

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**SEPARACE ENANTIOMERŮ KYSELINY MLÉČNÉ
METODOU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY
S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:
Vedoucí diplomové práce:

Romana Kupcová
Analytická chemie
RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce RNDr. Vitězslavu Maierovi, Ph.D. za jeho trpělivost, čas a ochotu poskytnout mi cenné rady a připomínky v celém průběhu vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat M.Sc. Joanně Znalezioně za rady a pomoc v laboratoři.

SUMMARY

Chirality is one of the most significant natural phenomena. On the principal of chiral interaction is taking place most of the key processes in living cells. Chiral separation or separation of enantiomers is an important and very interesting area of research, because it was shown that optical isomers can have very different behavior in living organisms. Optical isomers (enantiomers) have practically identical physical and chemical properties, therefore means for their separation must be highly selective and effective. Capillary electrophoresis is used and it is very powerful tool for solving this problem. The advantage of capillary electrophoresis is simplicity of method, high sensitivity and resolution, speed of analysis, small sample consumption as well as low consumption of reagents and possibilities of automatization.

The aim of this thesis was the develop method for chiral separation of D- and L-lactic acid using capillary electrophoresis with mass spektrometry (CE-MS) with vancomycin as chiral selector. D- and L-lactic acid is an important component of food, which is represented in the form of individual enantiomers (D-,L-lactic acid), which are either pure or in a specific ratio, or as a racemate. Enantiomers are characterized by differences in taste, aroma, nutritional values and this effects influence quality of food. Enantioselective analysis of D,L-lactic acid can be used to control fermentation processes, ageing process, storage conditions, technological processing and evaluation of microbial contamination in food and drinks.

Moreover, lactic acid as one of the key metabolite exists as two enantiomers. Lactic acid is produced from pyruvic acid under anaerobic conditions. In mammals L-lactic acid as main form is produced in metabolism. In addition, L-lactic acid may also be produced by bacterial fermentation in the gastrointestinal tract. The optical isomers of L-lactic acid, D-lactic acid, also exists in mammals even though its amount is approximately 1.0% relative to L-lactic acid. D-Lactic acid, found in human physiologic fluids, generally is produced from the metabolism of carbohydrate by the action of D-lactate dehydrogenase in presence of intestinal bacteria which is ingested in foods and absorbed from bacteria in the gut, and formed by the glyoxalase pathway. Simultaneous determination of D- and L-lactic acid is very important for subsidiary diagnosis of some metabolic disease such as diabetes mellitus, short bowel syndrom.

The developed method was applied to the determination of D- and L-lactic acid in real samples of beer and human blood serum. Chiral separation of lactic acid by using

of CE-MS while yet not routine method, thus the thesis may be in the future subject to further research in medicine and pharmacy.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Kyselina mléčná.....	9
2.1.1. Chemické a fyzikální vlastnosti kyseliny mléčné.....	10
2.1.2. Optická aktivita mléčné kyseliny.....	10
2.2. Kvašení.....	11
2.2.1. Mléčné kvašení- anaerobní glykolýza.....	11
2.2.2. Mléčné bakterie.....	12
2.2.3. Ostatní druhy kvašení	13
2.3. Kyselina mléčná ve svalech.....	14
3. Kapilární elektroforéza	15
3.1. Elektroosmotický tok a elektroforetická migrace	15
4. Separace enantiomerů	18
4.1. Separace enantiomerů pomocí kapilární elektroforézy.....	19
4.2. Chirální selektor	20
4.2.1. Vankomycin chlorid	22
4.3. Přehled prací zabývajících se stanovením kyseliny mléčné	24
5. Hmotnostní spektrometrie.....	27
5.1. Hmotnostní spektrometrie-kapilární elektroforéza.....	29
5.1.1. Základní princip ionizace elektrosprejem.....	31
5.1.2. Využití metody CE-MS.....	33
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
6.1. Chirální separace kyseliny mléčné	34
6.1.1. Přístrojové vybavení.....	34
6.1.2. Chemikálie a vzorky	34
6.1.3. Kovalentní pokrytí kapiláry	35
6.1.4. Experimentální podmínky.....	36
6.1.4.1. Analýza reálných vzorků	42
7. VÝSLEDKY A DISKUZE	43
8. SOUHRN	51
9. ZÁVĚR	52
10. SEZNAM LITERATURY	53

1. ÚVOD

Chiralita je bezesporu jeden z nejvýznamnějších přírodních fenoménů. Na principu chirálních interakcí se odehrává většina klíčových procesů v živých buňkách. Chirální separace neboli separace enantiomerů jsou důležitou a velice zajímavou oblastí výzkumu, neboť bylo dokázáno, že optické izomery mohou mít značně rozdílné chování v živých organismech. Protože optické izomery (enantiomery) mají prakticky totožné fyzikálně-chemické vlastnosti, prostředky pro jejich dělení musí být vysoce selektivní a separace musí být dostatečně účinné. A právě kapilární elektroforéza je hodně používaným a vysoce výkonným nástrojem pro řešení tohoto problému. Výhodou kapilární elektroforézy je především jednoduchost metody, vysoká citlivost a rozlišovací schopnost, rychlost analýzy, malý objem vzorku potřebný pro analýzu, nízká spotřeba činidel a rozsáhlé možnosti automatizace.

Cílem této práce bylo vyvinutí metody chirální separace D-,L-mléčné kyseliny s využitím kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií a vankomycinem jako chirálním selektorem. D-,L-mléčná kyselina je důležitou součástí potravin, ve kterých je zastoupena ve formě jednotlivých enantiomerů (D- a L-mléčná kyselina), které jsou buď čisté, nebo v určitém specifickém poměru, anebo jako racemáty. Enantiomery se vyznačují rozdíly v chuti, vůni, výživové hodnotě, a tím ovlivňují celkovou kvalitu potravin. Enantioselektivní analýza kyseliny mléčné může být využita při kontrole fermentačních procesů, stárí, skladovacích podmínek, technologického zpracování a hodnocení mikrobiální kontaminace v potravinách a nápojích.

Navíc, kyselina mléčná jako jedna z klíčových metabolitů existuje ve dvou izomerních stavech. Kyselina mléčná se vyrábí z kyseliny pyrohroznové za anaerobních podmínek. Živočišné tkáně produkují v metabolismu pouze L-mléčnou kyselinu. Kromě toho, může být L-mléčná kyselina produkována bakteriálním kvašením v lidském zažívacím traktu. D-mléčná kyselina se vyskytuje v lidských fyziologických tekutinách, ale je jí tam pouze 1 % oproti L-mléčné kyselině. D-mléčná kyselina je produkována metabolismem sacharidů působením D-laktátdehydrogenasy za přítomnosti střevních bakterií, které se do těla dostávají z potravy glykolýzou. Současné stanovení D- a L-mléčné kyseliny je velice důležité pro určení diagnózy některých metabolických onemocnění jako je cukrovka a záněty tlustého střeva.

Vyvinutá metoda byla aplikována na stanovení D- a L-mléčné kyseliny v reálných vzorcích piva a krevního séra. Vzhledem k tomu, že chirální separace mléčné kyseliny zatím nepatří mezi rutinní metody, může být tato práce v budoucnu předmětem dalšího zkoumání a to hlavně v oblasti lékařství či farmacie.

2. Teoretická část

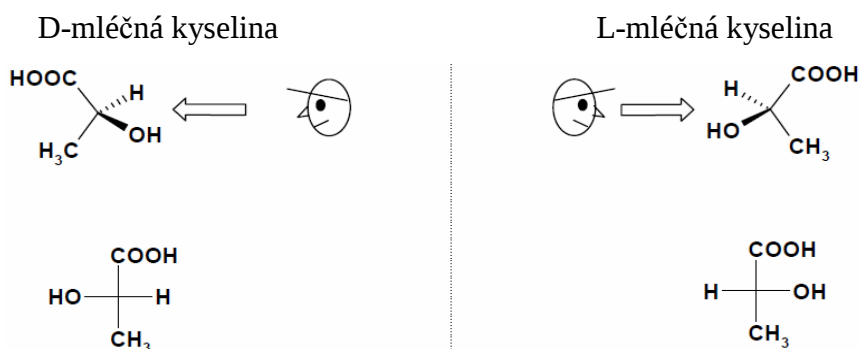
2.1. Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je karboxylová kyselina se sumárním vzorcem $C_3H_6O_3$ a chemickým názvem 2-hydroxypropanová kyselina, také známá jako kyselina mléka. Je poměrně dobře rozpustná ve vodě. Má hydroxylovou skupinu na uhlíku sousedícím s karboxylovou skupinou, takže se jedná o α -hydroxykyselinu. Poprvé byla kyselina mléčná izolovaná v roce 1780 švédským lékárníkem a chemikem Carlem Wilhelmem Scheelem¹.

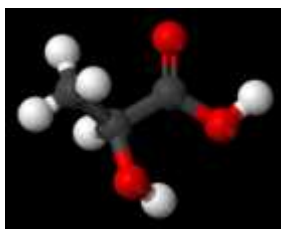
Vyskytuje se ve dvou optických izomerech (obrázek 1), jeden je známý jako L-(+)- mléčná kyselina a druhý jako D-(-) mléčná kyselina. Pro každý izomer kyseliny mléčné existuje příslušný enzym: L-laktátdehydrogenasa (L-LDH) a D-laktátdehydrogenasa (D-LDH). Lidský organismus produkuje pouze L-mléčnou kyselinu a proto je v organismu pouze L-LDH².

