15
2.4.2	Spektrofotometrická detekce.....	15
2.4.3	Nepřímá fotometrická detekce .....	15
2.4.4	Bezkontaktní vodivostní detekce.....	16
2.4.5	Duální detekce .....	16
2.5	Stanovení metabolitů v moči.....	16
2.5.1	Histidin.....	17
2.5.2	Kreatinin.....	17
2.5.3	Kyselina močová.....	18
2.5.4	Kyselina hippurová .....	18
2.5.5	Amoniak.....	18
2.6	Mozkomíšni mok a krevní plazma .....	19
2.7	Vyhodnocení výsledků .....	19
3	Experimentální část .....	20
3.1	Elektroforetická aparatura.....	20
3.2	Duální detekce .....	22
3.3	Chemikálie a roztoky.....	23
3.4	Pracovní postupy.....	24
3.4.1	Optimalizace hydrodynamického dávkování.....	24
3.4.2	Aplikace hydrodynamického dávkování na modelové vzorky .....	25
3.4.3	Stanovení vybraných komponent v moči .....	26

3.4.4	Analýza dalších biologických tekutin .....	27
4	Výsledky a diskuze.....	28
4.1	Výsledky optimalizace hydrodynamického dávkování .....	28
4.2	Aplikace optimalizovaného hydrodynamického dávkování na separaci modelových vzorků .....	36
4.3	Stanovení vybraných analytů v lidské moči.....	42
4.4	Analýza mozkomíšního moku a krevní plazmy.....	45
5	Závěr .....	48
6	Seznam použité literatury.....	49



## Seznam zkratek

BGE	Background Electrolyte (základní separační elektrolyt)
C <sup>4</sup> D	Capacitively Coupled Contactless Conductometric Detection (bezkontaktní vodivostní detekce)
CEC	Capillary Electrochromatography (elektrochromatografie v naplněných kapilárách)
CGE	Capillary Gel Electrophoresis (kapilární gelová elektroforéza)
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing (kapilární izoelektrické fokusování)
CITP	Capillary Isotachopheresis (kapilární izotachoforéza)
CoA	Coenzyme A (koenzym A)
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (kapilární zónová elektroforéza)
EOF	Electroosmotic Flow (elektroosmotický tok)
HIS	histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
LIF	Laser-Induced Fluorescence (laserem indukovaná fluorescence)
LOD	Limit of Detection (limit detekce)
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (micelární elektrokinetická kapilární chromatografie)
MES	kyselina 2-(N-morpholino)-ethansulfonová
PTFE	polytetrafluorethylen
RSD	Relative Standard Deviation (relativní směrodatná odchylka)
UV	Ultraviolet Light (ultrafialové záření)
VIS	Visible Light (viditelné záření)

## Seznam symbolů

$A$	úsek lineární kalibrační závislosti
$B$	směrnice lineární kalibrační závislosti
$c$	koncentrace analytu
$D$	vnitřní průměr kapiláry
$E$	intenzita elektrického pole
$L$	celková délka kapiláry
$n$	počet teoretických pater
$P$	tlak v aparatuře
$q$	zředovací koeficient
$Q$	celkový náboj
$r$	poloměr iontu
$R^2$	koeficient determinace
$t$	doba dávkování
$t_M$	migrační čas
$U$	separační napětí
$V$	objem nadávkovaného vzorku
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
$\eta$	viskozita
$\mu$	aktuální elektroforetická pohyblivost iontu
$v$	rychlost iontu

# 1 Úvod

V současné době se kladou velké nároky na rychlost a efektivnost analýz. Požadována je malá spotřeba činidel a tedy i nízká cena analýzy, se kterou souvisí i počet analyzovaných vzorků za jednotku času. V neposlední řadě musí být analýzy reprodukovatelné.

Kapilární elektroforéza je experimentálně jednoduchá účinná separační metoda, jejíž možnosti aplikace jsou velmi rozsáhlé. V komerčně dostupných aparaturách je doba analýzy přibližně 5 – 30 minut, proto jsou hledány způsoby zrychlení separací.

Jedním z možných způsobů je provedení separace ve specializované aparatuře s krátkou kapilárou. Kapilára se zkrátí z desítek centimetrů na jednotky centimetrů. Tato aparatura řeší i problém krátkých kapilár, a to, že se při experimentálních krocích (dávkování, promytí kapiláry) s kapilárou nemůže pohybovat. Pro analýzu je potřeba i měření při nižším separačním napětí, aby nedocházelo k tvorbě většího množství Jouleova tepla a odvod tepla mohl být zajišťován pouze vzduchem v okolí kapiláry. Příklad jednoho typu takové aparatury byl popsán v práci [1].

Ve zmíněné práci byla použita bezkontaktní vodivostní detekce (Capacitively Coupled Contactless Conductometric Detection, C<sup>4</sup>D). Při analýzách složitějších vzorků je zapotřebí detekce anorganických i organických iontů. Současná detekce obou druhů iontů je možná za použití duálního detektoru, tedy detektoru, který do jednoho místa spojuje dva detektory, kdy každý měří jinou vlastnost analyzovaného roztoku.

V této práci je pro separace modelových vzorků (moči, mozkomíšního moku a plazmy) použita aparatura s krátkou kapilárou s detektorem složeným z laboratorní bezkontaktní vodivostní cely, C<sup>4</sup>D, pro detekci anorganických látek a komerčně dostupné spektrofotometrické UV/VIS cely pro detekci organických látek.

## 1.1 Cíl práce

Optimalizovat hydrodynamické dávkování vzorku do krátké kapiláry v laboratorně sestavené aparatuře pro elektroforézu s bezkontaktní vodivostní a spektrofotometrickou detekcí a použít aparaturu pro separaci a stanovení vybraných komponent v biologických tekutinách.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kapilární elektromigrační metody

Princip elektroforézy spočívá v oddělování látek elektrickou migrací. Ionizované nebo alespoň vysoce polární látky se pohybují v roztoku nosného elektrolytu vlivem elektrického pole přiváděného z externího zdroje. Rychlost pohybu látek závisí na jejich molekulové hmotnosti, náboji a na viskózním odporu nosného elektrolytu.

Velmi často užívanou formou elektroforézy je kapilární zónová elektroforéza. Stává se široce používanou v analytických i biologických laboratořích, především pro malou spotřebu vzorků a umožňující oddělení látek i ve složitých matricích [2].

Vlastní separace se provádí v křemenných kapilárách o vnitřním průměru od 10 do 100  $\mu\text{m}$ .

Výhoda elektromigračních metod spočívá v malé spotřebě vzorku a činidel nutných pro separaci, velké separační účinnosti a rychlosti analýzy. Experimentální jednoduchost metod umožňuje rychlou optimalizaci separačních podmínek. Nevýhodou těchto separačních technik je menší opakovatelnost měření, především opakovatelnost migračních časů.

Podle media v separační kapiláře a podle mechanismu separace lze kapilární elektromigrační metody rozdělit do šesti variant [3]:

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE, Capillary Zone Electrophoresis)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE, Capillary Gel Electrophoresis)
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC, Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography)
- Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CEC, Capillary Electrochromatography)
- Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, Capillary Isoelectric Focusing)
- Kapilární izotachoforéza (CITP, Capillary Isotachophoresis)

### 2.2 Kapilární zónová elektroforéza

Nejpoužívanější a nejjednodušší elektromigrační technikou z výše uvedených je kapilární zónová elektroforéza. Separace probíhá v kapiláře v prostředí základního elektrolytu (BGE, background electrolyte). Kapilární zónovou elektroforézou lze stanovit anorganické i organické látky, jejichž molekuly mohou nést záporný náboj

v důsledku disociace (např. chloridy, dusičnany, fenoly, sacharidy) nebo kladný náboj v důsledku disociace nebo protonizace (např. sodné, draselné a vápenaté ionty, aminokyseliny).

V kapilárních elektromigračních metodách se uplatňují dva transportní jevy, elektroforetická migrace a elektroosmotický tok (EOF).

Separovat a stanovit lze ionty, které se liší svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Molekuly s nábojem se dělí podle svých rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit). Na separaci se podílí elektroosmotický tok separačního pufru uvnitř kapiláry, který unáší ionty k detektoru, v případě neupraveného povrchu křemenné kapiláry kladně nabitě ionty ke katodě, a ty migrují svými rozdílnými mobilitami uvnitř separačního pufru. Pokud anionty migrují k anodě menší rychlostí než EOF, lze současně dělit a detegovat anionty i kationty, ale nelze separovat neutrální molekuly. Elektroosmotický tok lze upravovat vhodnými modifikátory, EOF lze zastavit nebo dokonce jeho směr obrátit. Separace se provádějí v kapiláře z taveného křemene potažené vrstvou polyimidu, který zvyšuje pružnost kapiláry a brání zlomení kapiláry při manipulaci s ní [3].

### 2.2.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetickou migrací iontů se rozumí pohyb iontů v elektrickém poli. Dochází k elektrostatickému přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě. Kation je obklopený molekulami vody a pohybuje se konstantní rychlostí ke katodě, anion je přitahován k anodě. Nabitá částice je bržděna frikční silou prostředí. Tato síla je v ustáleném stavu rovna hnací síle a platí rovnice:

$$QE = 6\pi\eta rv, \quad (2-1)$$

kde  $Q$  je celkový náboj iontu [C],  $E$  [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ] intenzita elektrického pole,  $\eta$  viskozita okolního prostředí [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ],  $r$  poloměr iontu [m] a  $v$  [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ] rychlost iontu.

Podíl napětí  $U$  [V] vloženého na elektrody a délky kapiláry  $L$  [m] se rovná intenzitě elektrického pole  $E$  v separační kapiláře:

$$E = U/L \quad (2-2)$$

Ionty se v homogenním elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí k elektrodě s opačným nábojem, která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a pohyblivosti daného iontu  $\mu$  [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]:

$$v = \mu \cdot E \quad (2-3)$$

Ionty různě velkých poloměrů a různých nábojů vykazují v homogenním elektrickém poli různé elektroforetické pohyblivosti, které se dají vypočítat podle vzorce:

$$\mu = Q / 6\pi\eta r \quad (2-4)$$

Elektroforetické pohyblivosti a rychlosti iontů závisí na charakteru analyzované látky a jsou tudíž kvalitativní informací o analytu, u kationtů jsou kladné a u aniontů záporné [3, 4].

### 2.2.2 Elektroosmotický tok

Druhým transportním jevem v kapilárních elektromigračních metodách je elektroosmotický tok. Když se kapilára naplní základním elektrolytem, na vnitřní stěně kapiláry dochází k hydrolyze siloxanových skupin ( $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ) a vznikají silanolové skupiny ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ). Silanolové skupiny disociují a vnitřní povrch křemenné kapiláry se pokryje křemičitanovými skupinami ( $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$ ). Vnitřní povrch kapiláry je tak nabitý záporně a přitahuje z roztoku kationty. Na vnitřní stěně kapiláry se vytvoří elektrická dvojvrstva. Elektroosmotický tok vzniká působením elektrického pole, kdy se hydratované kationty v elektrické dvojvrstvě pohybují směrem ke katodě a s sebou strhávají roztok uvnitř kapiláry.

Elektroosmotický tok je závislý na pH základního elektrolytu uvnitř kapiláry. Čím je pH vyšší, tím je větší negativní náboj na vnitřní stěně kapiláry a EOF rychlejší. Použitím pufru o nižší koncentraci je možno elektroosmotický tok zrychlit.

Plochý profil toku v kapalině tekoucí působením EOF (na rozdíl od kapalinové chromatografie s parabolickým profilem toku kapaliny) vede k velmi malému rozmývání zón separovaných látek a výsledné píky jsou užší než v HPLC a v porovnání s kapalinovou chromatografií má kapilární elektroforéza větší separační účinnost.

Příznivý vliv plochého profilu toku na separační účinnost je částečně narušován tepelnými efekty v kapiláře během separace a tím klesá separační účinnost. Po vložení elektrického napětí na elektrody vzniká tzv. Jouleovo teplo (přeměněný elektrický výkon), které je nutno odvádět. Kapilára je chlazena pouze okolním vzduchem nebo je umístěna v termostatovaném prostředí. Více Joulova tepla se generuje při použití vodivějšího separačního pufru a kapiláry s větším průměrem [3, 4].

## **2.3 Způsoby dávkování vzorku v kapilární elektroforéze**

Pro správně provedenou analýzu pomocí kapilární elektroforézy je třeba věnovat pozornost dávkování vzorku do kapiláry. Aby byla zachována separační účinnost, je nutno do kapiláry dávkovat přesně definované malé objemy vzorku (jednotky nl) a dávkovat co nejreprodukovatelněji. [5]. Zóna nadávkovaného vzorku v kapiláře by neměla být delší než asi 1 % celkové délky kapiláry.

### **2.3.1 Elektrokinetické dávkování**

Elektrokinetické dávkování probíhá, pokud je na elektroforetické elektrody vloženo elektrické napětí. Toto dávkování má diskriminační charakter, jelikož nadávkované množství vzorku závisí nejen na velikosti vloženého napětí a době dávkování, ale i na elektroforetické pohyblivosti iontů. Proto jsou zvýhodněny ty ionty, které mají větší elektroforetickou pohyblivost. Podle polarit vloženo napětí lze dávkovat kationty nebo anionty. Při dávkování kationtů, migrují kationty směrem do kapiláry a anionty migrují z kapiláry do nádoby se vzorkem. Při dávkování aniontů je tomu naopak. Nadávkované množství aniontů a kationtů do kapiláry proto neodpovídá zcela jejich zastoupení v nádobce se vzorkem, a proto se dává přednost hydrodynamickému dávkování.

Elektrokinetické dávkování se využívá v elektrochromatografii v naplněných kapilárách a v kapilární gelové elektroforéze spolu s metodou vnitřního standardu [3, 5]. Je rovněž základní dávkovací metodou v elektroforéze na čipu [6].

### **2.3.2 Hydrodynamické dávkování**

Při hydrodynamickém dávkování má nadávkovaný vzorek do kapiláry stejné složení jako vzorek v nádobce. V laboratorních aparaturách je vzorek dávkován ručně. Na dávkovacím konci kapiláry je vialka se separačním pufrem vyměněna za vialku s roztokem. Tato vialka se s ponořeným dávkovacím koncem kapiláry zvedne do určité výšky a na určitou dobu, poté je dávkovací konec kapiláry vrácen do původní polohy a vialka je nahrazena vialkou se separačním pufrem. V komerčních aparaturách je při dávkování vzorku tlak působící na hladinu roztoku v dávkovací nádobce přesně řízen po určitou dobu. Nadávkovaný objem vzorku je přímo úměrný velikosti přetlaku a době dávkování [3, 5].

## **2.4 Metody detekce v kapilární zónové elektroforéze**

Vzhledem k malému objemu nadávkovaného vzorku je nutno použít citlivé detektory, které jsou schopny tak malé množství detegovat.

### **2.4.1 Fluorescenční detekce**

Nejcitlivějším detektorem ve spojení s kapilární elektroforézou je laserem indukovaná fluorescence (LIF). Analyty jsou budícím zářením (laserem o vhodné vlnové délce procházejícího kapilárou) uvedeny do vzbuzeného (excitačního) stavu a následně za uvolnění energie přecházejí do klidového stavu. Energie ve formě fotonů je měřena. Určitou experimentální nevýhodou LIF je, že většinou je nutno analyty derivatizovat, tj. začlenit do jejich struktury fluorofor. K tomuto účelu se používají různá derivatizační činidla [7].

### **2.4.2 Spektrofotometrická detekce**

Pro analyty obsahující chromofory je nejpoužívanější detekcí v kapilární elektroforéze spektrofotometrická UV/VIS detekce. Principem metody je nalezení vhodné vlnové délky světelného paprsku, při níž analyzované látky absorbují záření mnohem více než separační elektrolyt. Světelný paprsek prochází optickým okénkem kapiláry a měří se absorbance roztoku v separační kapiláře. Vysoká absorbance analytu proti absorbanci základního elektrolytu se v elektroferogramu projeví jako kladný pík. Fotometrická detekce je běžná u komerčně dostupných zařízení, její citlivost je ale menší než u bezkontaktní vodivostní detekce [3, 8].

### **2.4.3 Nepřímá fotometrická detekce**

Pro získání signálu UV/VIS detektorem analytů, které v této oblasti neabsorbují, je zapotřebí do základního elektrolytu přidání silně absorbujícího iontu se stejným nábojem, jako má separovaný analyt. Dochází k vytěsnění silně absorbujících ko-iontů neabsorbujícími analyty. Průchod této zóny detektorem zapříčiní snížení odezvy detektoru a projeví se tzv. dipem (záporným píkem). Pro nepřímou fotometrickou detekci se používá málo koncentrovaný základní separační elektrolyt, proto je tato detekce nevhodná pro stanovení analytů v biologických tekutinách, které obsahují velké množství anorganických solí [8, 9].



#### **2.4.4 Bezkontaktní vodivostní detekce**

Vodivostní detekcí je měřena elektrická vodivost roztoku. Bezkontaktní vodivostní elektrody jsou umístěny na vnějším povrchu kapiláry a nejsou v kontaktu s roztokem přítomným v kapiláře. Na jednu elektrodu (vysílací elektroda) je přiváděn střídavý signál z generátoru a prochází přes stěnu kapiláry, která slouží jako izolant. Signál je v detekční mezeře mezi elektrodami ovlivněn vodivostí roztoku a snímán druhou přijímací elektrodou. U bezkontaktní vodivostní detekce elektrody nejsou v kontaktu s analyzovaným roztokem, proto na nich nedochází k nežádoucím interakcím mezi roztokem a elektrodou (např. adsorpci látek na elektrodu) [3, 10].

Bezkontaktní vodivostní detekcí se stanovují malé anorganické ionty a organické látky, které neabsorbují UV záření, sacharidy, aminokyseliny [3, 8], biologicky významné látky jako kreatin a fosfokreatin [11] a například i sacharidy v energetických nápojích [12].

Význam bezkontaktní vodivostní detekce v kapilární elektroforéze je značný, elektroforetické stanovení analytů s touto detekcí je diskutováno v několika přehledových člancích, např. [13-15].

#### **2.4.5 Duální detekce**

Kapilární elektroforéza se uplatňuje i v medicínských oborech, kde je zapotřebí analyzovat látky ve složité matici (tělní tekutiny). Pro zrychlení a zlevnění analýz je výhodná detekce jak anorganických, tak i organických iontů zároveň při jedné separaci, což je umožněno duálním detektorem. Výhodná je kombinace  $C^4D$  s UV/VIS detekcí, protože každý z detekčních systémů využívá jiné vlastnosti detegovaných látek a k optické detekci dochází mezi elektrodami vodivostního detektoru. Látky jsou tak detegovány v jednom místě kapiláry [16]. Spojení kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí a UV spektrofotometrickou detekcí bylo např. v práci [17] použito na analýzu směsi 29 organických kyselin v moči.

### **2.5 Stanovení metabolitů v moči**

Pro měření fyziologických a patofyziologických podmínek v lidském těle se, mimo jiné, stanovují metabolity v moči. Vylučování moči ledvinami slouží k odstraňování odpadních molekul z krve a k udržení homeostázy v těle. Z anorganických látek jsou v moči nejvíce zastoupeny kationty amonné, sodné, draselné, vápenaté, hořečnaté a anionty chloridové, hydrogenuhličitanové, fosfátové

a sulfátové. Z dusíkatých látek pak močovina a její soli, kreatinin, kreatin, amoniak a některé aminokyseliny. Při patologických změnách se v moči můžou vyskytovat proteiny, sacharidy a lipidy. Dále jsou v moči morfologické součásti (buněčné elementy, mikroby, krystaly) [18].

Komplexní informace o chemickém složení moči lze nalézt v práci [19].

Komponenty moči lze stanovit kolorimetrickými, enzymatickými, chromatografickými (např. kapalinová chromatografie) a elektroforetickými (např. jednorozměrná gelová elektroforéza) technikami. Tyto metody jsou jednoduché, ale ve srovnání s kapilární elektroforézou mají určité nevýhody. Kapilární elektroforéza má větší citlivost, je zapotřebí menší množství vzorku a v mnoha případech ho není třeba před vlastní analýzou nijak upravovat, pouze přefiltrovat a dle potřeby naředit. Kapilární elektroforéza se tak stává důležitým diagnostickým nástrojem pro identifikaci a kvantifikaci metabolitů v moči, pro objevování markerů různých nemocí i pro klinické výzkumy [20, 21].

Látky v moči stanovované v této práci jsou histidin, kreatinin, kyselina močová a hippurová. Z anorganických látek jsou to amonné ionty.

### **2.5.1 Histidin**

Histidin je esenciální proteinogenní aminokyselina. Je hlavní bazickou aminokyselinou v moči. Díky heterocyklickému dusíku v imidazolové postranní skupině hraje důležitou roli v mnoha biologických systémech, například při kontrole transportu kovů v biologicky významných bázích. Přetrvávající nedostatek histidinu může způsobit Friedreichovu ataxii, epilepsii, Parkinsonovu chorobu a nedostatečnou tvorbu krvinek. Zvýšená hladina histidinu ve fyziologických tekutinách (sérum, moč) způsobuje metabolické poruchy. Rychlá a selektivní detekce histidinu je ve farmaceutickém výzkumu a klinické léčbě nezbytná. Kromě kapilární elektroforézy lze histidin detegovat kapalinovou chromatografií, elektrochemicky, kolorimetricky, spektrofluorimetricky a pomocí fluorescenčních biosenzorů [22].

V moči se vyskytují i dva deriváty histidinu neméně důležité pro klinickou praxi, 1-methylhistidin a 3-methylhistidin. Důležitost stanovení a význam těchto derivátů lze nalézt v pracích [23, 24].

### **2.5.2 Kreatinin**

Kreatinin je produkt rozpadu kreatinfosfátu ve svalech, z krve je odstraňován ledvinami a vylučován močí. Za normálních podmínek je poměr produkce a exkrece

kreatininu konstantní a je tak zachován rovnovážný stav. Pokud dojde k poruše ledvin, schopnost ledvin vylučovat odpadní látky se sníží, a tím se sníží i glomerulární filtrace a plazmatická koncentrace kreatininu se tím zvýší. Vyšší koncentrace kreatininu v plazmě je i po úrazech svalů, při vysokém příjmu proteinů v potravě apod. Nižší koncentrace kreatininu v plazmě je např. při svalových atrofiích a dystrofiích. Stanovení kreatininu v moči (např. pomocí HPLC) se využívá pro posouzení stavu výživy, správnosti renální funkce a jako standard látek vylučovaných močí vzhledem k objemu moči [18, 25].

### **2.5.3 Kyselina močová**

Konečným produktem metabolismu purinů je kyselina močová, je vylučována především ledvinami. Vysoké sérové a plazmatické koncentrace představují silný rizikový faktor pro rozvoj dny. Stanovení koncentrací kyseliny močové je důležité pro odhad rizika rozvoje dnové artritidy, pro sledování pacientů léčených léky snižující hladinu kyseliny močové v séru a také pro určení přesného důvodu hyperurikémie. Pro stanovení koncentrace kyseliny močové v biologických vzorcích se využívá hmotnostní spektrometrie, HPLC, kolorimetrie, dále enzymatických, amperometrických a voltametrických metod a v neposlední řadě kapilární elektroforézy s UV detekcí [26].

### **2.5.4 Kyselina hippurová**

V moči se vyskytuje i další organická kyselina, kyselina hippurová. Je biosyntetizována z glycinu, kyseliny benzoové a CoA enzymy lokalizovanými v mitochondriálním matrixu jaterních a ledvinových buněk. Tato metabolická dráha poskytuje alternativní tok dusíku od obvyklých prekurzorů močoviny na glycin a je využívána pro detoxikaci aromatických sloučenin, například toluenu. Kromě kapilární elektroforézy ji lze stanovit pomocí HPLC, plynovou chromatografií, vodíkovou nukleární magnetickou rezonancí a micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií [27].

### **2.5.5 Amoniak**

Amoniak spolu s kreatininem a močovinou jsou hlavními odpadními látkami lidského metabolismu proteinů a jsou z těla vylučovány močí. Amoniak je slabá báze a jeho soli, amonné ionty, lze kapilární elektroforézou stanovit, ale ve směsi s draselnými ionty je od nich nelze rozdělit, jelikož migrují stejnou rychlostí. Pokud se

do základního elektrolytu přidá crown ether (18-crown-6), vytvoří s draselnými ionty komplex a tím je umožněno oddělení iontů amonných od iontů draselných. Nejčastěji je stanovení amoniaku prováděno enzymatickými metodami [28].

## 2.6 Mozkomíšní mok a krevní plazma

Kromě separace látek v moči byly orientačně separovány látky v dalších biologických tekutinách, v mozkomíšním moku a krevním plazmě.

Mozkomíšního moku tělo vyprodukuje asi 500 ml denně. Obsahuje řadu anorganických iontů,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{HCO}_3^-$  [18]. Monitorováním mozkomíšního moku lze odhalit některé neurodegenerativní choroby, Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu [29].

Plazma a sérum jsou nejčastěji vyšetřované tekutiny v klinické biochemii a laboratorní medicíně. Pro vyšetření plazmy je nutné do krve přidat protisrážlivé činidlo, pro vyšetření séra nikoliv. Plazma je nekorpuskulární žlutá tekutina, extracelulární a intravaskulární. Krev tvoří 8 % z celkové hmotnosti člověka, z toho je plazma 5 %. Sérum je bez fibrinogenu a pevných přirozených součástí po procesu srážení in vitro. Ionty se vyskytují ve vodné fázi plazmy, která obsahuje i proteiny a lipidy [18].

## 2.7 Vyhodnocení výsledků

Ke stanovení sledovaných komponent byla použita metoda standardního přídatku. Měření bylo provedeno vždy několikrát a za výsledek byla považována střední hodnota (medián). Přesnost byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou a intervalem spolehlivosti [5].

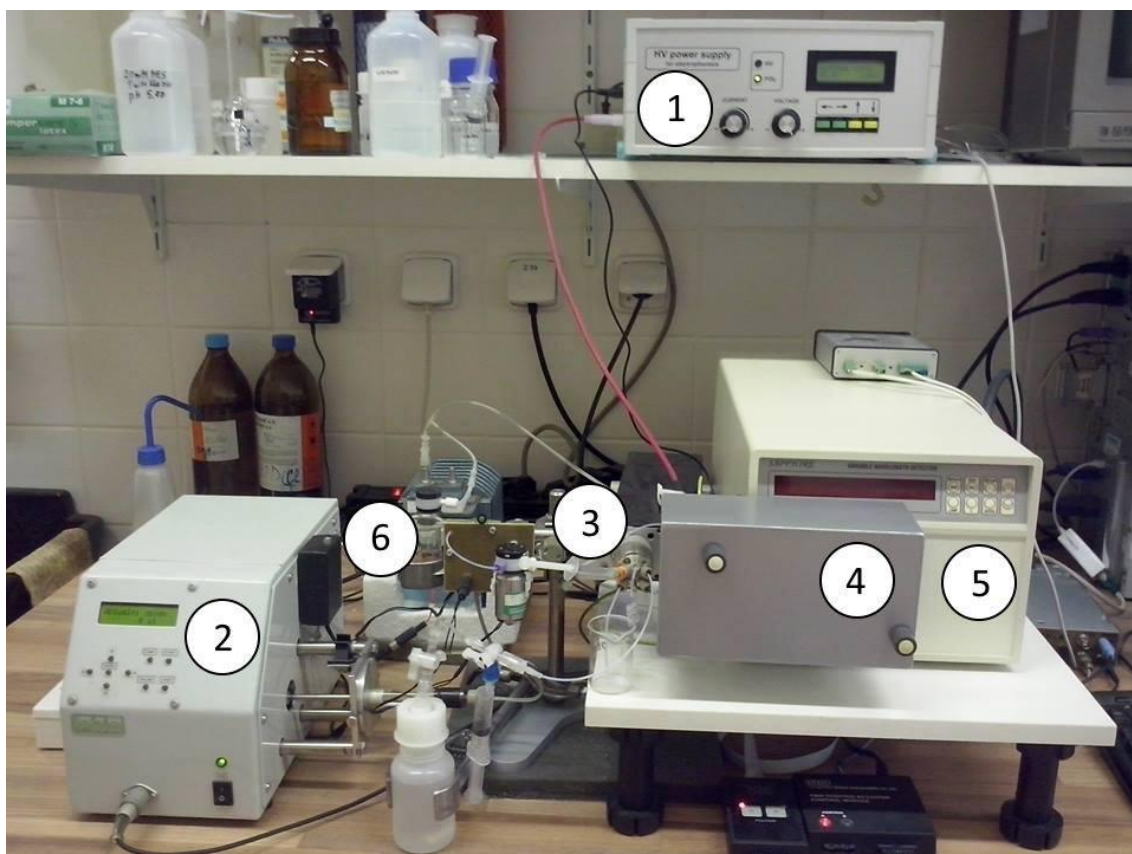
Výsledky byly vyhodnoceny a koncentrace jednotlivých komponent byla počítána ze vztahu:

$$c(x) = (A / B) \cdot q, \quad (2-5)$$

kde  $c(x)$  je koncentrace komponenty,  $A$  je úsek a  $B$  směrnice lineární kalibrační závislosti a  $q$  je zředovací koeficient.