Jde tedy o významnou sloučeninu (obrázek 2), která hraje důležitou roli v několika biochemických procesech. Je přirozeně produkována bakteriemi mléčného kvašení a nachází se tudíž v mnoha fermentovaných mléčných výrobcích (jogurty, sýry), ale také v kyselém zelí, nakládané zelenině, konzervovaném mase a rybách. Používá se proto v pekařství, pivovarnictví, k přípravě limonád a při barvení a zušlechťování textilií. Díky svým antiseptickým vlastnostem se používá také v mastech, ústních vodách a jako prostředek k ošetřování vlasů.

Sůl kyseliny mléčné se nazývá laktát se vzorcem $CH_3-CHOH-COO^-$. Laktát vzniká při nadměrné námaze, kdy se glukosa spaluje za nedostatku kyslíku ve svalech. To se projevuje bolestí svalů po pohybu.



Obrázek 1: optické izomery kyseliny mléčné



Obrázek 2: prostorový model kyseliny mléčné

2.1.1. Chemické a fyzikální vlastnosti kyseliny mléčné

Základní fyzikální a chemické vlastnosti mléčné kyseliny jsou uvedeny v následující tabulce⁴.

Tabulka 1: Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny mléčné

<i>OBEČNÉ</i>	
Systematický název	kyselina 2-hydroxypropanová
Triviální název	kyselina mléčná
Sumární vzorec	$C_3H_6O_3$
Vzhled	bílý prášek
<i>VLASTNOSTI</i>	
Molární hmotnost	90,08 g/mol
Teplota tání	53 °C
Teplota varu	122 °C
Hustota	1,209 g/cm ³
Disociační konstanta pK_a	3,86
<i>ZAŘAZENÍ</i>	
Registrační číslo CAS	50-21-5
	10326-41-7 (D)
	79-33-4 (L)

2.1.2. Optická aktivita mléčné kyseliny

V molekule kyseliny mléčné se vyskytuje chirální centrum - asymetrický uhlíkový atom, který je zodpovědný za tzv. optickou aktivitu této látky. Existují vždy dvě stereoizomerní formy (optické izomery - enantiomery), mezi nimiž je vztah jako mezi předmětem a jeho odrazem v zrcadle. D- a L- izomery kyseliny mléčné se označují podle toho, zda hydroxylová skupina na opticky aktivním uhlíkovém atomu směřuje

doprava (D-) nebo doleva (L-). Z chemického hlediska jsou oba izomery rovnocenné, liší se ale některými fyzikálními vlastnostmi.

Optická aktivita látek spočívá v jejich schopnosti otáčet rovinu polarizovaného světla. Podle směru otáčení rozlišujeme pravotočivou a levotočivou (+ nebo -) formu kyseliny mléčné. D-mléčná kyselina stáčí rovinu polarizovaného světla doprava a L-mléčná kyselina doleva. Směs obou enantiomerů se nazývá racemická směs, která rovinu polarizovaného světla nestáčí.

2.2. Kvašení

Kvašení neboli fermentace je biotechnologický proces nebo-li přeměna látky za účasti enzymů mikroorganismů. Při tomto procesu probíhají v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů chemické přeměny organických látek, obvykle sacharidů, a vznikají látky energeticky chudší nebo se nové látky syntetizují. V potravinářství se fermentace využívá při výrobě alkoholických nápojů, octa, droždí, kysaných mléčných výrobků, zrání sýrů, kynutí těsta, výrobě fermentovaných uzenin, škrobů, organických kyselin aj. Fermentace se využívá i v řadě jiných oborů: např. k likvidaci odpadních vod či ropných skvrn, při silážování krmiv, v chemickém a farmaceutickém průmyslu.

Cílem procesu fermentace je⁵:

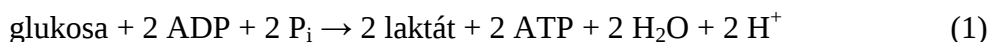
- příprava určité látky
- dosažení určitých senzorických vlastností potraviny
- zvýšení nutriční hodnoty potraviny
- prodloužení trvanlivosti

2.2.1. Mléčné kvašení - anaerobní glykolýza

Anaerobní organismy v cytosolu zpracovávají pyruvát, který vzniká z glukosy a mléčným kvašením je přeměňován na laktát. K této přeměně jsou využívány mikroorganismy, ale děj je běžný i v živočišných tkáních - v kosterních svazech. Pracuje-li sval intenzivně, probíhá anaerobní reoxidace NADH na NAD^+ za redukce pyruvátu na laktát, tím se obnovuje koenzym NAD^+ , který je nezbytný pro glykolýzu. Laktát je zčásti přenesen mimo buňky a krví se dostává do jater, kde se znovu mění na

glukosu, a zčásti se při dostatku kyslíku oxiduje zpět na pyruvát, který je odebírán aerobní oxidací^{6,7}.

Celkový proces odbourávání glukosy se nazývá anaerobní glykolýza a probíhá podle úhrnné rovnice (1):



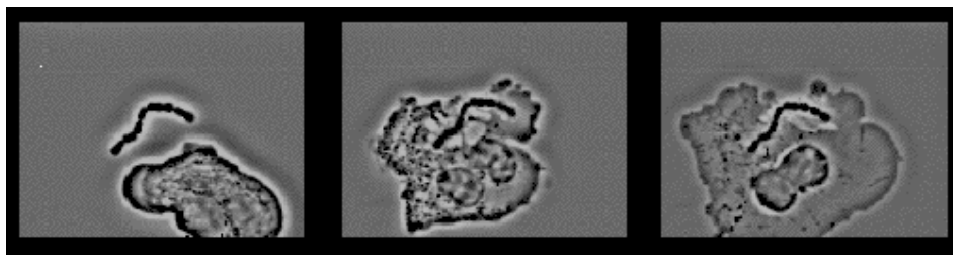
Tento děj poskytuje pouze 2 ATP na molekulu glukosy. Vedlejším produktem jsou vodíkové ionty, které snižují pH buňky, tj. vyvolávají acidózu, a jsou příčinou únavy kosterního svalstva. Proto tento orgán může pracovat za anaerobních podmínek jen za předpokladu, že v následujícím klidovém období budou laktát a vodíkové ionty vyplaveny do jiné tkáně (jater), kde budou zpracovány za aerobních podmínek.

U mikroorganismů schopných žít dlouhodobě za anaerobních podmínek, např. kvasinek, odpadá možnost odbourání laktátu v odděleném orgánu a produkt redukce pyruvátu může být odstraňován pouze difúzí do okolního prostředí⁸.

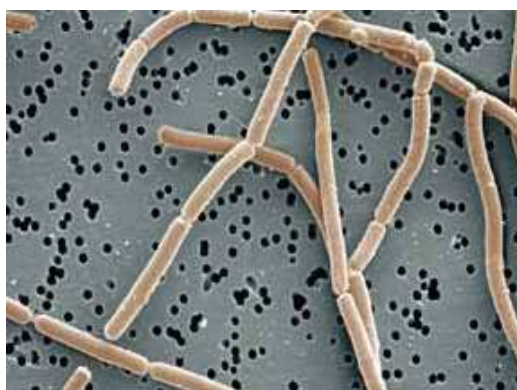
2.2.2. Mléčné bakterie

Mléčné bakterie jsou skupinou bakterií, kterou spojují morfologické, metabolické a fyziologické vlastnosti. Jako konečný produkt při fermentaci všechny tvoří kyselinu mléčnou. V přírodě jsou velmi rozšířené a nalézají se rovněž v lidském zažívacím traktu. Nejznámější je jejich použití při výrobě fermentovaných mléčných výrobků.

Základní rody, které tvoří mléčné bakterie (obrázek 3), jsou *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*^{9,10}. Třídění mléčných bakterií do různých rodů je založeno hlavně na morfologických vlastnostech, způsobu kvašení glukosy, růstu při různých teplotách, prostorové konfiguraci mléčné kyseliny, schopnosti růstu v přítomnosti vysoké koncentrace soli a na základě posouzení tolerance ke kyselému či bazickému prostředí. Mléčné bakterie představují skupinu nejen s velkým ekonomickým významem, ale rovněž se uplatňují při udržování a zlepšování lidského zdraví^{11,12}.



Streptococcus: tito streptokoci zabíjejí bílé krvinky¹³



*Lactobacillus*¹⁴

Obrázek 3: Základní rody mléčných bakterií

2.2.3. Ostatní druhy kvašení

Alkoholové kvašení: Tento druh kvašení se odehrává v kvasinkách, jedná se o mesofilní a acidorezistentní mikroorganismy. Alkoholové kvašení je lidmi odedávna využíváno k přípravě alkoholických nápojů. Tato fermentace vyžaduje anaerobní podmínky, přičemž z jednoduchých cukrů vzniká ethanol a oxid uhličitý. Proces probíhá ve dvou reakcích. V první nastává dekarboxylace pyruvátu na acetaldehyd účinkem pyruvátdekarboxylasy, ve druhé reakci pak dochází k redukci acetaldehydu na ethanol účinkem alkoholdehydrogenasy⁶.

Máselné kvašení: Je štěpení cukru nebo kyseliny mléčné na kyselinu máselnou za vývoje oxidu uhličitého a vodíku. Z mnoha druhů bakterií, které se požívají při máselném kvašení, jsou nejobvyklejší bakterie rodu *Clostridium butyricum*, které vytvářejí vedle kyseliny mléčné také butanol. Máselné kvašení se uplatňuje při máčení

lnu, výrobě pšeničného škrobu kysáním a při zrání některých sýrů, ale je nežádoucí při přípravě siláže.

Propionové kvašení: Je anaerobní kvašení způsobované mikroorganismy z čeledi *Propionibacteriaceae*. Tyto mikroorganismy zkvašují cukry přes kyselinu pyrohroznovou na kyselinu propionovou. Činností těchto mikroorganismů vzniká i kyselina mléčná. Propionové bakterie jsou přítomny v mléce a v mléčných výrobcích.

Octové kvašení: Probíhá za přístupu kyslíku, kdy bakterie octového kvašení mění alkohol na acetaldehyd a následně na kyselinu octovou. Tímto způsobem se připravují vinné octy.

2.3. Kyselina mléčná ve svalích

Laktát je přirozeně se vyskytující organická sloučenina produkovaná v těle každého jedince. Nachází se kromě svalů i v krvi a v dalších tělesných orgánech. Tělo potřebuje laktát ke své funkci. Laktát jako metabolit lidského těla se tvoří ve svalových buňkách při intenzivní pohybové činnosti bez přístupu kyslíku. Někdo je na působení laktátu odolnější a někdo se s ním vyrovnává hůře. Během intenzivního zatížení není namáhaný sval dostatečně zásoben kyslíkem. Aby však přesto dosáhl požadovaného výkonu, svalová buňka získává energii odbouráváním krevního cukru (glukosy) bez kyslíku, tedy kvašením. Přitom vzniká kyselina mléčná, resp. laktát - anion kyseliny mléčné, který na nějakou dobu překyselí svalovou tkáň.

Když se laktát v těle nahromadí, způsobuje svalovou únavu. Stupeň svalové únavy odpovídá zvýšené hladině kyseliny mléčné, snížení zásob glykogenu, sníženému pH v tkáních a změně prokrvení. Velké množství kyseliny mléčné může v extrémním případě zablokovat vápníkové ionty, a tím úplně znemožnit svalovou kontrakci. Svalová únava je signálem pro přerušení práce, než dojde k vyčerpání, a popřípadě poškození svalu. Odolnost proti svalové únavě se dá zvýšit pravidelným tréninkem¹⁵.

Kyselina mléčná se vyskytuje kromě svalů také v biologických vzorcích jako je krev a plazma. V posledních letech je měření laktátu v krvi aktuálním tématem, neboť jeho hladina ve tkáních koresponduje s několika fyziologickými i patologickými ději. Laktát je důležitý indikátor bolesti a potíží a navýšení jeho koncentrace v krvi vede k otravě krve a hromadnému selhání orgánů. Existuje několik vrozených vad metabolismu, které zapříčiňují hyperlaktámii - nadbytek kyseliny mléčné. Měření laktátu v krvi je důležité ve sportovní medicíně a fyziologii.

3. Kapilární elektroforéza

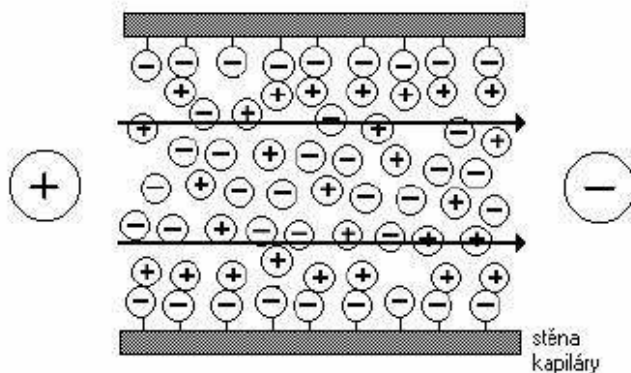
Kapilární elektroforéza (CE) patří spolu s chromatografií a hmotnostní spektrometrií k důležitým metodám v analytické chemii vůbec. CE umožňuje provádět separace analytů ze směsi a je komplementární metodou k chromatografickým metodám. Mezi její hlavní výhody patří jednoduché provedení, minimální spotřeba vzorku, možnost automatizace a široké spektrum aplikací. Nevýhodou kapilární elektroforézy je ovšem malá koncentrační citlivost a robustnost.

Princip elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Protože rychlost pohybu částice závisí na velikosti její molekuly a náboji, různě velké a různě nabitě molekuly se budou pohybovat odlišnou rychlostí a mohou být od sebe separovány.

3.1. Elektroosmotický tok a elektroforetická migrace

Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je jedna z hybných sil kapilární elektroforézy (obrázek 4). Při $\text{pH} > 2$ se ionizují silanolové skupiny na vnitřním povrchu křemenné kapiláry. Na vnitřním povrchu se tak vytvoří záporný povrchový náboj a vzniká elektrická dvojvrstva. To má za následek přitahování kationtů putujících ke katodě, ale vzhledem k malým rozměrům kapiláry (průměr menší než 0,1 mm) dochází ke strhávání aniontů, které poté také putují ke katodě. Elektrická dvojvrstva je charakterizována veličinou ζ potenciál, která popisuje potenciálový spád mezi nabitou stěnou kapiláry a okolní kapalinou. Rychlost EOF je po celé délce kapiláry stejná. Díky elektroosmotickému toku, lze separovat kationty i anionty zároveň.



Obrázek 4: Elektroosmotický tok v křemenné kapiláře¹⁶

Vznik elektroosmotického toku může mít pozitivní vliv na průběh separace, ale v některých případech je vhodné elektroosmotický tok potlačit nebo jeho směr obrátit.

Elektroosmotický tok lze potlačit:

- pH menším než 2
- modifikací silanových skupin (kovalentní pokrytí vnitřní stěny kapiláry)
- přidáním tenzidů do základního elektrolytu lze potlačit nebo změnit směr elektroosmózy
- zvýšením iontové síly pracovního elektrolytu
- přidávkem organických rozpouštědel
- zvýšením viskozity pracovního elektrolytu

Velikost EOF je možno vyjádřit jako rychlost nebo pohyblivost pomocí rovnice (2), (3):

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \xi}{\eta} \cdot E \quad (2)$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \xi}{\eta} \quad (3)$$

ξ ...zeta potenciál

ϵ ...dielektrická konstanta

η ...viskozita

Elektroforetická migrace

Elektroforetická migrace je druhý a zároveň hlavní transportní děj probíhající v CE a jedná se o pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Směr pohybu (pokud zanedbáme vliv elektroosmotického toku) závisí na znaménku náboje nabitě částice a polaritě vloženého elektrického pole. Jeho rychlost závisí na velikosti náboje, intenzitě vloženého elektrického pole a odporu okolního prostředí. Pro srovnání pohyblivostí jednotlivých částic v různých systémech zavádíme tzv. elektroforetickou mobilitu (rychlost pohybu nabitě látky v elektrickém poli o jednotkové intenzitě).

Velikost rychlosti daného iontu lze vypočítat podle rovnice (4):

$$v = \mu_e \cdot E = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \cdot E \quad (4)$$

v ...rychlost pohybu iontů

q ...náboj

E ...intenzita elektrického pole

r ...poloměr iontů

μ_e ...elektroforetická mobilita

η ...dynamická viskozita okolního prostředí

Pozorovaná rychlost migrace analytu je dána součtem vektorových rychlostí elektroforetické migrace a elektroosmózy.

Zdánlivá a iontová mobilita

Experimentálně měřenou veličinou je migrační čas t_m , ze kterého lze vypočítat tzv. zdánlivou mobilitu μ_a , podle rovnice (5):

$$\mu_a = \frac{l \cdot L}{t_m \cdot U} \quad (5)$$

l ...je efektivní délka kapiláry (vzdálenost od místa injekce po detekční celu)

t_m ...je migrační čas

L ... je celková délka separační kapiláry

U ...je vložené napětí

Zdánlivá mobilita je vektorovým součtem efektivní mobility μ_{ef} (efektivní mobilita je elektroforetická mobilita nabité částice pro dané prostředí – teplota, použitý

elektrolyt, rozpouštědlo, pH, iontová síla, použití aditiv, ve kterém migrace probíhá) a mobility elektroosmotického toku μ_{eof} , podle rovnice (6):

$$\mu_a = \mu_{ef} + \mu_{eof} \quad (6)$$

Zdánlivá mobilita není fyzikální konstantou, tzn. jde o komplexní veličinu a nelze ji využít pro kvalitativní účely a pro porovnání s hodnotami získanými za jiných podmínek. Když se zbavíme těchto omezujících vlastností získáme tzv. iontovou limitní mobilitu μ_0 , tj. hodnota μ_{ef} extrapolovaná na nulovou iontovou sílu při konstantní teplotě a při částici v plně disociované nebo protonizované formě. Poté už jde o fyzikální konstantu, kterou lze nalézt v tabulkách^{17,20}.

4. Separace enantiomerů

Chiralita je jeden z nejvýznamnějších přírodních fenoménů, který organické molekuly vhodné konstituce mohou vykazovat. Chiralita se projevuje existencí dvou konstitučně identických molekul (enantiomerů), které se liší pouze ve vzájemném uspořádání atomů a vazeb v prostoru. Nutné podmínky v konstituci vyžadované pro existenci chiralit jsou lehce splnitelné pro většinu složitějších organických látek, a tak není překvapující, že většina přírodních látek představuje chirální sloučeniny. Na principu chirálních interakcí se odehrává většina klíčových procesů v živých organismech. Velká část z celkového počtu dnes známých látek vykazuje optickou aktivitu a řada chirálních látek se v přírodě vyskytuje pouze jako samostatný enantiomer. Velký význam má optická aktivita hlavně u léčiv, neboť pouze jeden enantiomer může být účinným léčivem pro organismus a druhý z izomerů je buď neúčinný, a nebo často vykazuje značnou toxicitu. Dokonce může inhibovat účinky druhého využívaného izomeru. Mezi oblastmi, kde se chiralitě věnuje zvýšená pozornost, patří především farmakologie a klinická chemie (enantioselektivní účinky léčiv), potravinářská chemie (různé vůně a chuti ovlivněné pouze rozdílnou stereoselektivitou) a v neposlední řadě oblast pesticidních přípravků (např. studium účinnosti a metabolismus jednotlivých enantiomerů). Separace a stanovení optických izomerů je proto předmětem zájmu nejen chemiků zabývajících se separačními metodami, ale i pracovníků z jiných oborů¹⁸.