### 3 Experimentální část

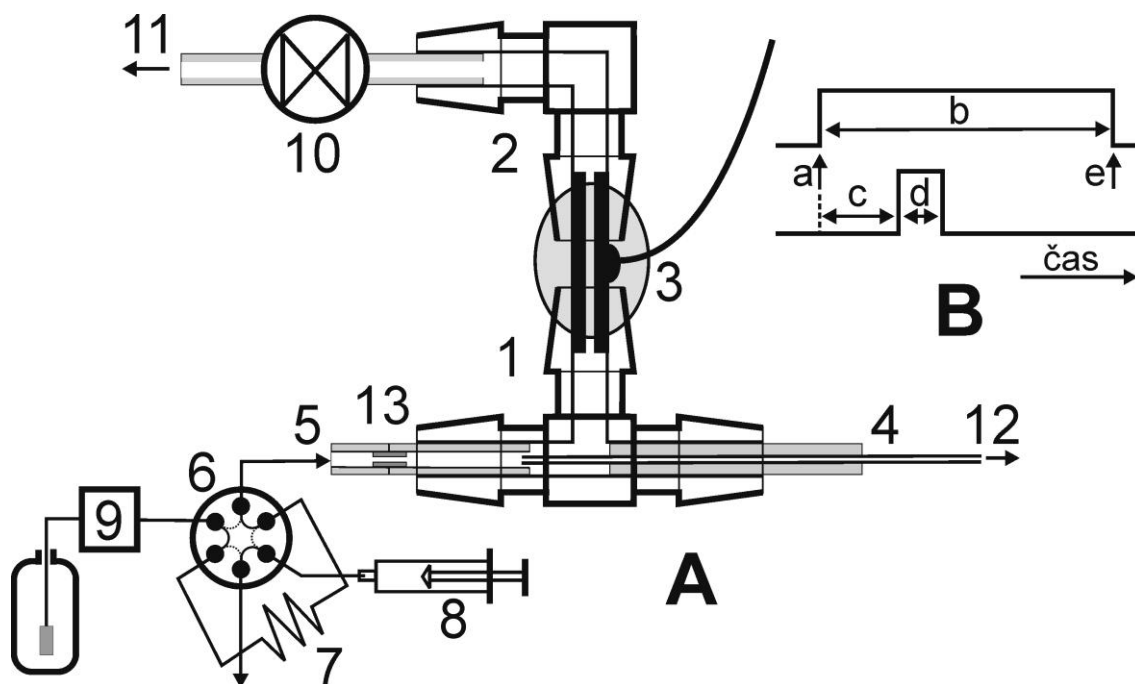
Elektroforetická aparatura je složena z dávkovací části, křemenné kapiláry, duálního C<sup>4</sup>D/UV detektoru a koncové nádobky s vysokonapěťovou elektrodou; celkový pohled na aparaturu je na obr. 1.



Obr. 1: Celkový pohled na používanou aparaturu s krátkou separační kapilárou a duálním detektorem. 1 – zdroj vysokého napětí, 2 – lineární pumpa, 3 – šesticestný dávkovací ventil, 4 – separační a detekční část pod krytem (viz obr. 3), 5 – spektrofotometrický detektor, 6 – odpadní nádobka.

#### 3.1 Elektroforetická aparatura

Experimenty byly prováděny na laboratorně sestavené elektroforetické aparatuře blíže popsané v práci [1]. Oproti popsané aparatuře byly provedeny některé úpravy. Dávkovací část byla změněna (detaily popsány níže). Namísto dávkovacího ventilu C102M (Labio, ČR) byl použit elektromagneticky ovládaný dávkovací ventil VALCO (VICI Valco Instruments). Dále byl použit dvoukanálový AD převodník ORCA 2000 (Ecom, ČR) místo jednonálového převodníku Panther 1000 (Ecom, ČR).



Obr. 2: A) Schéma dávkovací části elektroforetické aparatury a za B) schéma časového programu dávkovací sekvence.

(A): 1,2 – dávkovací nádobka složená z plastových T a L dílů používaných pro spojování hadiček malých průměrů, 3 – zemnicí elektroda vysokonapěťového zdroje, 4 – separační kapilára těsně zasunutá do 1/16" *od* × 0,01" *id* PTFE trubičky, 5 – PTFE trubička 1/16" *od* × 0,031" *id*, 6 – šesticestný dávkovací ventil, 7 – dávkovací smyčka o objemu 43  $\mu$ l, 8 – plnění smyčky pomocí injekční stříkačky, 9 – lineární pumpa pumpující po dobu dávkování základní elektrolyt, 10 – uzavírací ventil, 11 – odpad, 12 – pokračování kapiláry k detektoru a koncové nádobce.

(B): a – iniciace dávkování, b – doba zapnutí lineární pumpy, c – zpoždění aktivace uzavíracího ventilu, d – doba uzavření uzavíracího ventilu, tj. doba dávkování vzorku do kapiláry, e – zapnutí vysokonapěťového zdroje a zahájení separace.

Schéma dávkovací části aparatury je na obr. 2. Na její sestavení byly použity komerčně dostupné plastové díly pro spojování hadiček malých průměrů (1, 2). Jako elektroforetická zemnicí elektroda byla použita nerezová trubička dlouhá 10 mm (3). Plastové díly (1, 2) jsou ve stabilní poloze fixovány tavným lepidlem, které slouží rovněž jako izolace elektrody. Tuto část dávkovací aparatury lze považovat za dávkovací nádobku. Separační kapilára (4) je těsně vsunuta do pomocné PTFE trubičky, která zajišťuje její pevnou polohu v dávkovací aparatuře. Dávkovací konec separační

kapiláry je volně vsunut do hloubky asi 1 mm do přívodní PTFE trubičky (5). Trubičkou (5) protéká nosný elektrolyt se zónou vzorku z dávkovacího šesticestného ventilu (6). Roztok protéká kolem dávkovacího konce kapiláry a dále protéká aparaturou k výstupu (11) a před výstupem prochází uzavíracím ventilem (10). Uzavřením tohoto ventilu se v aparatuře vytváří tlakový puls, jímž je vzorek nadávkován do separační kapiláry. Výstupní konec kapiláry je umístěn v plastové koncové nádobce, v níž je vysokonapěťová elektroda zdroje (na obr. 2 tato část aparatury není zakreslena).

Postup dávkování je následující, viz obr. 2B. Zapnutím lineární pumpy (9) (Labio, ČR) pumpující nosný elektrolyt ze zásobníku a současným přepnutím dávkovacího ventilu (6) z polohy „load“ (plnění dávkovací smyčky) do polohy „inject“ (nadávkování vzorku) je zahájeno dávkování, bod (a) na obr. 2B. Po určité době se zóna vzorku dostane nosným elektrolytem k dávkovacímu konci kapiláry, čas (c). Jakmile se tak stane, je na určitou dobu, čas (d), aktivován uzavírací ventil a vzorek je nadávkován do kapiláry. Lineární pumpa je aktivní tak dlouho, čas (b), aby se zóna vzorku dostala dostatečně daleko od dávkovacího konce kapiláry. Poté je tok nosného elektrolytu zastaven a zapnutím vysokého napětí, bod (e), je zahájena separace. Separační napětí bylo 5 kV.

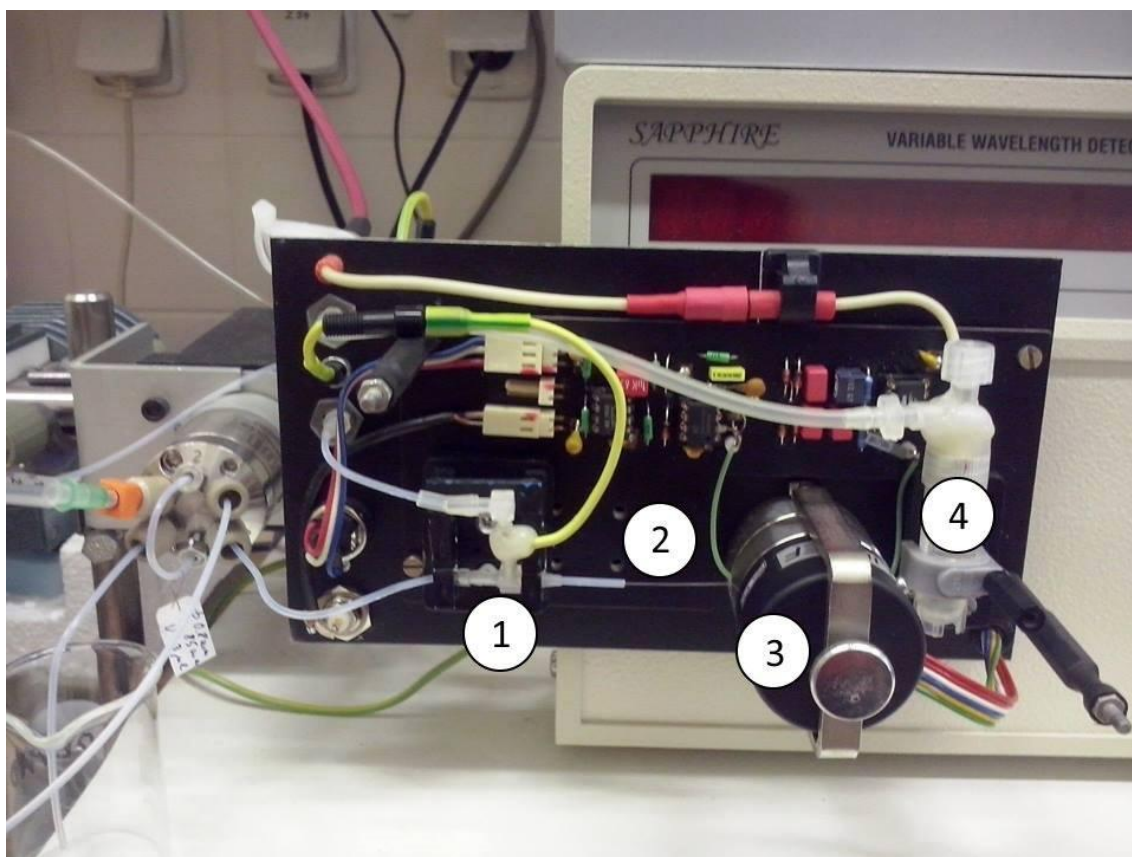
K měření byla použita separační kapilára potažená polyimidem o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , vnějším průměru 363  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10,5 cm a délce k detektoru 8 cm.

Činnost jednotlivých částí aparatury byla řízena programem vytvořeným v prostředí LabView (National Instruments, USA), registrace elektroferogramů probíhala v programu ECOMAC (Ecom, ČR) a jejich vyhodnocení v programu CSW 1.7 (Data Apex), Microsoft Excel a Origin 6.0.

### **3.2 Duální detekce**

Pro detekci při elektroforetické separaci v krátké kapiláře byl použit upravený komerčně dostupný spektrofotometrický detektor Sapphire (Ecom, ČR). Záření od monochromátoru ve spektrofotometrickém detektoru je vedeno světlovodným vláknem ke kapiláře mezi dvě semitubulární elektrody bezkontaktního vodivostního detektoru vystřižené ze samolepící měděné fólie o tloušťce 35  $\mu\text{m}$  (ELCHEMCo, ČR). Elektrody jsou široké 1,7 mm a vzdáleny od sebe 0,85 mm. Vytvořené průhledné okénko v separační kapiláře je umístěno mezi těmito dvěma elektrodami. Kapilára je

k elektrodám a světlovodnému vláknu přitlačována plexisklovou destičkou. Otvorem v přitlačné plexisklové destičce o průměru 2 mm dopadá záření prošlé kapilárou na velkoplošnou fotodiodu, z ní je signál veden kabelem ke zpracování do komerčního detektoru. Separační kapilára, dávkovací a koncová nádobka, elektronické součásti bezkontaktního vodivostního detektoru a světlovodná vlákna jsou umístěny pod opticky a elektrostaticky stínícím krytem, viz obr. 3. UV detektor měřil při vlnové délce 214 nm, vodivostní  $C^4D$  detektor měřil při sinusovém signálu o frekvenci 450 kHz a amplitudě  $\pm 17$  V.



Obr. 3: Separační a detekční část aparatury s duální detekcí po odstranění krytu (označen číslem 4 na obr. 1). 1 – dávkovací nádobka, 2 – separační kapilára, 3 – optická část – velkoplošná dioda, 4 – koncová nádobka s vysokonapěťovou elektrodou.

### 3.3 Chemikálie a roztoky

Všechny měřené roztoky byly připravovány s použitím deionizované vody (Milli-Q Plus, Millipore, USA) a uchovávány v chladničce.

KCl, NaCl, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, LiCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl (Merck)

MES (kyselina 2-(N-morpholino)-ethansulfonová), (>99%, Merck)



Kyselina octová (>99,0%, Fluka)

NaOH ( $\geq$ 98%, Sigma-Aldrich)

18-crown-6 ( $\geq$ 99%, Sigma-Aldrich)

L-histidin (>99%, MERCK)

Kreatinin ( $\geq$ 98%, Sigma-Aldrich)

Kyselina močová ( $\geq$ 99%, Sigma-Aldrich)

Kyselina hippurová ( $\geq$ 99%, Sigma-Aldrich)

Acetonitril (Sigma-Aldrich)

Základní separační pufr: 20 mM MES + 5 mM NaOH, pH 5,80

50 mM MES + 5 mM NaOH, pH 5,10

1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6, pH 2,40

Biologické vzorky: ranní moč, mozkomíšni mok, plazma (vzorky moku a plazmy byly získány z III. lékařské fakulty).

### 3.4 Pracovní postupy

#### 3.4.1 Optimalizace hydrodynamického dávkování

Optimalizace parametrů hydrodynamického dávkování probíhala s modelovým roztokem  $K^+$  a histidinu o koncentraci 50  $\mu$ M obou složek (směs malého anorganického iontu a velkého organického iontu). Pro separaci byl použit pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH o pH 5,80. Separací napětí bylo 5 kV, proud byl 3  $\mu$ A. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty. Při těchto měřeních byl k detekci použit jen bezkontaktní vodivostní detektor.

Před začátkem měření byla křemenná kapilára aktivována po dobu 10 min 0,1 M NaOH, poté promyta vodou (10 min) a nakonec pufr (5 min). Pufr naplněná kapilára zůstala pro ustálení odezvy detektoru při spuštěném vysokém napětí 10 min v klidu.