V tabulce 2 jsou uvedeny způsoby realizace enantioselektivního prostředí v separačních technikách.

Tabulka 2: Způsoby realizace enantioselektivního prostředí v separačních technikách¹⁹

Separací metoda	Umístění chirálního selektoru
Chromatografické metody	
GC	chirální stacionární fáze
kapilární GC	CS pokrytý nebo navázaný na stěnu kapiláry
HPLC	chirální stacionární fáze CS přidán do mobilní fáze
kapilární LC	chirální stacionární fáze CS přidán do mobilní fáze
Elektromigrační metody	
kapilární zónová elektroforéza	CS přidán do základního elektrolytu
izotachoforéza	CS přidán do vedoucího elektrolytu
micelární elektrokinetická chromatografie	micely chirálních tenzidů, směsné micely
kapilární gelová elektroforéza	CS zabudován v gelu CS přidán do základního elektrolytu
kapilární elektrochromatografie	chirální stacionární fáze CS přidán do základního elektrolytu

4.1. Separace enantiomerů pomocí kapilární elektroforézy

Chirální separace uskutečňované pomocí technik CE jsou dnes na vysoké úrovni teoretického i praktického poznání, to můžeme dokázat velkým počtem publikací. Na Web of science je doposud abstrahováno nepřeborné množství publikovaných prací zabývajících se kapilární elektroforézou a chirálními separacemi. Kapilární elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších technik pro separaci chirálních látek. Výhoda CE oproti jiným chromatografickým metodám spočívá téměř v neomezeném výběru chirálních selektorů a jejich výrazně nižší spotřebě než v případě chromatografických technik. CE v mnoha případech umožňuje získat excelentní rozlišení enantiomerů díky velkému množství výhod:

- nízká spotřeba vzorku, pracovního elektrolytu i chirálního selektoru
- možnost využití široké řady chirálních selektorů a možnost využití i kombinací několika různých chirálních selektorů pro dosažení požadovaného rozlišení
- možnost změny koncentrace a záměny chirálního selektoru za jiný
- vysoká separační účinnost dovoluje separovat enantiomery i s využitím velmi malé selektivity

Tyto hlavní výhody povyšují CE jako hlavní metodu pro chirální separaci různých enantiomerů. Úspěšnost separace dvojice enantiomerů je závislá na selektivitě použitého separačního systému. Pro úspěšnou chirální separaci je třeba, aby došlo k vzájemné interakci mezi selektorem a enantiomery a navíc, aby se tato interakce alespoň v jedné fyzikálně-chemické vlastnosti lišila. Další podmínkou pro úspěšnou chirální separaci je i dostatečně velká rychlost dynamické rovnováhy při chirální separaci²⁰.

4.2. Chirální selektor

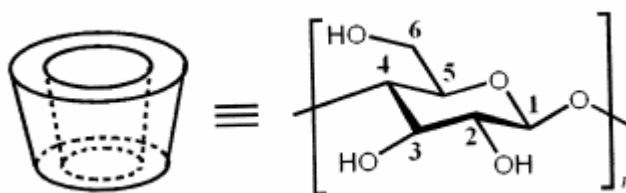
Pro úspěšnou separaci je nutná volba vhodného chirálního selektoru (tab.3). Chirální selektor by měl splňovat několik základních podmínek:

- měl by být stereoselektivní a tvořit přechodné diastereomerní komplexy s každým enantiomerem
- měl by být v pracovním elektrolytu dobře rozpustný a chemicky stabilní
- neměl by interferovat při detekci
- kinetika tvorby diastereomerních komplexů by měla být rychlá

Tabulka 3: Nejpoužívanější chirální selektory v CE²⁰

Chirální selektory	
α -CD	DM- β -CD
β -CD	TM- β -CD
γ -CD	HP- β -CD
Aniontové CD	Kationtové CD
Chirální crown ethery	Makrocyclické antibiotika
Komplexy ligandové výměny	Chirální tenzidy-žlučové kyseliny

Jak je patrné z tabulky 3, cyklodextriny a jejich deriváty patří mezi nejpoužívanější a nejčastěji používané chirální selektory. Jsou to neutrální přírodní cyklické oligosacharidy, které v prostoru vypadají jako hrnek bez dna na obrázku 5. Jejich relativně hydrofobní kavita s vysokou elektronovou hustotou umožňuje vytvářet inkluzní komplexy s nepolárními analyty o vhodných rozměrech. Enantiosektivita cyklodextrinů je daná asymetrickými uhlíky glukózy a hydroxylovými skupinami primárních a sekundárních alkoholů na vstupních prstencích. Afinity kavitě cyklodextrinů k analytu vzrůstá s jeho narůstající hydrofobicitou²¹. Mezi aniontové CD patří CM- β -CD, S- β -CD, SBE- β -CD a mezi kationtové CD se řadí například amino- β -CD a QA- β -CD²⁰.

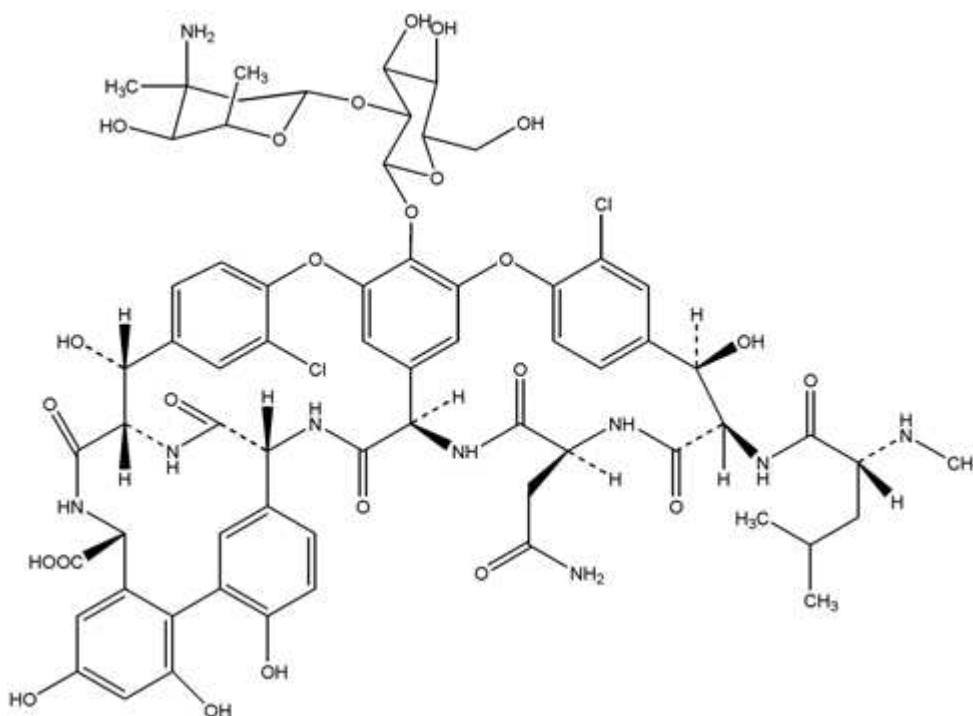


Obrázek 5: Tvar molekuly α -, β -, γ - CD ($n = 6,7,8$) s číslováním atomů

Další velkou skupinou chirálních selektorů jsou makrocyclické antibiotika. Tyto chirální selektory mají několik chirálních center. V kapilární elektroforéze se používají základní 4 makrocyclické antibiotika: vankomycin, teikoplanin, ristocetin a rifamicin.

4.2.1. Vankomycin chlorid

Vhodným selektorem pro enantioseparaci D,L-mléčné kyseliny pomocí CE je makrocyclické antibiotikum vankomycin chlorid²², proto se zde omezím pouze na základní popis vlastností a využití vankomycinu v CE. Vankomycin chlorid je makrocyclické antibiotikum, které ve své struktuře obsahuje 18 stereogenních center a funkční skupiny různé povahy (karboxylová, amino-, amidoskupina, hydroxylové skupiny, aromatické kruhy apod.), které mohou zprostředkovat různé typy interakcí mezi vankomycinem a enantiomery mléčné kyseliny. Chemická struktura vankomycinu je na obrázku 6.



Obrázek 6: Chemická struktura vankomycinu

V tabulce 4 jsou uvedeny vybrané fyzikálně chemické vlastnosti vankomycin chloridu.

Tabulka 4: Fyzikálně chemické vlastnosti vankomycin chloridu

Charakteristika	Vankomycin
Molekulová hmotnost	1449
Počet stereogenních center	18
Počet mikrocyklů	3
Počet hydroxylových skupin	9 (z toho 3 fenolické)
Počet aminoskupin	2
Počet karboxylových skupin	1
Počet amido skupin	7
Počet aromatických jader	5
pI	7,2
Relativní stabilita	až 2 týdny
pK _a	2,9;7,2;8,6;9,6;10,5;11,7

Díky přítomnosti 3 makrocyclických kruhů a dvou postranních řetězců, které jsou tvořené N-methyleucinem a sacharidovým dimerem, vytváří vankomycin v roztoku tvar připomínající koš. Tento koš tak umožňuje částečnou inkluzní komplexaci se separovanými enantiomery. Vankomycin je velmi dobře rozpustný ve vodě a v polárních organických rozpouštědlech. Vankomycin je vhodný selektor hlavně pro separaci karboxylových kyselin.