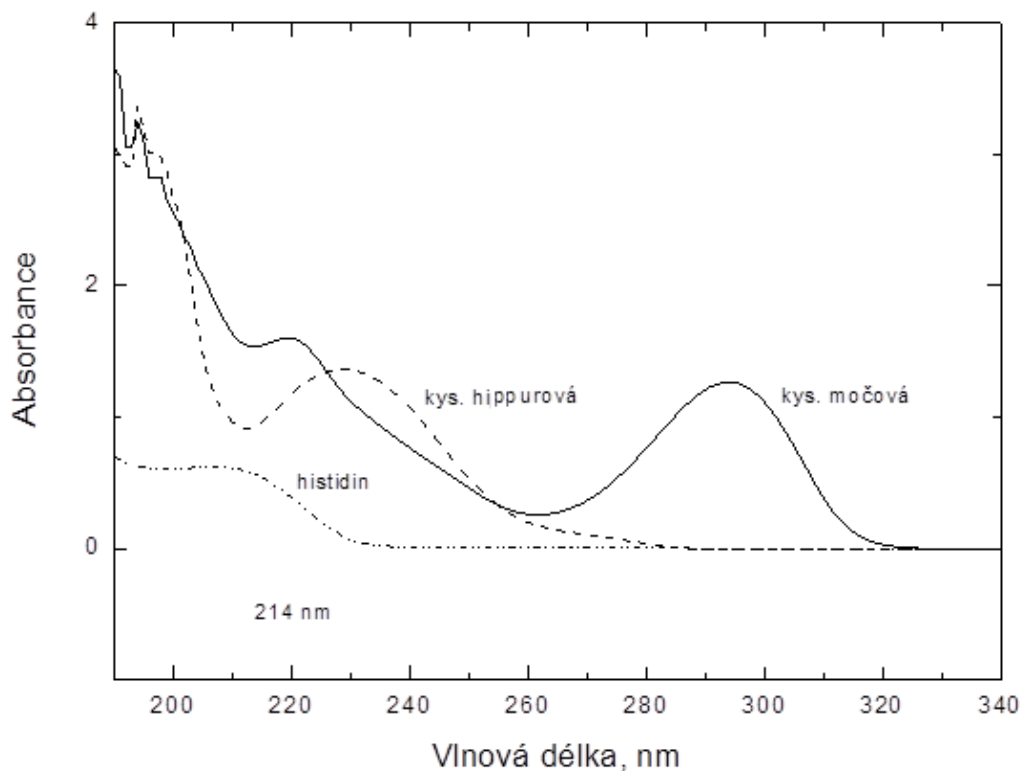
Testovány byly jednotlivé doby dávkovací sekvence, viz obr. 2B, tj. doba odkladu aktivace uzavíracího ventilu, čas (c), doba trvání aktivačního pulsu, čas (d) a celková doba zapnutí lineární pumpy, čas (b). Měření byla prováděna za konstantní rychlosti toku separačního pufru, 170  $\mu$ l  $\text{min}^{-1}$ . Každé měření bylo provedeno pětkrát a výsledné mediány byly zpracovány graficky. Vzhledem k nesymetrickým píkům byla vyhodnocena pouze plocha píků.

V závěrečné části zkoumání hydrodynamického dávkování byla zjišťována hodnota tlaku v dávkovací části při různých dobách aktivace uzavíracího ventilu. Každé měření bylo provedeno třikrát a mediány byly vyneseny do grafu. Tlak v kapiláře byl měřen kalibrovaným polovodičovým snímačem tlaku TM510/01 (Tesla, ČR).

### **3.4.2 Aplikace hydrodynamického dávkování na modelové vzorky**

Před stanovením vybraných komponent v moči bylo hydrodynamické dávkování vzorku do krátké kapiláry v laboratorně sestavené aparatuře vyzkoušeno na modelových roztocích. Separace směsi histidinu a kreatininu (o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) proběhla v separačním pufru 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80) a použita byla duální detekce. UV detektor měřil při vlnové délce 214 nm, která je dle obr. 4 nejvhodnější i pro další stanovované komponenty moči. Dále byl proměřen za stejných podmínek modelový roztok kyseliny močové a hippurové (o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ ) v separačním pufru 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10). Separací napětí bylo v obou případech 5 kV a procházející proud 3  $\mu\text{A}$ .

Poslední měření modelových roztoků bylo provedeno se směsí anorganických kationtů ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) v separačním pufru 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40), aby došlo k rozdělení iontů. Separací napětí bylo 5 kV a procházející proud 13  $\mu\text{A}$ .



Obr. 4: Závislost absorbance na vlnové délce pro kyselinu hippurovou, močovou a histidin. Jako optimální se jeví vlnová délka 214 nm, při které všechny komponenty mají absorbanci dostatečně vysokou pro citlivou detekci.

### 3.4.3 Stanovení vybraných komponent v moči

Analýza moči byla provedena ve dvou vzorcích moči získaných od zdravého dobrovolníka v den analýzy. Moč byla vždy nejprve přefiltrována přes injekční stříkačku s nasazeným filtrem o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, ČR) a naředěna vodou. První vzorek byl 50x naředěn a byly k němu přidány tři standardní přídavky 25, 50 a 100  $\mu\text{M}$  každého z analytů. Separace probíhala v separačním pufru 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), separačním napětí 5 kV a proudu 3  $\mu\text{A}$ . Nižší pH je voleno z důvodu lepšího oddělení kreatininu od elektroosmotického toku. Druhý vzorek byl naředěn 100x a probíhala v separačním pufru 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40) při separačním napětí 5 kV a proudu 13  $\mu\text{A}$ . Přídavek crown etheru umožňuje separaci draselných a amonných iontů, které v nemodifikovaném separačním pufru migrují spolu. Crown ether tvoří s draselnými ionty komplex a snižuje tak jeho mobilitu. Použita byla duální detekce. Každé stanovení bylo opakováno 3x, z úseku a směrnice regresní přímky, byla počítána koncentrace příslušného analytu.

#### **3.4.4 Analýza dalších biologických tekutin**

Také pro analýzu mozkomíšního moku i plazmy byl použit separační pufr 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 o pH 2,40. Separační napětí bylo 5 kV a procházející proud 13  $\mu$ A.

Vzorky mozkomíšního moku od 2 pacientů byly desetkrát zředěny, přefiltrovány a dávkovány do kapiláry.

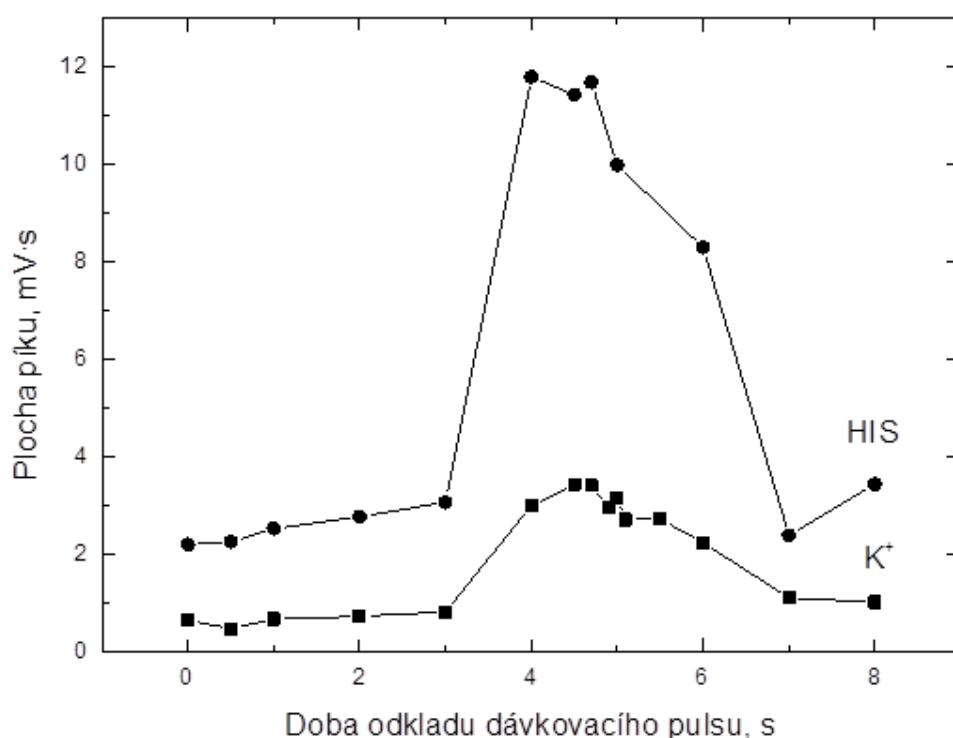
Pro analýzu plazmy bylo potřeba nejprve vzorek smíchat s acetonitrilem v poměru 1:3 a protřepat tak, aby se vyloučily proteiny, které byly odděleny na centrifuze (Denver Instrument, USA) po dobu 4 minut při 10 000 otáčkách za minutu.

Celkem byly proměřeny 4 vzorky plazmy od různých pacientů. Byla provedena identifikace píků stejně jako u mozkomíšního moku.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Výsledky optimalizace hydrodynamického dávkování

Nejprve byl proveden test doby odkladu dávkovacího pulsu (čas c na obr. 2B) při konstantní době aktivace lineární pumpy (10 s) a trvání pulsu (0,5 s). Zkoušené doby dávkovacího pulsu byly od 0 do 8 s. Měření bylo provedeno vždy pětkrát a výsledné mediány byly graficky zpracovány (viz obr. 5).



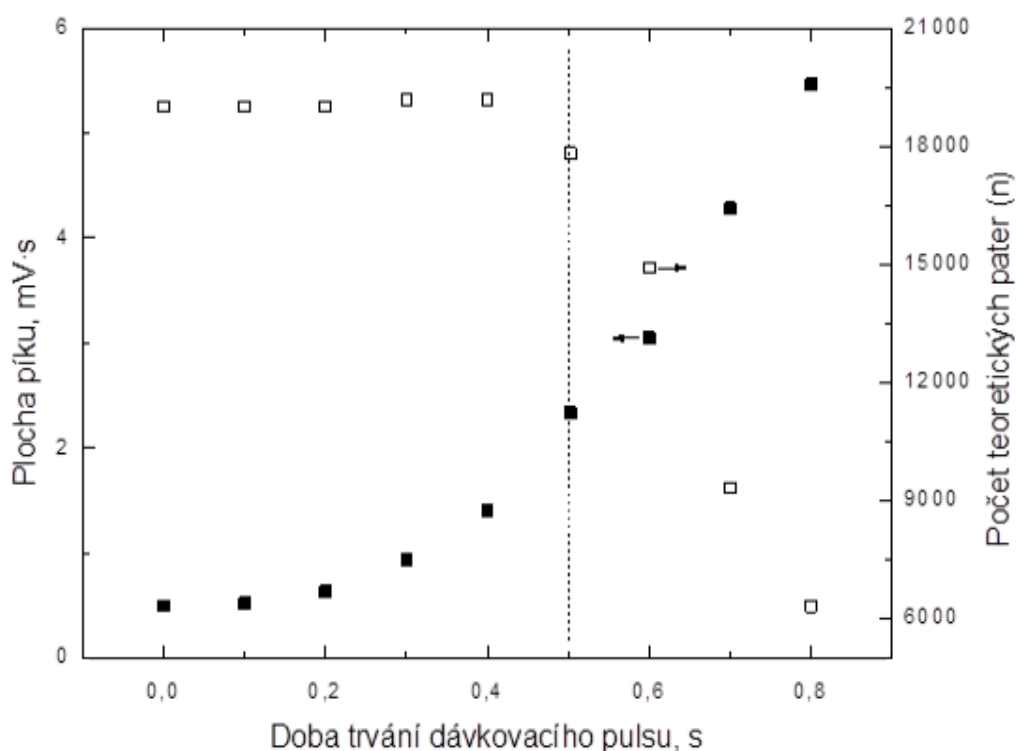
Obr. 5: Závislost plochy píku histidinu (HIS) a K<sup>+</sup> iontu na době odkladu dávkovacího pulsu. Separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , doba trvání dávkovacího pulsu 0,5 s, separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce.

Jako optimální se doba odkladu pulsu jeví v rozmezí 4 – 5 s. Pro další měření byla zvolena doba 5 s jako optimální a použita k dalšímu testování.

Dále byla při testování tlakového dávkování měněna délka trvání dávkovacího pulsu (čas d na obr. 2B) od 0 do 0,8 s při konstantní době aktivace lineární pumpy (10 s)

a době odkladu dávkovacího pulsu (5 s). Vhodná délka trvání dávkovacího pulsu zajistí správné nadávkování vzorku do kapiláry.

Měření bylo provedeno pětkrát a mediány byly vyneseny do grafu spolu s vypočtenou účinností separace (počtem teoretických pater). Počet teoretických pater byl počítán ze vztahu  $n = 5,54 \cdot (t_M/w_{1/2})^2$ , kde  $t_M$  je migrační čas a  $w_{1/2}$  je šířka píku v poloviční výšce.



Obr. 6: Závislost plochy píku na době trvání pulsu pro draslík (pro histidin obdobné), včetně zobrazení účinnosti separace ( $n$  – počet teoretických pater). Separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce.

Z obr. 6 je patrné, že s rostoucí dobou trvání dávkovacího pulsu se zvětšuje plocha píku (vyšší analytický signál), avšak klesá separační účinnost. Je nutné zvolit optimální dobu trvání pulsu, při které je ještě vysoká účinnost, ale plocha píku dostatečně velká. Za optimální dobu trvání pulsu bylo zvoleno 0,5 s.