I když vankomycin chlorid poskytuje velmi dobré rozlišení při separacích enantiomerů, má jeho využití v CE několik nevýhod. Díky své struktuře poměrně silně absorbuje UV záření zejména v intervalu od 190 do 260 nm. Navíc se vankomycin velmi ochotně v kyselém prostředí sorbuje na stěnu nepokryté křemenné kapiláry a dochází tak ke vzniku rozmytých zón analytů.

Pro eliminaci uvedených problémů se používají nejčastěji kombinace dvou technik. Jde o využití kovalentně pokryté křemenné kapiláry (dochází k eliminaci záporného náboje na vnitřní stěně kapiláry a tím k omezení nežádoucí sorpce na stěnu kapiláry) a techniky částečného plnění kapiláry elektrolytem obsahující vankomycin (eliminace vankomycinu z detekčního okénka)²⁰.

4.3. Přehled prací zabývajících se stanovením kyseliny mléčné

V následujících tabulkách 5 a 6 jsou uvedeny práce zabývající se stanovením mléčné kyseliny, které byly doposud publikovány.

Tabulka 5: Přehled prací zabývajících se stanovením kyseliny mléčné technikou kapilární elektroforézy.

TECHNIKA	SEPARACE	PRACOVNÍ ELEKTROLYT	TYP VZORKU	LOD	CITACE
CE	bez chiral.separace	Tris-HCl+laktát+NAD ⁺	buňky	0,3 U/ml	23
	bez chiral.separace	Tris-HCl	erytrocyty	0,017 U/ml	24
	bez chiral.separace	Na ₂ HPO ₄ +NaH ₂ PO ₄	sliny	7,6.10 ⁻⁷ mol/l	25
	bez chiral.separace	fosfát	lymfocyty	—	26
	bez chiral.separace	kyselina	krev	8,0.10 ⁻⁶ mol/l	27
		ε-aminokapronová +			
		mandlová kyselina			
	bez chiral.separace	glukosa+Tris+	erytrocyty	20 amol	28
		fluorescein disodný			
	chirální.separace	fosfát-Tris+TTAB+	plasma	D-laktát: 20,0.10 ⁻⁶ mol/l	29
		2HP-β-CD		L-laktát: 15,0.10 ⁻⁶ mol/l	
	chirální.separace	fosfátový pufr+2HP-β-CD	potravin	—	30
	chirální.separace	fosfátový pufr+2HP-β-CD	tělní tekutiny	D-laktát: 0,1 mg/ml	31
				L-laktát: 0,04 mg/ml	
	bez chiral.separace	TTAB+TMA	směs kyselin	0,05-0,7 mg/l	32

Jak je patrné z tabulky 5, byly publikovány pouze tři práce zabývající se chirální separací D-,L-mléčné kyseliny kapilární elektroforézou, ostatní analýzy byly provedeny bez chirální separace. Stanovení kyseliny mléčné v publikovaných pracích bylo prováděno na potravinových výrobcích a klinických vzorcích u lidí a zvířat.

V tabulce 6 je uveden přehled prací zabývajících se stanovením mléčné kyseliny pomocí ostatních analytických technik.

Tabulka 6: Přehled ostatních prací zabývajících se stanovením kyseliny mléčné.

TECHNIKA	Podmínky separace	Typ vzorku	LOD	Citace
HPLC	Chiralpak AD-RH (silikagel	moč	$1,0 \cdot 10^{-9}$ mol/l	33
	pokrytý amylosou tris			
	(3,5-methylfenylkarbamátem))			
HPLC	Chiralcel OD-RH (celulosa	krev	od 10 mol/l	34
	trisfenylkarbamát)		do 20 μ m/ml	
HPLC	polystyren-divinylbenzen	potraviny	—	35
Biosenzor	biosenzor založený na	rajčata	$2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l	36
	katalyticky aktivních			
	enzymech-LOX,D-LDH,HPO			
Biosenzor	na biosenzoru	mléčné	od $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l	37
	imobilizovaný LOX	výrobky	do $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l	
Biosenzor	grafit-teflonová kompozitní	potraviny	od $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/l	38
	elektroda s LOX		do $0,9 \cdot 10^{-6}$ mol/l	
Enzymová elektroda	TBO-toluiden blue O a LDH	potraviny	$4,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l	39
	byly imobilizovány			
	na povrchu elektrody			
Enzymová elektroda	na biosenzoru	potraviny	$1,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l	40
	imobilizovaný LOX			
Amperometrický	LOX imobilizovaný na	vino	—	41
biosenzor	polymeru			
Uhlíková elektroda	uhlíková elektroda	biologické	$2,75 \cdot 10^{-9}$ mol/l	42
	nasycená NADH	tekutiny		
Amperometrický	biosenzor na bázi H_2O_2	pot	—	43
biosenzor				
Potenciometrický	elektroda modifikovaná	plasma	$2,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l	44
biosenzor	polyakrylovou vrstvou			
FIA	—	sýr	$2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l	45
Membránová	kapalná membrána	—	—	46
	chir.selektor: N-3,5-dinitro-			
separace	benzoyl-L-alaninoktylester			
HPLC	Chiralpak AD-RH	krev	—	47
HPLC	Mechanismus ligandové	tělní	$1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l	48
	výměny(centrální atom Cu^{2+})	u zvířete		
2D-HPLC	fluorescenční derivatizace	plasma	2 μ M	49
	NBD-PZ			
HPLC	reverzní fáze s chirálním	krev	$0,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l	50
	selektorem N,N-dioktyl-L-alanin			

TECHNIKA	Podmínky separace	Typ vzorku	LOD	Citace
HPLC	fluorescenční derivatizace	víno	od 300 fmol	51
	NBD-PZ		do 360 fmol	
GC/MS	chirální SF: heptakis-B-CD	moč	—	52

Jak je patrné z tabulky 6, tak pro stanovení kyseliny mléčné se v praxi používají elektroanalytické metody s využitím biosenzorů. Analýzy kyseliny mléčné pomocí biosenzorů se řadí na první místa, neboť jsou schopny selektivně a rychle analyzovat vzorek, výhoda je také v jejich snadné přípravě, rychlé odezvě a nízkých nákladech, avšak nevýhodou této metody je, že neumožňuje separaci enantiomerů, problémy biosenzorů souvisejí také s jejich reprodukovatelností a skladovatelností. Nejčastěji používané biosenzory pro stanovení kyseliny mléčné jsou laktátové biosenzory na bázi laktát oxidasy a laktát dehydrogenasy.

Používají se také chromatografické metody jako GC a HPLC, tyto metody jsou rychlé, spolehlivé a překonávají spoustu nedostatků u jiných např. enzymatických metod. Mezi výhody těchto metod patří, že dokáží současně stanovovat oba enantiomery kyseliny mléčné.

Plynová chromatografie má řadu výhod: je jednoduchá, procesy v plynné fázi jsou rychlé, ale nevýhodou této metody je, že je omezená těkavostí analytů, umožňuje dělit pouze 30% všech známých látek. Počet stanovitelných analytů lze rozšířit převedením málo těkavých látek na těkavější deriváty. Tyto reakce ale vedou k dalším problémům, např. vznik vedlejších reakcí, dále pak mobilní fáze v GC, nosný plyn, je inertní a tudíž neumožňuje ovlivňovat separaci.

Jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení kyseliny mléčné a také enantiomerů kyseliny mléčné je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. U této metody se volí buď nepřímá metoda (derivatizace chirálními činidly a separace následných diastereomerů na achirálních stacionárních fázích) nebo metoda přímá (použití chirálních stacionárních fází). Z tabulky 6 můžeme vidět, že byly použity jak nepřímé metody (derivatizace s NBD-PZ), tak i metody přímé, nejčastěji používané chirální stacionární fáze byly na bázi celulosy a amylosy. Přímé metody se vyznačují oproti derivatizačním postupům řadou výhod, především není nutno provádět se vzorkem komplikované procedury, další problém u nepřímých metod je, že činidla použitá k derivatizaci musí být nejvyšší optické čistoty, tudíž jsou drahá, dalším

problémem je, že může dojít k racemizaci, epimerizaci během derivatizace. Nepřímé separace jsou méně vhodné pro kvantitativní účely a nevhodné pro semipreparativní a preparativní účely. Použití chirálních stacionárních fází představuje výraznou časovou úsporu, ale jsou drahé a také může dojít k racemizaci během separačního procesu. Metoda HPLC umožňuje dělit 80% všech známých látek. Stanovení kyseliny mléčné v publikovaných pracích bylo prováděno na potravinových produktech (mléčné výrobky, víno, zelenina) a klinických vzorcích jako krev, moč, plasma⁵³.

5. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Je to metoda destrukční, spotřeba látky k analýze je však velmi malá (řádově v pikogramech). Tato technika vypovídá o primární struktuře analyzované látky, určuje izotopový poměr prvků ve vzorku, umožňuje analýzu komplexních směsí a nekovalentních komplexů, umožňuje stanovit molekulovou hmotnost, identifikuje proteiny.