Při uzavření ventilu byl měřen tlak v aparatuře, z něhož byl určen objem nadávkovaného vzorku do kapiláry dle vztahu:

$$V = 7,81 \cdot 10^{-11} \frac{\Delta P \pi D^4 t}{\eta L}, \quad (4-1)$$

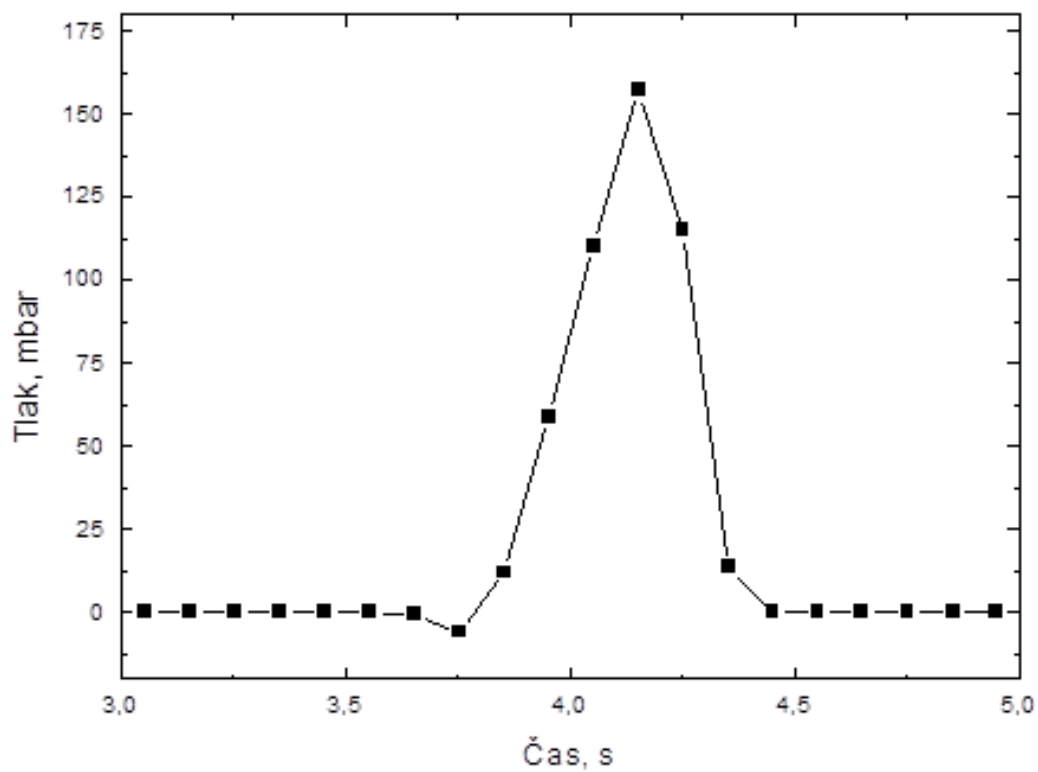
kde  $\Delta P$  (mbar) je tlak,  $D$  (50  $\mu\text{m}$ ) vnitřní průměr kapiláry,  $t$  (s) doba dávkování,  $\eta$  (0,001 Pa·s) viskozita roztoku a  $L$  (10,5 cm) celková délka kapiláry. Výsledkem je nadávkované množství vzorku v nl ( $V$ ).

Nadávkovaný objem, délka zóny vzorku a nadávkované množství analytu pro různé doby trvání pulsu jsou uvedeny v tabulce 1. Časový průběh tlaku v aparatuře při délce trvání dávkovacího pulsu 0,5 s je pro ilustraci ukázán na obr. 7.

Tabulka 1: Nadávkovaný objem vzorku do kapiláry, délka zóny vzorku a nadávkované množství vzorku analytu (pro koncentraci 50  $\mu\text{M K}^+$ ) pro různé doby trvání dávkovacího pulsu. Tlak je střední hodnotou ze tří měření.

Délka dávkovacího pulsu, s	Tlak, mbar	Objem nadávkovaného vzorku, nl	Délka zóny, mm	Množství analytu, pmol
0,3	45,70	2,00	1,0	0,10
0,4	57,70	3,40	1,7	0,17
0,5	80,40	5,90	3,0	0,29
0,6	103,4	9,00	4,6	0,45
0,7	128,6	13,2	6,7	0,66
0,8	149,5	17,5	8,9	0,87

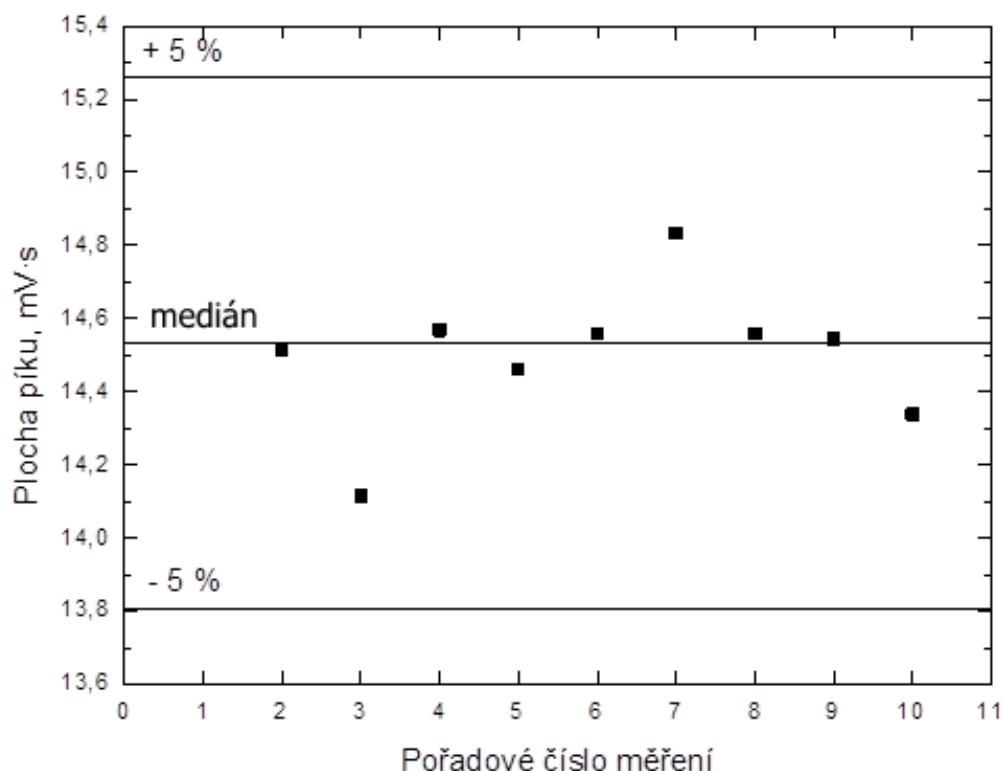
Dobou uzavření ventilu lze jednoduše kontrolovat množství analytu, které se nadávkuje do kapiláry. Pro vyšší separační účinnost je zapotřebí užití kratší doby trvání pulsu, pokud tento požadavek není příliš významný (zóny analytů jsou dostatečně odděleny), lze velikost analytického signálu zvýšit prodloužením doby trvání dávkovacího pulsu.



Obr. 7: Časová závislost tlaku v dávkovací části aparatury při aktivaci uzavíracího ventilu na dobu 0,5 s při průtokové rychlosti pufu  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ .

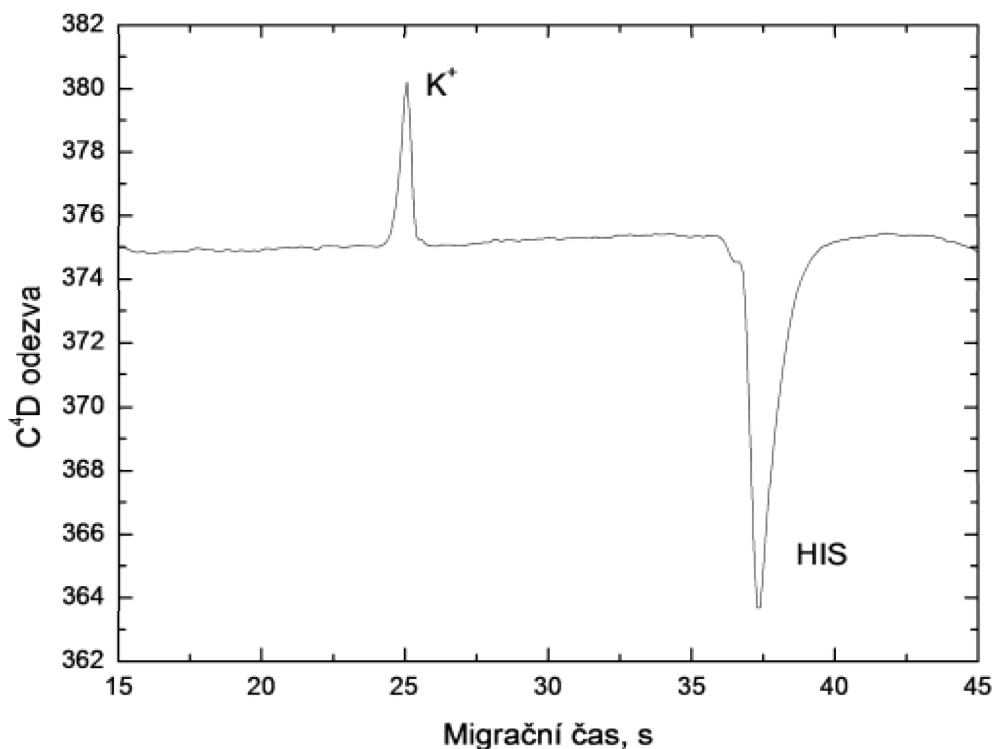
Pro měření opakovatelnosti a pro všechna další měření byly nastaveny optimální dávkovací podmínky: doba odkladu dávkovacího pulsu 5 s, doba trvání pulsu 0,5 s a doba aktivace lineární pumpy 10s.





Obr. 8: Grafické vyjádření opakovatelnosti plochy píku histidinu dávkovaného při optimalizovaných dávkovacích podmínkách (doba odkladu dávkovacího pulsu 5 s, doba trvání pulsu 0,5 s, doba aktivace lineární pumpy 10 s). Koncentrace histidinu 50  $\mu\text{M}$ , separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/prouid 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce.

Při zkoušení opakovatelnosti hydrodynamického dávkování byla v roztoku o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  pro  $\text{K}^+$  relativní směrodatná odchylka 3,05 % a pro histidin 1,70 %. Pro porovnání byla opakovatelnost vyzkoušena na roztoku draslíku a histidinu o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Zde byla relativní směrodatná odchylka pro histidin srovnatelná, ale pro draslík vyšší, 7,40 %. Opakovatelnost pro manuální dávkování v laboratorních systémech je v rozmezí relativní směrodatné odchylky 5 – 10 %, pro automatické dávkování v komerčních systémech je relativní směrodatná odchylka uváděna v rozmezí 1 – 3 % [30]. Grafické znázornění opakovatelnosti ploch pík histidinu je na obr. 8 a ilustrační elektroferogram separace modelové směsi histidinu a draselného iontu využívané při optimalizaci dávkovacích parametrů je na obr. 9.



Obr. 9: Ilustrační elektroferogram modelového roztoku draselných kationtů a histidinu (HIS) o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  získaný při optimalizovaných dávkovacích podmínkách; separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/prouid 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce.

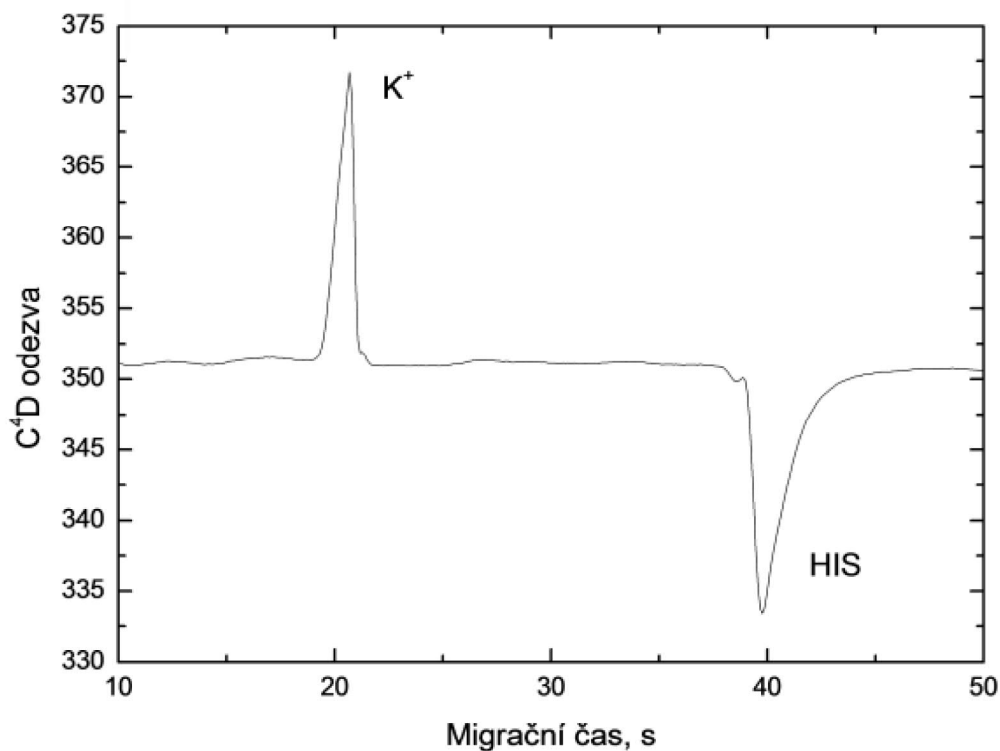
Závislost ploch píků na koncentraci byla pro testovaný koncentrační interval 10 – 150  $\mu\text{M}$  lineární pro draslík i histidin. Parametry lineární regresní rovnice jsou uvedeny v tabulce 2. Z parametrů rovnice byl spočten limit detekce (LOD),  $\text{LOD} = 3 \cdot \text{Standardní chyba} / \text{Směrnice}$ . Pro draslík je limit detekce vysoký kvůli přítomnosti sodného iontu v základním separačním pufru, protože rozdíl ve vodivostech analytu a ko-iontu v separačním pufru je malá. Detekce v tomto pufru je mnohem citlivější pro histidin.

Tabulka 2: Parametry lineární regresní přímky kalibrační závislosti ploch píků draslíku a histidinu v koncentračním rozmezí 10 – 150  $\mu\text{M}$ . Separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ . Dávkovací parametry: doba aktivace lineární pumpy 10 s, doba odkladu aktivace uzavíracího ventilu 5 s a doba trvání aktivačního pulsu 0,5 s, průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . V závorkách jsou příslušné intervaly spolehlivosti.

Analyt	Úsek, mV	Směrnice, (mV·s)/ $\mu\text{M}$	Koeficient determinace, $R^2$	Standardní chyba, mV·s	Limit detekce, $\mu\text{M}$
$\text{K}^+$	-0,011 ( $\pm 0,249$ )*	0,073 ( $\pm 0,003$ )	0,993	0,350	14
histidin	0,728 ( $\pm 0,363$ )	0,358 ( $\pm 0,004$ )	0,999	0,511	4

\*) Nulová hodnota úseku leží uvnitř intervalu spolehlivosti.

Za obdobných podmínek jako hydrodynamické bylo pro srovnání provedeno i elektrokinetické dávkování. Separační napětí bylo 5 kV, procházející proud 3  $\mu\text{A}$ . Aby při kinetickém dávkování nebyl nadávkovaný objem vzorku příliš velký, byla použita kratší dávkovací smyčka, 7,6  $\mu\text{l}$ . Elektroferogram získaný za těchto podmínek je na obr. 10.



Obr. 10: Elektroferogram modelové směsi draselných iontů a histidinu (HIS) při elektrokinetickém dávkování. Separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce.