Základními kroky v této technice jsou:

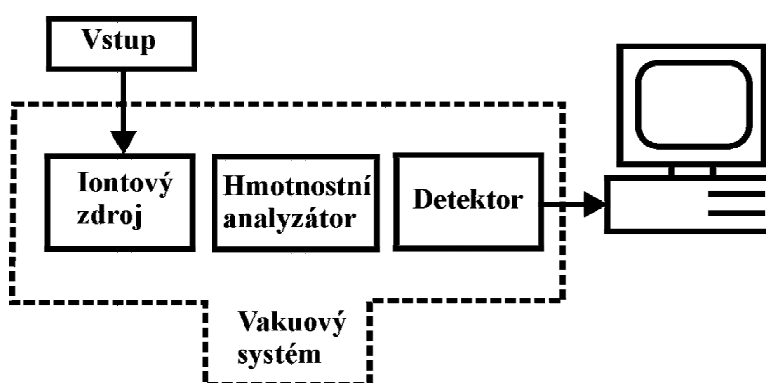
- odpaření vzorku a rozpouštědla
- ionizace analytů
- akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru
- separace iontů
- detekce iontů

Při ionizaci molekuly dochází obvykle k těmto interakcím:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1, $M \rightarrow M^+ + e^-$ | ionizace molekuly a vznik molekulárního iontu o jednotkovém náboji |
| 2, $M^+ \rightarrow A^+ + m^0$ | rozpad molekulárního iontu na fragmentový ion a elektroneutrální částici |

Těžištěm analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na jejich identifikaci. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor, který umožňuje kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony nebo kapiláry provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra. Vývoj přístrojové instrumentace pro hmotnostní spektrometrii, i pro kombinované systémy jako je spojení CE-MS, GC-MS a LC-MS jsou v současné době komerčně dostupné a jsou plně využívány v analytických laboratořích pro rutinní analýzy. Aplikovatelnost těchto metod je velmi široká a můžeme se s nimi běžně setkávat ve všech důležitých oblastech chemické analýzy.

Na obrázku 7 je uvedeno blokové schéma hmotnostního spektrometru.



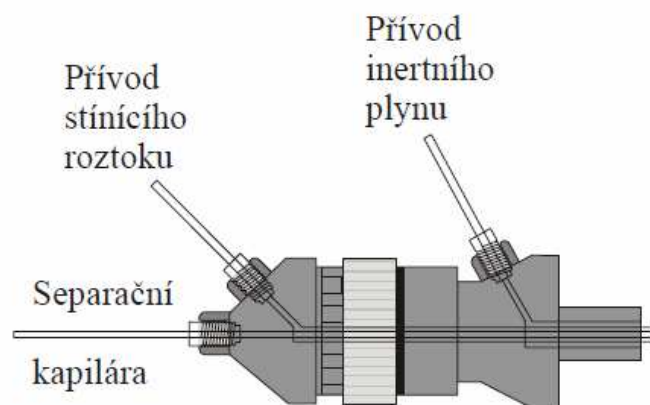
Obrázek 7: Schéma hmotnostního spektrometru:

Běžný hmotnostní spektrometr obsahuje součásti obsažené na obrázku 7. Vstup vzorku, který umožňuje převedení vzorku analyzované látky z prostředí vnějšího do prostoru iontového zdroje. Iontový zdroj slouží jako disperzní prvek, který umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých poměrech hmotnosti ku náboji. Detektor, na který je směřován proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem, poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Tento signál je pak převeden do počítače a vhodným programovým softwarem zpracován do formy hmotnostních spekter. Hmotnostní spektrometr pracuje za velmi nízkých tlaků a nedílnou součástí zařízení je vakuový čerpací systém^{54, 55}.

5.1. Kapilární elektroforéza - hmotnostní spektrometrie

CE je separační technika, která se používá pro separaci látek různé povahy, počínaje separací iontů, malých molekul jako aminokyselin a konče separací biomolekul jako jsou peptidy, proteiny a nukleové kyseliny. V neposlední řadě je dnes CE využívána pro separaci bází DNA. Běžně je CE spojována s detekčními technikami jako je UV spektrofotometrie a nebo LIF. Nevýhodou spojení CE a UV detekce je nízká citlivost a můžeme ji použít pouze pro látky, které absorbují UV záření. Nevýhodou fluorescenční detekce je, že ne všechny látky mají chromofory vykazující dostatečnou fluorescenci a jejich přímá detekce není vždy možná. Pak je nutno buď analyty derivatizovat reakcí s derivatizačním činidlem, které vhodný chromofor obsahuje, nebo použít jiný druh detekce jako je například MS, popřípadě použít nepřímou detekci. Výhodou spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie jako detekční techniky je, že poskytuje nezbytné informace pro přímé stanovení struktury analytu^{56,57}.

CE-MS je analytická technika využívající spojení kapilární elektroforézy jako vysoce účinné separační techniky a hmotnostní spektrometrie jako další separační a detekční techniky. Spojení CE-MS může být velice silný nástroj pro separaci, identifikaci a charakterizaci molekul. Jedinou nevýhodou této metody je složité spojení, které je nejčastěji realizováno pomocí iontového zdroje typu elektrosprej. Problémy způsobuje především příliš nízký průtok základního elektrolytu, který protéká vlivem EOF přes separační kapiláru. Běžný průtok základního elektrolytu se pohybuje v řádu nl/min, to je ale nedostatečné množství pro vytvoření stabilního spreje ve zdroji ESI. A proto chybějící průtok kapaliny musíme dodat z externího zdroje, pro tyto účely se používá tzv. stínící (pomocná) kapalina (sheath liquid) (obrázek 8). Pomocná kapalina je nejčastěji vodný roztok těkavé soli a vhodného organického rozpouštědla jako je nejčastěji methanol nebo isopropanol. Po přidavku této stínící kapaliny se celkový objem přiváděné kapalné fáze (tj. nosného elektrolytu a stínícího roztoku) pohybuje v řádu jednotek $\mu\text{l/min}$.



Obrázek 8: Možná realizace spojení CE s ESI zdrojem s přidavným tokem stínícího roztoku⁵⁴

Dalším problémem je realizace vodivého spojení konce separační kapiláry se zemnicí elektrodou vysokonapěťového zdroje pro elektroforézu. Výhodou stínícího roztoku je, že umožňuje vodivé spojení mezi koncem separační kapiláry a zemnicí elektroforetickou elektrodou. Abychom podpořili tvorbu spreje a zvýšili jeho stabilitu, je do prostoru ESI zdroje přiváděn pod vhodným tlakem inertní zmlžovací plyn (nejčastěji N_2). Aby nedocházelo ke kontaminaci iontového zdroje a také k přerušení tvorby spreje během analýzy, měli bychom použít jako nosný elektrolyt těkavé soli typu mravenčan amonný a acetát amonný. Bohužel se v CE běžně používají pufrů typu fosfát sodný nebo borát sodný, tyto látky nejsou těkavé, a proto nevyhovují podmínkám pro spojení CE-ESI-MS.

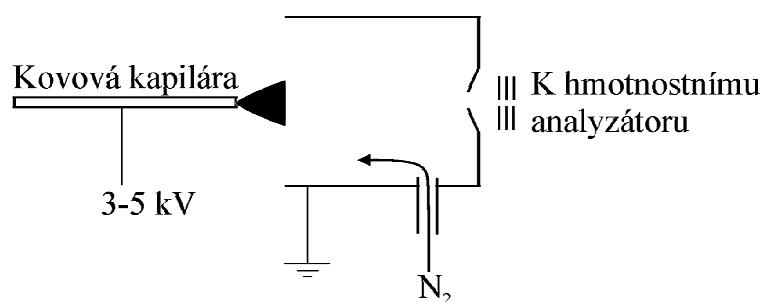
Pokud bude dostatečný přívod stínícího roztoku, můžeme pracovat i při nulové hodnotě elektroosmotického toku v kyselých nosných elektrolytech nebo v kapilárách s kovalentním pokrytím vnitřní stěny kapiláry kde je zanedbatelný EOF. U kovalentně pokrytých kapilár může dojít k nežádoucí migraci iontů ze stínícího roztoku do separační kapiláry a k ovlivnění složení nosného elektrolytu. Abychom tomuto zabránili, přidáváme do nosného elektrolytu a stínící kapaliny stejnou sůl o stejné koncentraci.

Důležitá je volba složení a průtok stínícího roztoku, který ovlivňuje citlivost a mez detekce a stanovení. Nejčastěji se jako stínící kapalina používá s vodou mísitelná rozpouštědla jako jsou methanol a isopropylalkohol. Ovlivnit separaci může i volba pH stínící kapaliny. Je nutné, aby při zvoleném pH byly separované a následně ionizované látky dostatečně disociovány.

Z hlediska minimalizace šumu je důležité zajistit plynulý přívod stínící kapaliny do zdroje ESI. Proto je velice výhodné použít kvalitní chromatografické pumpy, u nichž je zajištěn bezpulsní průtok kapaliny^{54,56}.

5.1.1. Základní princip ionizace elektrosprejem

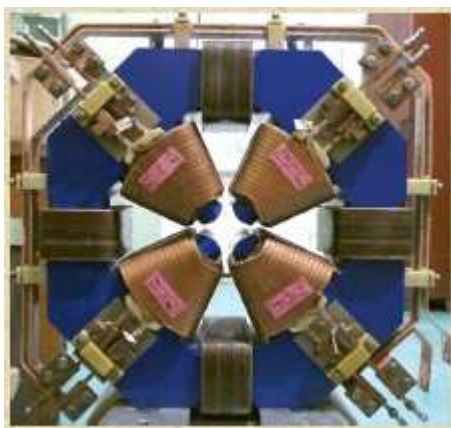
V současnosti je to nejčastěji používaný iontový zdroj pro spojení mnoha technik s hmotnostní spektrometrií jako například spojení CE-MS a LC-MS. Schéma elektrospreje je uvedeno na obrázku 9. Kapalná fáze je přivedena do kovové kapiláry a k jejímu rozprašování dochází vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím této kapiláry, na níž je vysoké napětí v řádu jednotek kilovoltů, a protielektrodou, která je uzemněna. Během elektrosprejování dochází ke vzniku velmi malých kapiček kapalné fáze, které mají vysokou hustotu povrchového náboje. Tyto kapičky jsou vlivem horkého inertního plynu rychle vysušeny, přecházejí do plynné fáze a vzniklé ionty jsou vedeny vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. V tomto procesu mohou vznikat kladně i záporně nabitě ionty v závislosti na polaritě napětí, které je vloženo na protielektrodu⁵⁸.



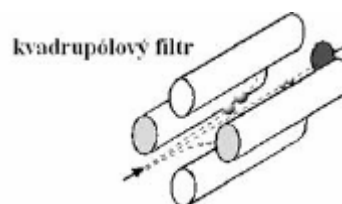
Obrázek 9: Schéma ESI zdroje⁵⁴

Kvadrupólový analyzátor

Separátor iontů dělí vytvořené ionty podle poměru m/z , kde m je hmotnost iontů a z je počet elementárních nábojů, které ion nese. Je to vhodný analyzátor pro spojení techniky CE-ESI-MS. Je to dynamický analyzátor, dělení iontů je dosaženo jejich průchodem mezi čtyřmi kovovými tyčemi (obrázek 10). Kvadrupólový analyzátor je sestaven ze čtyř tyčí kruhového průřezu, které jsou symetricky uspořádány vzhledem k podélné ose (obrázek 11). Tyče jsou propojeny tak, že vždy protilehlé dvojice jsou na společném potenciálu. Ionty se pohybují v elektrickém poli o délce 20-30 cm. Pole má dvě složky: stejnosměrnou a radiofrekvenční cca 10 MHz. Napětí vložená na dva páry tyčí jsou zvolena v daném časovém okamžiku tak, aby mezi tyčemi proletěly pouze ionty s hodnotou m/z v určitém omezeném intervalu, případně s jedinou hodnotou m/z . V našem případě byla tato hodnota nastavena na iont s $m/z = 89 \pm 0,5$. Zbylé ionty jsou vyneseny ven z elektrického pole a zachyceny na tyčích kvadrupólu. Výhodou je relativně rychlý záznam spektra (celé spektrum získáme za dobu řádu ms), lineární stupnice hmot, tolerantnost vůči vyššímu tlaku, rozsah hmot 2-1000. Nevýhodou pak je jednotkové rozlišení, diskriminace iontů s vyšší molekulovou hmotností⁵⁹.



Obrázek 10: Příčný průřez kvadrupólovým analyzátozem⁶⁰



Obrázek 11: Schématické znázornění kvadrupólu s naznačením dráhy iontů⁶⁰

5.1.2. Využití metody CE-MS

Spojení metod CE-MS se uplatňuje hlavně v oblasti analýzy látek iontové povahy ve složitých matricích, kde se dobře uplatní vysoká účinnost kapilární elektroforézy s možností strukturně selektivní detekce hmotnostním spektrometrem. Významnou aplikační oblastí je farmaceutická analýza, kde je metoda CE-MS v praxi využívána při stanovení obsahu a strukturní charakterizaci peptidových léčiv. Také se tato metoda velmi dobře uplatňuje při analýzách biopolymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin. Toto spojení se používá jako klíčová analytická metoda v oblasti genomiky a proteomiky.

6. Experimentální část

6.1. Chirální separace kyseliny mléčné

Chirální separace mléčné kyseliny byla provedena separační metodou kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií jako detekční technikou. Byla použita ionizace elektrosprejem ve spojení s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem.

6.1.1. Přístrojové vybavení

CE-MS systém Agilent Technologies. Kapilární elektroforéza CE HP^{3D} (Agilent, Německo) s detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním spektrometrem pracující na principu jednoduchého kvadrupólu (Agilent G6130). Tok přídatné kapaliny byl zajišťován sokratickou pumpou pro kapalinovou chromatografii (Agilent G1310).

6.1.2. Chemikálie a vzorky

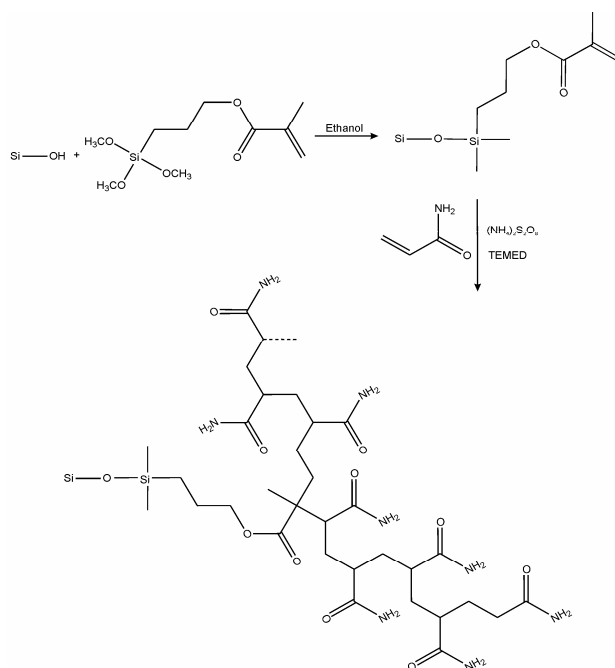
- D-laktát litný (Sigma)
- L-laktát litný (Sigma)
- octová kyselina (Sigma)
- hydroxid amonný (Fluka)
- deionizovaná voda
- vankomycin chlorid (Sigma)
- methanol (Merck)
- amoniak (Fluka)
- hydroxid sodný (Sigma)
- kyselina dusičná (Sigma)
- 3-trimethylsilylpropylmethakrylát (Sigma)
- ethanol (Sigma)
- akrylamid (Sigma)
- N,N,N',N'-tetramethylendiamin (Sigma)
- peroxodisíran draselný (Sigma)
- reálné vzorky piva a krevního séra

Všechny použité chemikálie byly p.a. čistoty.

6.1.3. Kovalentní pokrytí kapiláry

Pro chirální separaci D,L-mléčné kyseliny vankomycinem je výhodné použít pokrytou křemennou kapiláru. S pomocí pokryté křemenné kapiláry dojde k potlačení elektroosmotického toku a to umožní migraci vankomycinu směrem ke katodě (od detektoru) a mléčné kyseliny směrem k anodě (k detektoru). Detekce se pak odehrává v pracovním elektrolytu bez přítomností kationtů vankomycinu. Polyakrylamidové pokrytí je využíváno hlavně pro separace peptidů, proteinů, ale i nízkomolekulárních látek. Byla připravena kapilára s polyakrylamidovým kovalentním pokrytím. Na obrázku 12 jsou schématicky uvedené reakce probíhající při kovalentním pokrytí kapiláry akrylamidem. Postup promývání kapiláry zahrnuje několik kroků:

- křemenná kapilára se promyje 3 hodiny roztokem 1 mol/l NaOH, poté 0,5 hodiny deionizovanou vodou a nakonec se promyje 3 hodiny 1 mol/l HNO₃
- další postup zahrnuje silanizaci 1 % (v/v) roztokem 3-trimethylsilylpropylmethakrylátu v ethanolu po dobu 3 hodin
- promytí deionizovanou vodou 30 minut
- lineární polyakrylamidové pokrytí silylované kapiláry se provede roztokem 4 % (w/v) akrylamidu v čerstvě převařené a zchlazené deionizované vodě s přídavkem 0,1 % (w/v) peroxodisíranu draselného a 0,1 % (v/v) N,N,N',N'-tetramethylendiaminu (TEMED) po dobu 12 hodin
- promytí deionizovanou vodou 30 minut



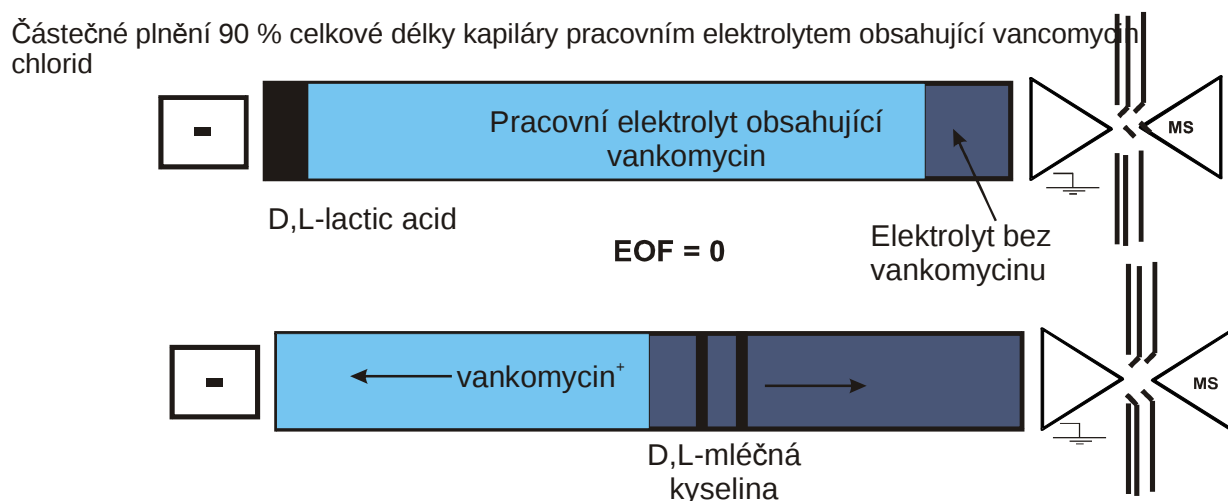
Obrázek 12: Chemické reakce probíhající při vzniku kovalentního pokrytí