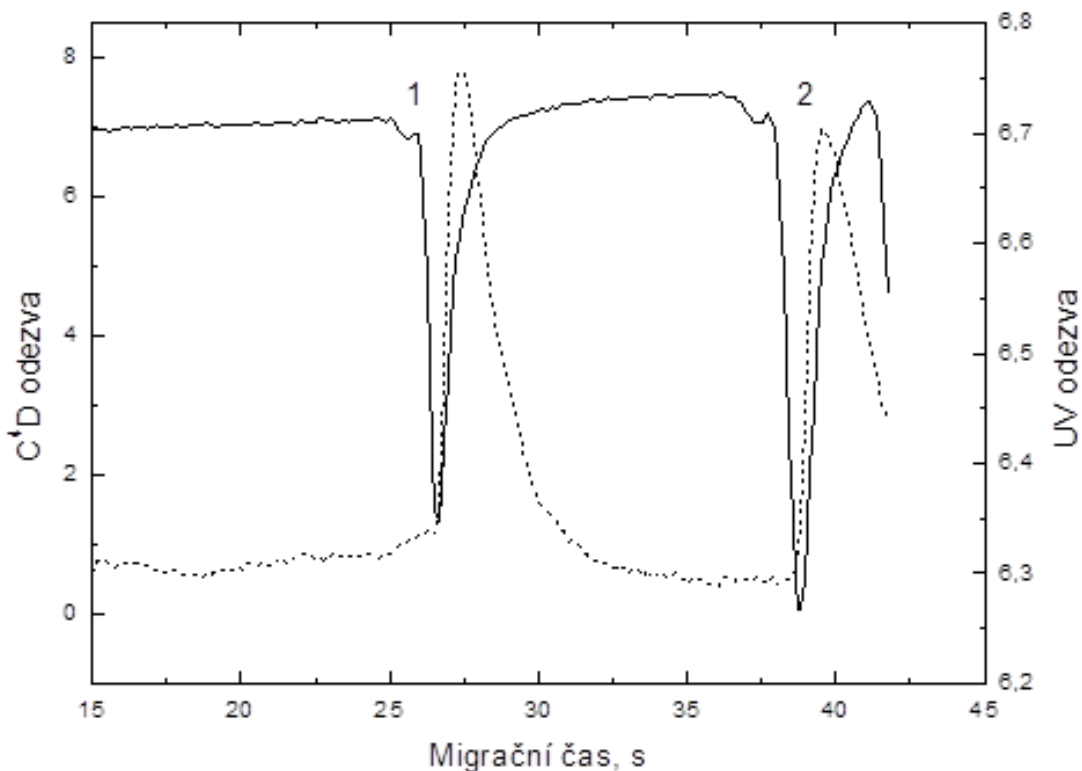
Elektrokinetické dávkování bylo provedeno v jiný den než hydrodynamické dávkování. I při zachování separačních podmínek se v důsledku nestability EOF migrační časy v řádu jednotek sekund lišily v různé dny a měnily se i s rostoucím počtem separací v rámci jednoho dne. Proto se na obr. 9 a na obr. 10 migrační časy analytů liší.

Z obou způsobů dávkování byly určeny poměry ploch pík histidin/draslík. U hydrodynamického dávkování je poměr ploch 4,90 a pro elektrokinetické 1,90.

Po srovnání obou způsobů dávkování lze říci, že elektrokinetické dávkování může být při některých analýzách méně vhodné pro jeho diskriminační charakter.

## 4.2 Aplikace optimalizovaného hydrodynamického dávkování na separaci modelových vzorků

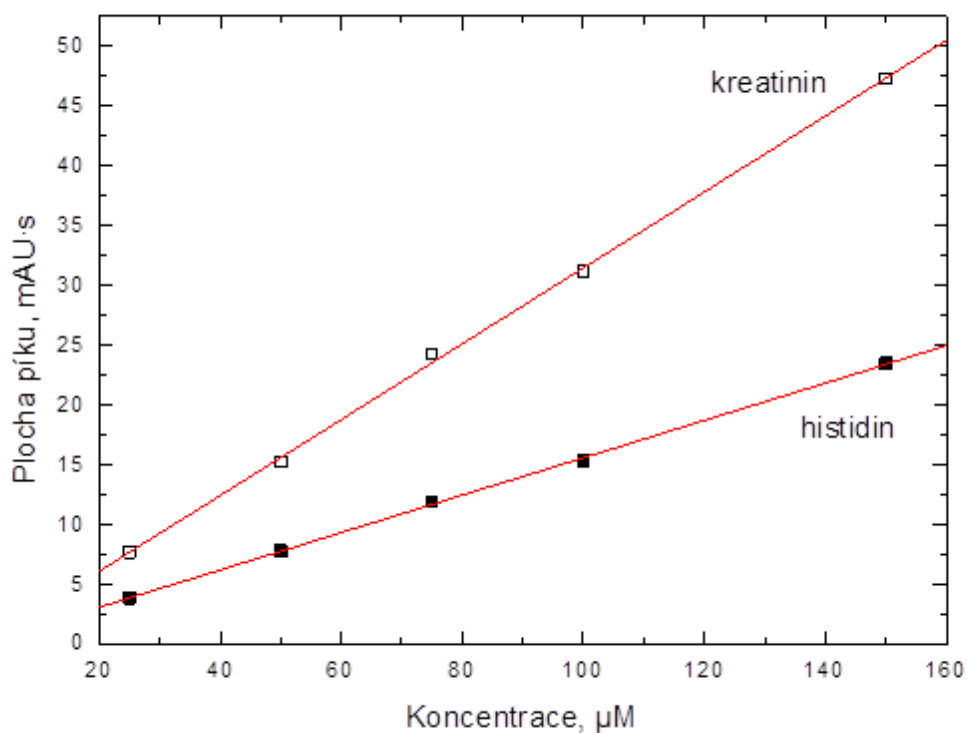
Hydrodynamické dávkování bylo nejprve vyzkoušeno na modelových vzorcích analytů, které byly následně stanovovány v moči. Elektroferogram separace histidinu a kreatininu je na obr. 11; využity jsou oba detekční systémy,  $C^4D$  i UV/VIS.



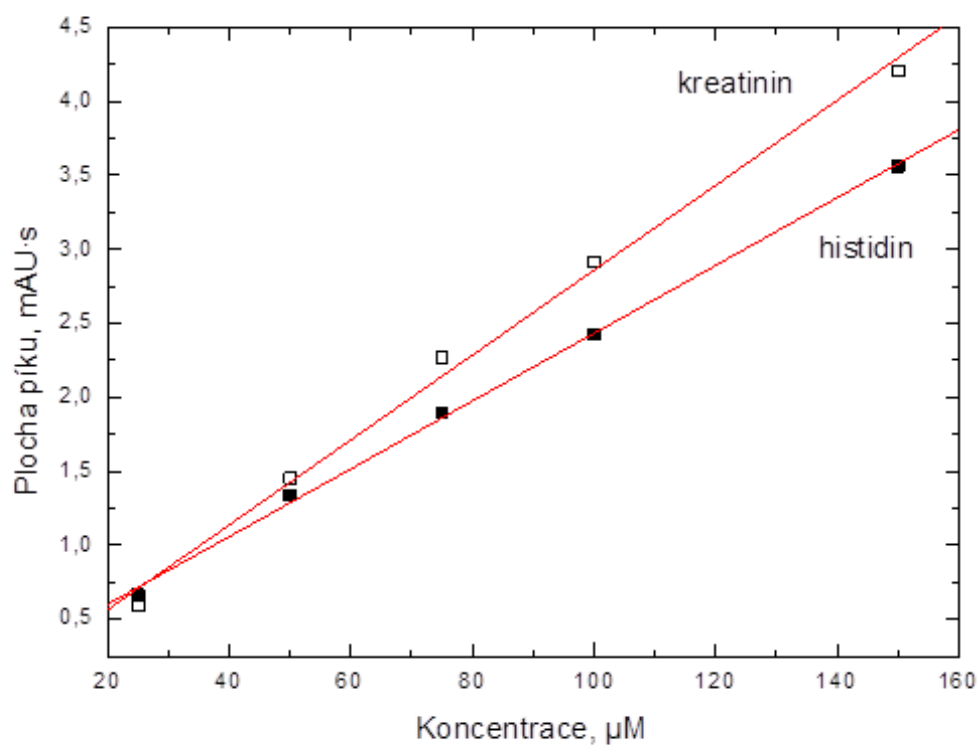
Obr. 11: Vzorový elektroferogram modelového roztoku histidinu a kreatininu o koncentraci  $50 \mu\text{M}$  obou analytů, 1 – histidin, 2 – kreatinin. Optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr  $20 \text{ mM MES} + 5 \text{ mM NaOH}$  ( $\text{pH } 5,80$ ), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud  $5 \text{ kV}/3 \mu\text{A}$ , duální detekce, plná čára  $C^4D$ , tečkovaná čára UV/VIS při  $214 \text{ nm}$ .

Z obr. 11 je patrné, že za píkem kreatininu je pík nástřikové zóny (water-gap) nesené elektroosmotickým tokem. Pík kreatininu je tedy špatně vyhodnotitelný, zvláště v UV detekci. Pro stanovení kreatininu v moči (a dalších stanovovaných komponent) byl proto použit základní separační pufr o nižším  $\text{pH}$ ,  $50 \text{ mM MES} + 5 \text{ mM NaOH}$  ( $\text{pH } 5,10$ ), v němž je kreatinin lépe oddělen od píku nástřikové zóny.

Byla provedena kalibrační závislost pro histidin a kreatinin pro  $C^4D$  i UV/VIS detekci, viz obr. 12 a 13. V rozsahu testovaných koncentrací 25 – 150  $\mu\text{M}$  je kalibrační závislost pro histidin i kreatinin v obou detektorech lineární. Parametry regresních kalibračních rovnic včetně vypočtených limitů detekce jsou uvedeny v tabulce 3.



Obr. 12: Závislost plochy píku histidinu a kreatininu na koncentraci. Modelový vodný roztok, optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proudek 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce.



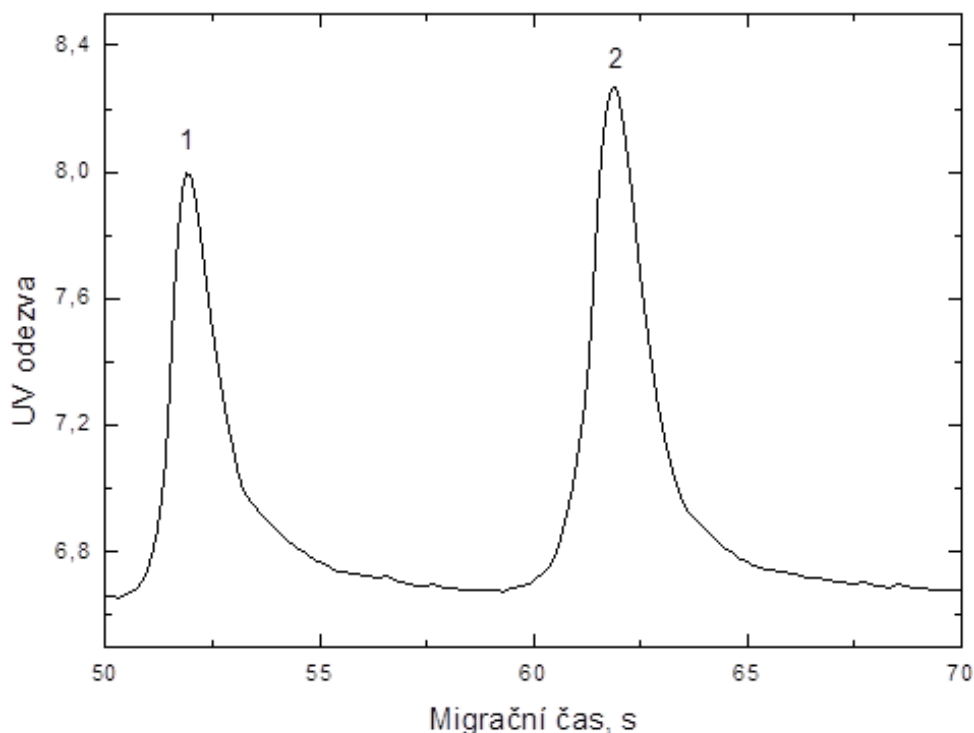
Obr. 13: Závislost plochy píku histidinu a kreatininu na koncentraci. Modelový vodný roztok, optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ , UV/VIS detekce při 214 nm.

Tabulka 3: Parametry lineárních regresních přímek kalibrační závislosti ploch pík histidinu a kreatininu v koncentračním rozmezí 25 – 150  $\mu\text{M}$  detegovaných v obou detektorech. Optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ . V závorkách jsou příslušné intervaly spolehlivosti.

Analyt	Úsek, mV	Směrnice, (mV·s)/ $\mu\text{M}$	Koeficient determinace, $R^2$	Standardní chyba, mV·s	Limit detekce, $\mu\text{M}$
Histidin ( $\text{C}^4\text{D}$ )	-0,006 ( $\pm 0,188$ )*	0,156 ( $\pm 0,002$ )	1,000	0,199	4
Kreatinin ( $\text{C}^4\text{D}$ )	-0,218 ( $\pm 0,467$ )*	0,317 ( $\pm 0,005$ )	1,000	0,494	5
Histidin (UV)	0,144 ( $\pm 0,042$ )	0,023 ( $\pm 0,001$ )	0,999	0,045	6
Kreatinin (UV)	-0,008 ( $\pm 0,111$ )*	0,029 ( $\pm 0,001$ )	0,997	0,118	12

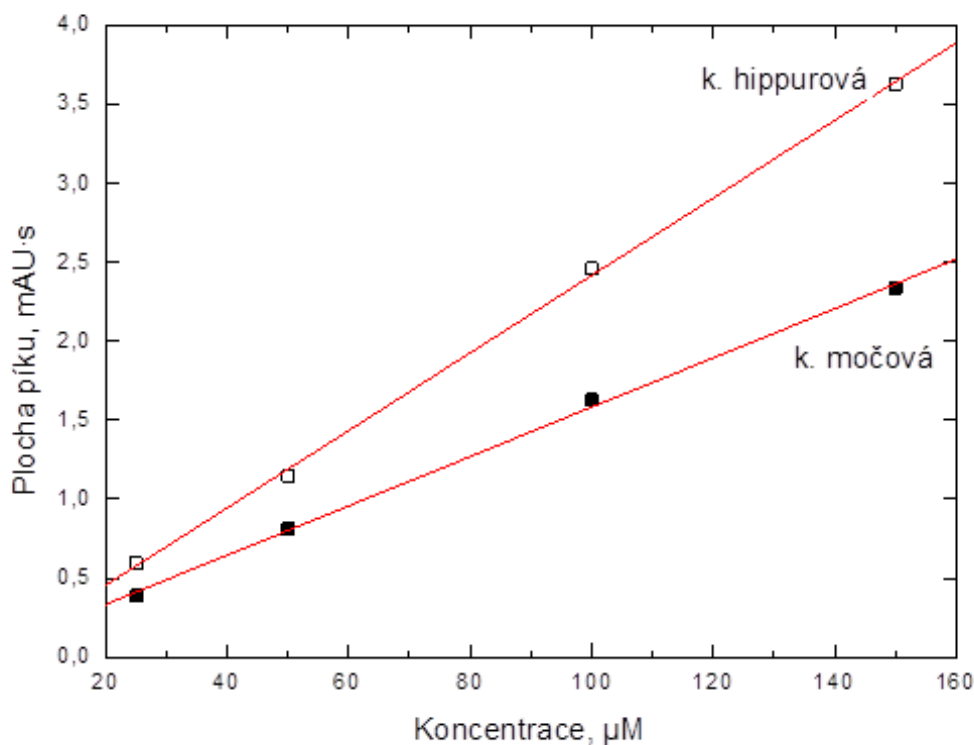
\*) Nulová hodnota úseku leží uvnitř intervalu spolehlivosti.





Obr. 14: Vzorový elektroferogram modelového roztoku kyseliny močové a hippurové o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  obou analytů, 1 – kyselina močová, 2 – kyselina hippurová. Optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ . UV/VIS detekce při 214 nm.

Na obr. 14 je elektroferogram separace modelové směsi kyselin močové a hippurové registrované pouze UV/VIS detektorem. V bezkontaktním detektoru je pík kyseliny močové špatně vyhodnotitelný a pík kyseliny hippurové není vůbec detekovatelný. Sledována byla koncentrační závislost. V testovaném koncentračním oboru 25 – 150  $\mu\text{M}$  byla tato závislost pro oba analyty lineární, jak je vidět na obr. 15. V tabulce 4 jsou uvedeny parametry regresních kalibračních rovnic.



Obr. 15: Závislost plochy píku kyseliny močové a hippurové na koncentraci. Modelový vodný roztok, optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/3  $\mu\text{A}$ . UV/VIS detekce při 214 nm.

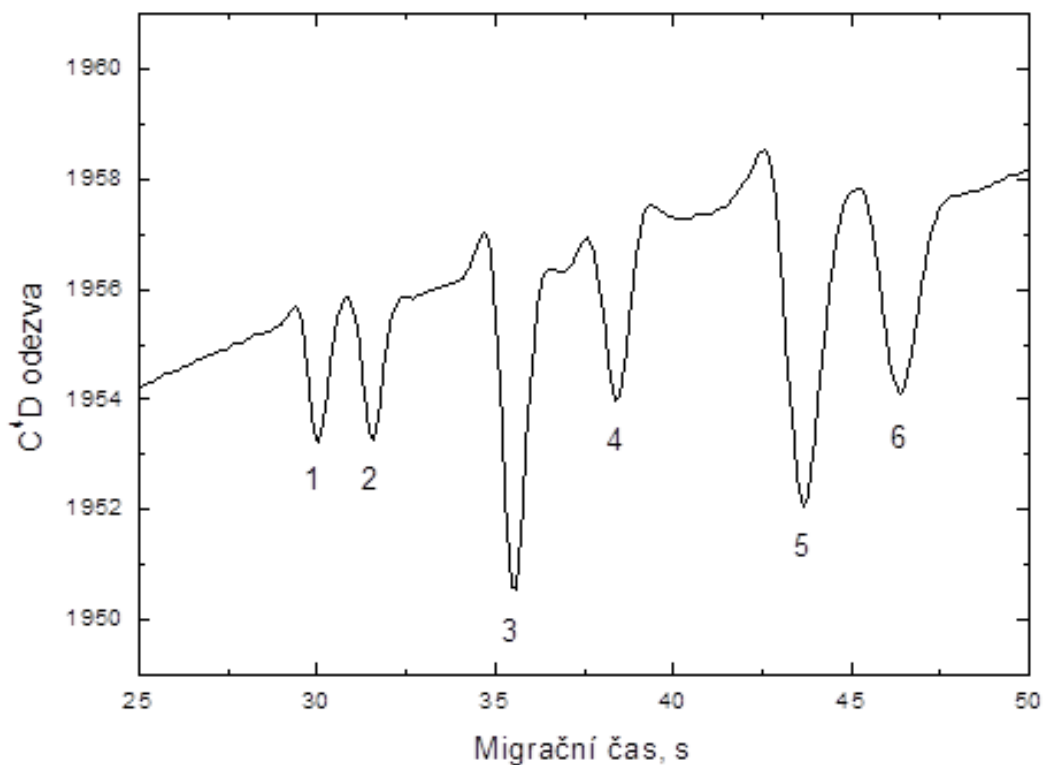
Tabulka 4: Parametry regresních kalibračních rovnic z obr. 15. V závorkách jsou příslušné intervaly spolehlivosti.

Analyt	Úsek, mV	Směrnice, $(\text{mV}\cdot\text{s})/\mu\text{M}$	Koeficient determinace, $R^2$	Standardní chyba, $\text{mV}\cdot\text{s}$	Limit detekce, $\mu\text{M}$
K. močová	0,021 ( $\pm 0,068$ ) <sup>*</sup>	0,016 ( $\pm 0,001$ )	0,999	0,043	8
K. hippurová	-0,037 ( $\pm 0,071$ ) <sup>*</sup>	0,025 ( $\pm 0,001$ )	1,000	0,046	6

<sup>\*</sup>) Nulová hodnota úseku leží uvnitř intervalu spolehlivosti.

Pro testování anorganických složek moči byl připraven modelový roztok šesti anorganických iontů o koncentraci  $50 \mu\text{M}$  každého z analytů:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,

$\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ . Separace proběhla v pufru 1 M kyseliny octové s přidavkem 1,5 mM crown etheru 18-crown-6 (pH 2,40). Všechny kationty byly od sebe odděleny. Stejné dávkovací podmínky jako na obr. 16 tedy mohou sloužit k rychlému monitorování anorganických iontů a dalších látek v biologických tekutinách.



Obr. 16: Modelový roztok anorganických iontů. Optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6, průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/13  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce. Identifikace píků: 1 –  $\text{NH}_4^+$ , 2 –  $\text{K}^+$ , 3 –  $\text{Ba}^{2+}$ , 4 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 5 –  $\text{Na}^+$ , 6 –  $\text{Li}^+$ .

### 4.3 Stanovení vybraných analytů v lidské moči

Optimalizované dávkování do krátké kapiláry pro kapilární elektroforézu s bezkontaktní vodivostní detekcí bylo použito pro stanovení některých důležitých biochemických analytů v lidské moči, amonných iontů, histidinu, kreatininu, močové a hippurové kyseliny.

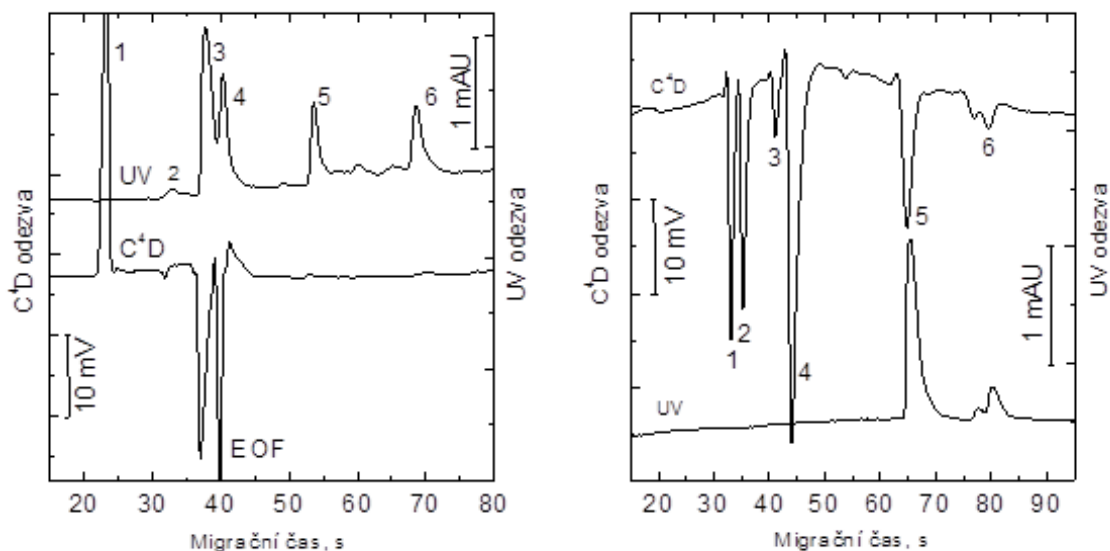
Vzorky moče získané od zdravého dobrovolníka byly analyzovány vždy v den odběru.

Separace komponent byla nejprve provedena v v separačním pufru 50 mM MES + 5 mM NaOH o pH 5,10. Nižší hodnota pH separačního pufru než při separaci modelové směsi draslíku a histidinu byla volena kvůli protonaci kreatininu, a tím k jeho lepšímu oddělení od EOF. Látky byly detegovány oběma detekčními systémy, viz obr. 17A. V tomto pufru je EOF v čase 40 s. Na záznamu z C<sup>4</sup>D byl registrován pík nerozdělených anorganických iontů, pík histidinu a kreatininu. Na záznamu z UV detektoru jsou za píkem nenabitých látek nesených elektroosmotickým tokem dobře oddělené píky kyseliny močové a hippurové, které jako anionty migrují opačným směrem než EOF.

Stanovení histidinu, kreatininu a kyseliny močové a hippurové metodou standardního přídávku bylo opakováno 3x a z parametrů regresních kalibračních přímek byly vypočteny koncentrace jednotlivých analytů. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky pro všechny stanovované komponenty v moči. V tabulce 5 je rovněž uveden koncentrační rozsah analytů běžně se vyskytujících v moči [19], všechny zjištěné koncentrace spadají do těchto limitů.

Pro stanovení amonných iontů je třeba oddělit ostatní anorganické ionty, amonné a draselné ionty od sebe. Amonné a draselné ionty migrují stejnou rychlostí, v krátké kapiláře a s rychlým EOF je nelze jednotlivě stanovit. Přidáním crown etheru 18-crown-6 do základního separačního pufru se vytvoří komplexy s draselnými ionty, tudíž se jejich migrace zpomalí oproti rychlosti amonných iontů, a tak dojde k jejich vzájemnému oddělení, viz obr. 17B.

Analýza tak byla provedena v prostředí základního separačního elektrolytu 1 M kyseliny octové s přídávkem 1,5 mM crown etheru 18-crown-6 o pH 2,40. Na záznamu z vodivostního detektoru jsou dobře oddělené anorganické ionty a kreatinin, které se projeví jako záporné píky. Na záznamu ze spektrofotometrického detektoru je dobře vyhodnotitelný pouze pík kreatininu. V tomto kyselém pufru nelze stanovit kyseliny. Pík histidinu je rovněž nevyhodnotitelný, je špatně oddělen od jiné složky moči, pravděpodobně od svých methyl-derivátů, jejichž detekce je v kyselém prostředí citlivější než v prostředí neutrálním. Z těchto elektroferogramů byly stanovovány amonné ionty a kreatinin a výsledky uvedeny v tabulce 6. Výsledky jsou mediánem ze tří měření, vyhodnoceny byly plochy píků.



Obr. 17: Části elektroferogramů vzorku moči registrované C<sup>4</sup>D a UV detektorem.

(A): moč naředěná vodou 1:50, separační pufr 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/prouid 5 kV/3  $\mu\text{A}$ . Identifikace píků: 1 – nerozdělené anorganické ionty, 2 – histidin, 3 – kreatinin, 4 – neutrální látky absorbující UV záření, 5 – kyselina močová, 6 – kyselina hippurová.

(B): moč naředěná vodou 1:100, separační pufr 1 M kyselina octová + crown ether 18-crown-6 (pH 2,40), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/prouid 5 kV/13  $\mu\text{A}$ . Identifikace píků: 1 –  $\text{NH}_4^+$ , 2 –  $\text{K}^+$ , 3 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 4 –  $\text{Na}^+$ , 5 – kreatinin, 6 – histidin.

Tabulka 5: Stanovení kreatininu, histidinu, kyseliny močové a hippurové (v závorce je uvedena detekční metoda). Lidská moč naředěná vodou 1:50, separační pufr 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/prouid 5 kV/3  $\mu\text{A}$ .

Analyt	Migrační čas, s	Koncentrace, $\text{mg}\cdot\Gamma^{-1}$	RSD, %	Rozsah*, $\text{mg}\cdot\Gamma^{-1}$	$n, m^{-1}$
Histidin (C <sup>4</sup> D)	32 ± 1	67 ± 7	5,10	40 – 330	136200
Histidin (UV)		61 ± 6	4,60		-
Kreatinin (C <sup>4</sup> D)	36 ± 1	1031 ± 233	10,2	670 – 2150	52300
Kreatinin (UV)		1209 ± 364	13,7		24900
K. močová (UV)	54 ± 3	392 ± 20	2,30	40 – 670	118000
K. hippurová (UV)	69 ± 5	539 ± 33	2,70	50 – 1670	150000

\*) Hodnoty v této kolonce jsou převzaty z práce [19].

Tabulka 6: Stanovení amonných iontů a kreatininu (v závorce je uvedena detekční metoda). Lidská moč naředěná vodou 1:100, separační pufr 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40), průtoková rychlost pufru 170  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/13  $\mu\text{A}$ .

Analyt	Migrační čas, s	Koncentrace, $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	RSD, %	$n$ , $\text{m}^{-1}$
$\text{NH}_4^+$	$34 \pm 0$	$515 \pm 95$	8,3	132000
Kreatinin ( $\text{C}^4\text{D}$ )	$68 \pm 0$	$1666 \pm 75$	2,0	95600
Kreatinin (UV)		$1717 \pm 159$	4,2	62700

V tabulkách 5 a 6 jsou uváděny i separační účinnosti. Účinnost separace vyjádřená počtem teoretických pater je v kapilární elektroforéze běžně 100 000  $\text{m}^{-1}$ . Získané hodnoty jsou v souladu s účinností separace pro klasické hydrodynamické dávkování vzorků založené na výměně vialek. Toto ukazuje, že nově vyvinutá metoda dávkování zaručuje dostatečně krátkou nadávkovanou zónu vzorku na začátku kapiláry.

Z tabulky 5 a 6 vyplývá, že  $\text{C}^4\text{D}$  a UV detekce poskytuje (v intervalu spolehlivosti) stejné výsledky a analyty mohou být stanoveny oběma metodami. Kreatinin může být detegován v obou použitých separačních pufrech. Jeho stanovení je přesnější v pufru 1 M kyseliny octové s přidavkem crown etheru než v pufru MES + NaOH, kde je jeho pík blízko EOF, a tudíž je jeho vyhodnocení složitější. Naopak histidin je v kyselém pufru nevyhodnotitelný v důsledku interference jeho zóny se zónou methyl-derivátů.

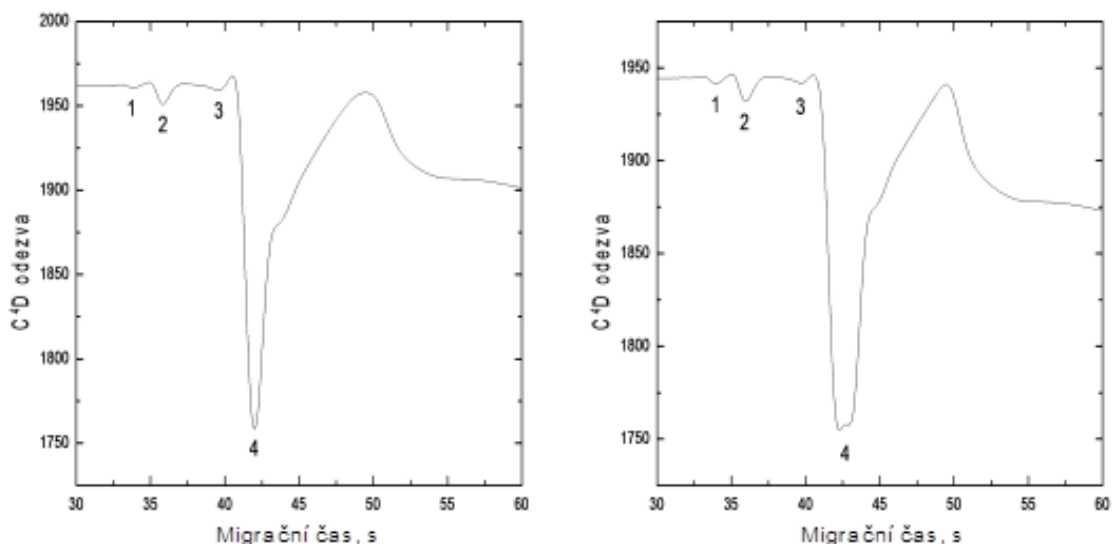
Jak vyplývá z dosažených výsledků, aparatura s tímto dávkováním může být použita pro rychlé monitorování iontů v moči. Rozlišení píků je pro  $\text{NH}_4^+ - \text{K}^+$  1,3; pro  $\text{K}^+ - \text{Ca}^{2+}$  3,4 a pro  $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^+$  1,3.

#### 4.4 Analýza mozkomíšního moku a krevní plazmy

Pro ukázkou další aplikace vyvinutého dávkování pro kapilární elektroforézu v krátké kapiláře byly proměřeny 2 vzorky mozkomíšního moku a 4 vzorky krevní plazmy. Pro analýzu byl použit separační pufr 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 o pH 2,40, separační napětí bylo 5 kV a procházející proud 13  $\mu\text{A}$ . Použitá detekce byla vodivostní.

Vzorky mozkomíšního moku byly desetkrát zředěny, přefiltrovány a dávkovány do kapiláry.

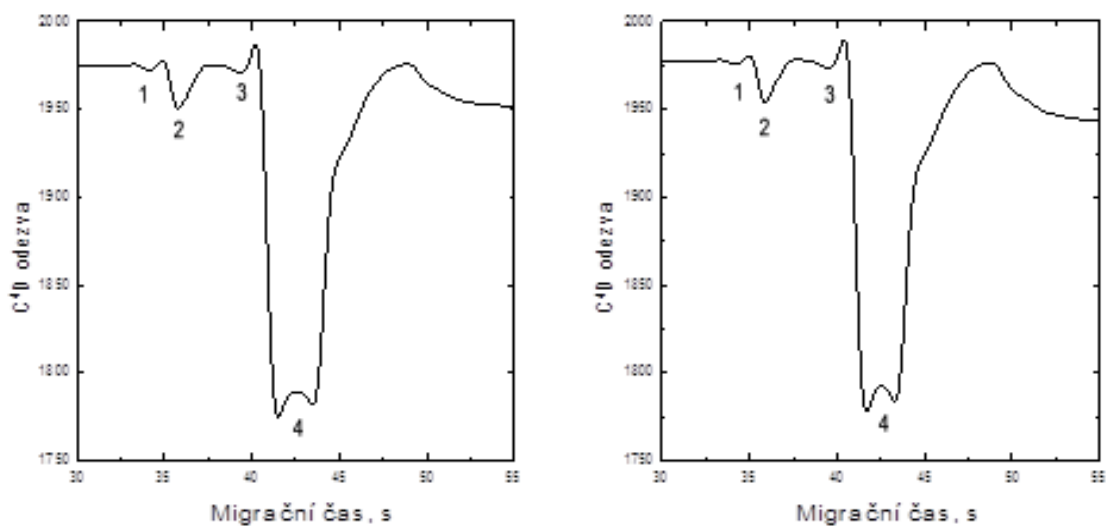
Ilustrační elektroferogram je na obr. 18.



Obr. 18: Ilustrační elektroferogramy vzorku mozkomíšního moku od dvou různých pacientů. Optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/13  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce. Identifikace píků: 1 –  $\text{NH}_4^+$ , 2 –  $\text{K}^+$ , 3 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 4 –  $\text{Na}^+$  +  $\text{Mg}^{2+}$ .

Pro analýzu plazmy bylo zapotřebí nejprve vzorky smísit s acetonitrilem v poměru 1:3 (vzorek/acetonitril). Vzorky byly protřepány, aby se podpořilo vylučování proteinů, které byly následně odděleny na centrifuze (Denver Instrument, USA) po dobu 4 minut při 10 000 otáčkách za minutu.

Jednotlivé elektroferogramy pro 4 vzorky plazmy byly téměř identické, pro ukázkou byly vybrány 2, viz obr. 19.



Obr. 19: Vybrané elektroferogramy krevní plazmy dvou různých pacientů. Optimalizované dávkovací podmínky, separační pufr 1 M kyselina octová + 1,5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2,40), průtoková rychlost pufru  $170 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , separační napětí/proud 5 kV/13  $\mu\text{A}$ , bezkontaktní vodivostní detekce. Identifikace píků: 1 –  $\text{NH}_4^+$ , 2 –  $\text{K}^+$ , 3 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 4 –  $\text{Na}^+ + \text{Mg}^{2+}$ .



## 5 Závěr

Jako alternativa k elektrokinetickému dávkování do krátké elektroforetické kapiláry bylo vyzkoušeno hydrodynamické dávkování a po optimalizaci některých jeho parametrů bylo zhodnoceno jako vhodný dávkovací systém a tento předpoklad byl potvrzen při analýze biologických tekutin.

Takto navržené zařízení pro dávkování pod tlakem umožňuje snadnou změnu dávkovacích podmínek změnou jediného parametru - doby trvání tlakového pulsu. Nejprve bylo hydrodynamické dávkování vyzkoušeno na modelových roztocích ve dvou různých pufrch a poté v moči, mozkomíšním moku a krevní plazmě. Použita byla duální detekce, bezkontaktní vodivostní a spektrofotometrická, aby bylo možné detegovat anorganické kationty i organické látky zároveň při jedné analýze.

Stanovení kreatininu, histidinu, močové a hippurové kyseliny bylo provedeno v 50x zředěné moči, v separačním pufru 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,10). Tento pufr je vhodný zvláště pro stanovení kreatininu. Na modelových roztocích byl vyzkoušen pufr 20 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,80), ale pík kreatininu byl obtížně vyhodnotitelný, jelikož ho následoval elektroosmotický tok. Nižší pH vede k protonaci kreatininu, a tím k oddělení jeho píku od píku elektroosmotického toku. Výsledky byly porovnány s rozsahem koncentrací analytů, které se v moči vyskytují [19]. Všechny získané koncentrace spadají do uvedených rozsahů a relativní směrodatná odchylka se pohybovala u obou detektorů řádově v jednotkách procent a nepřesáhla 14 %.

Pro stanovení amonných iontů bylo zapotřebí použít separační pufr, který oddělí amonné ionty od draselných. Přidáním crown etheru dojde ke komplexaci s draselnými ionty a k oddělení píků. Stanovení amonných iontů bylo provedeno v separačním pufru 1 M kyselina octová s přídavkem 1,5 mM 18-crown-6 (pH 2,40). Kreatinin lze vyhodnotit i ze separace v kyselém prostředí, nelze však detegovat močovou a hippurovou kyselinu. Stanovení všech komponent bylo provedeno metodou standardního přídavku.

Navržené zařízení je vhodné pro rychlé vyšetření biologických tekutin, především moči, a odhalení některých odchylek a nemocí.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že cíl práce byl beze zbytku splněn. Podstatná část výsledků diplomové práce již byla přijata k publikování v časopise *Electrophoresis*.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] Opekar, F.: Aparatura pro elektroforetické separace v krátkých kapilárách. *Chem. Listy* **106**, 289–292 (2012).
- [2] Higson, J. P. S.: *Analytical Chemistry*. 3. vydání. Oxford, Oxford University Press 2006.
- [3] Štulík, K.; Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2005.
- [4] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy* **91**, 320–329 (1997).
- [5] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2007.
- [6] Blas, M.; Delaunay, N.; Rocca, J-L.: Electrokinetic-based injection modes for separative microsystems. *Electrophoresis* **29**, 20-32 (2008).
- [7] Ryvolová, M.; Tábořský, P.; Vrábel, P.; Havel, J.; Preisler, J.: Derivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů pro laserem indukovanou fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze. *Chem. Listy* **100**, 191–195 (2006).
- [8] Tůma, P.; Samcová, E.: Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chem. Listy* **101**, 200–207 (2007).
- [9] Pazourek, J.: *Moderní elektroforetické analytické metody*. Skripta: Elektroforetické analytické metody (2003).
- [10] Opekar, F.; Štulík, K.: Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok – Znovuzrození bezkontaktních impedančních metod. *Chem. Listy* **104**, 1148–1154 (2010).

- [11] See, H. H.; Schmidt-Marzinkowski, J.; Pormsila, W.; Morand, R.; Krahenbuhl, S.; Hauser, P.C.: Determination of creatine and phosphocreatine in muscle biopsy by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Anal. Chim. Acta* **727**, 78–82 (2012).
- [12] Vochyánová, B.; Opekar, F.; Tůma, P.; Štulík, K.: Rapid determination of sacharides in high-energy drinks by short capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 1549–1554 (2012).
- [13] Opekar, F.; Tůma, P.; Štulík, K.: Contactless impedance sensors and their application to flow measurements. *Sensors* **13**, 2786–2801 (2013).
- [14] Kubáň, P.; Timerbaev, A. R.: CE of inorganic species - a review of methodological advancements over 2009-2010. *Electrophoresis* **33**, 196–210 (2012).
- [15] Elbashir, A. A.; Aboul-Enein, H. Y.: Recent advances in applications of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C<sup>4</sup>D): an update. *Biomed. Chromatogr.* **26**, 990–1000 (2012).
- [16] Novotný, M.; Opekar, F.; Jelínek, I.: Kombinovaný detektor pro kapilární elektroforézu. *Chem. Listy* **99**, 132–136 (2005).
- [17] Tůma, P.; Samcová, E.; Štulík, K.: Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection – An efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders. *Anal. Chim. Acta* **685**, 84–90 (2011).
- [18] Jabor, A. a kol: Vnitřní prostředí. Praha, Grada Publishing, a.s. 2008.

- [19] Putnam, D. F.: Report No. NASA CR-1802, Composition and concentrative properties of human urine, McDonnell Douglas Astronautic company, Huntington Beach, Calif., dostupné z URL: <<http://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/19710023044.pdf>>. Staženo dne 10. 12. 2014.
- [20] Guzman, A. N.; Hernandez, L.; Advis, J. P.: Effect of low temperature storage (on collected urine specimens) in the identification and quantitation of urinary metabolites by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography* **12**:13, 2563–2574 (1989).
- [21] Guzman, A. N.; Berck, C. M.; Hernandez, L.; Advis, J. P.: Capillary electrophoresis as a diagnostic tool: Determination of biological constituents present in urine of normal and pathological individuals. *Journal of Liquid Chromatography* **13**:19, 3833–3848 (1990).
- [22] Zheng, X.; Yao, T.; Zhu, Y.; Shi, S.: Cu<sup>2+</sup> modulated silver nanoclusters as an on–off–on fluorescence probe for the selective detection of l-histidine. *Biosensors and Bioelectronics* **66**, 103–108 (2015).
- [23] Tůma, P.; Samcová, E.; Balínová, P.: Determination of 3-methylhistidine and 1-methylhistidine in untreated urine samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **821**, 53–59 (2005).
- [24] Tůma, P.; Samcová, E.; Opekar, F.; Jurka, V.; Štulík, K.: Determination of 1-methylhistidine and 3-methylhistidine by capillary and chip electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **28**, 2174–2180 (2007).
- [25] Zhao, J.: Simultaneous determination of plasma creatinine, uric acid, kynurenine and tryptophan by high-performance liquid chromatography: method validation and in application to the assessment of renal function. *Biomed. Chromatogr.* **29**, 410–415 (2014).

- [26] Pormsila, W.; Krähenbühl, S.; Hauser, C. P.: Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for uric acid determination in biological fluids. *Anal. Chim. Acta* **636**:2, 224–228 (2009).
- [27] Wang, S-P.; Liao, Ch-S.: Comparison of ion-pair chromatography and capillary zone electrophoresis for the assay of organic acids as markers of abnormal metabolism. *Journal of Chromatography A* **1051**:1-2, 213–219 (2004).
- [28] Tůma, P.; Samcová, E.; Duška, F.: Determination of ammonia, creatinine and inorganic cations in urine using CE with contactless conductivity detection. *J. Sep. Sci.* **31**, 2260–2264 (2008).
- [29] Lleó, A.; Cavedo, E.; Parnetti, L.; Vanderstichele, H.; Herukka, K. S.; Andreasen, N.; Ghidoni, R.; Lewczuk, P.; Jeromin, A.; Winblad, B.; Tsolaki, M.; Mroczko, B.; Visser, J. P.; Santana, I.; Svenningsson, P.; Blennow, K.; Aarsland, D.; Molinuevo, J. L.; Zetterberg, H.; Mollenhauer, B.: Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nature Reviews Neurology* **11**:1, 41–55 (2015).
- [30] Kubán, P.; Seiman, A.; Kaljurand, M.: Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis: Principles, applications and limitations. *John Wiley & Sons, Inc.*, 41–64 (2013).