6.1.4. Experimentální podmínky

Separace D,L-mléčné kyseliny byla prováděna s využitím pokryté křemenné kapiláry o celkové délce 81 cm a vnitřním průměru 50 μm . Efektivní délka pro hmotnostní spektrometr je stejná jako celková délka. Pro experiment byly použity standardní roztoky D- a L- laktátu o koncentraci 0,05 mg/ml, 5 mM vankomycin chlorid a pufr acetát amonný o koncentraci 50 mM a $\text{pH} = 4,5$. Chirální separace byla uskutečněna s využitím metody částečného plnění kapiláry pracovním elektrolytem s vankomycinem do 90 % celkové délky kapiláry. K dávkování elektrolytu obsahující vankomycin bylo využito hydrodynamické dávkování 50 mbar/1500 s. Za zónu pufru s vankomycinem byl pak nadávkován vzorek obsahující D,L-mléčnou kyselinu hydrodynamicky 50 mbar/5s. Separace kapilární elektroforézou byla prováděna při -20 kV. Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem bylo realizováno elektrosprejem. Ionizace analytů elektrosprejem byly prováděny v negativním módu při hodnotě sprejovacího napětí - 3,5 kV. Pomocná kapalina byla složena z methanolu:voda 50:50 (v/v) s přídatkem 0,13% (v/v) amoniaku. Průtok pomocné kapaliny byl nastaven na hodnotu 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Enantiomery kyseliny mléčné byly detekovány s využitím SIM módu, kde byly na kvadrupólu monitorovány pouze ionty s poměrem $m/z = 89 \pm 0,5$. Uvedená hodnota poměru m/z odpovídá iontům $[\text{M}-\text{H}]^-$. Před vlastní chirální separací D,L-mléčné kyseliny byl prostudován vliv experimentálních parametrů. Pozornost byla věnována zejména koncentraci vankomycin chloridu, průtoku přídatné kapaliny, teplotě dusíku a složení stínící kapaliny.

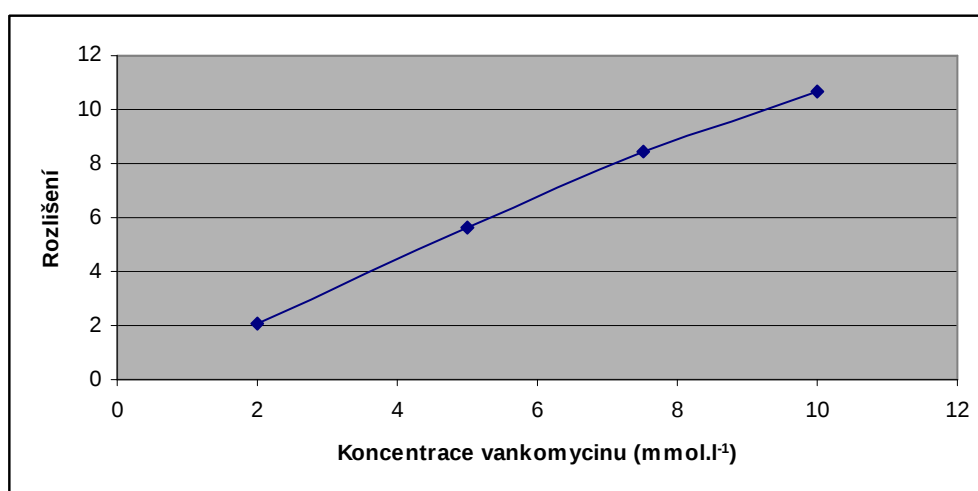
K separaci enantiomerů kyseliny mléčné byla využita technika částečného plnění kapiláry pracovním elektrolytem obsahujícím vankomycin chlorid jako chirální selektor. Vankomycin není dostatečně těkavý, a proto je nutné zabránit jeho vstupu do iontového zdroje, kde by mohl kontaminací snižovat citlivost detekce a účinnost ionizace. Využití kovalentně pokrytých kapilár a částečného plnění kapiláry elektrolytem obsahujícím vankomycin této kontaminaci zabraňuje. Vankomycin v pracovním elektrolytu je dávkován pouze do 90 % celkové délky kapiláry. Po nadávkování vzorku obsahující D,L-mléčnou kyselinu za zónu pufru s vankomycinem a vložením negativního separačního napětí dochází k protisměrné migraci enantiomerů kyseliny mléčné a vankomycinu (mléčná kyselina migruje jako anion směrem ke katodě a tedy do iontového zdroje; vankomycin, který je v pracovním elektrolytu o $\text{pH} 4,5$

kladně nabitý migruje k anodě směrem od iontového zdroje). Schéma metody částečného plnění je uvedeno na obrázku 13.



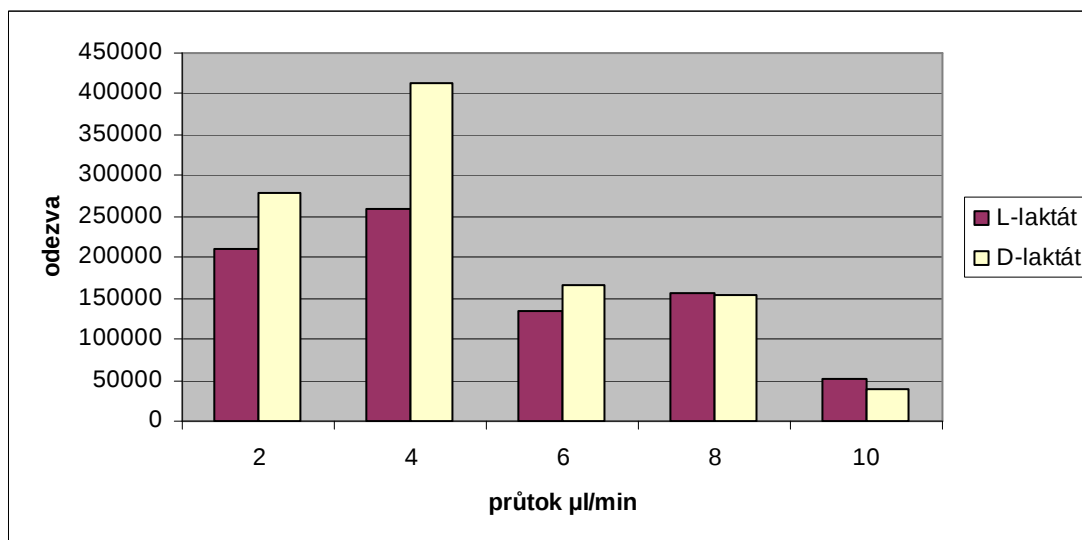
Obrázek 13: Schéma techniky částečného plnění kapiláry ve spojení s CE-MS

Závislost rozlišení D,L-laktátu na koncentraci vankomycin chloridu je na obrázku 14. Pro chirální separaci D,L-laktátu bylo studováno koncentrační rozmezí vankomycin chloridu 2 – 10 mmol.l⁻¹. Dostatečné rozlišení pro chirální separaci poskytuje roztok vankomycinu o koncentraci 5 mmol.l⁻¹. Se zvyšující se koncentrací VAN dochází dále ke zvyšování rozlišení, ale zároveň také k většímu rozmývání zón obou enantiomerů a poklesu účinnosti píků.



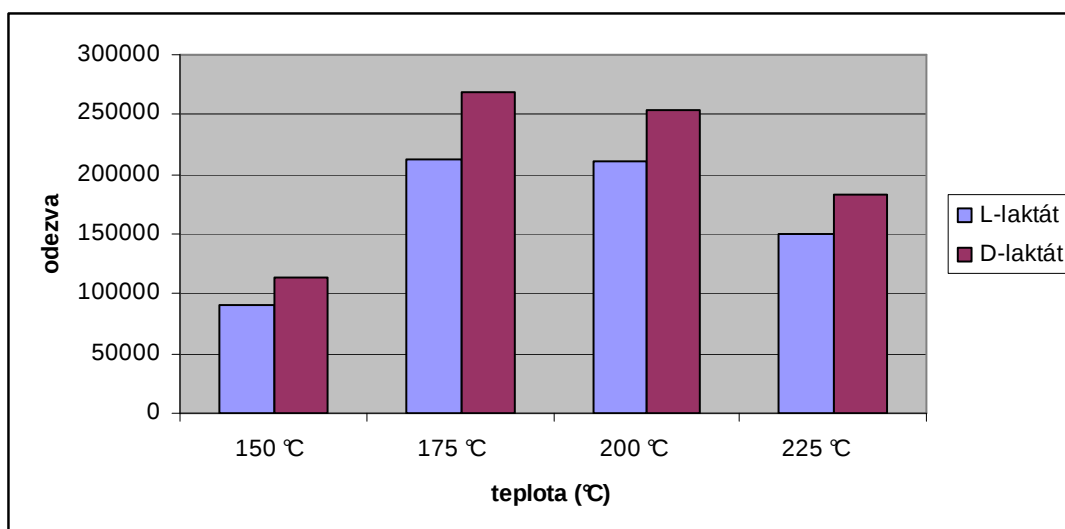
Obrázek 14: Závislost rozlišení na koncentraci vankomycin chloridu.

Účinnost ionizace elektrosprejem lze ovlivnit vhodným průtokem pomocné kapaliny. Nastavení vhodného průtoku pomocné kapaliny se musí optimalizovat, poněvadž tím ovlivňujeme citlivost, meze detekce a stanovení. Pro separaci D-, L-mléčné kyseliny bylo studováno rozmezí průtoků od 2 do 10 $\mu\text{l/min}$. Jak je patrné z obrázku 15, nejvyšší účinnost dosahuje průtok 4 $\mu\text{l/min}$, který byl použit ve všech následujících analýzách.



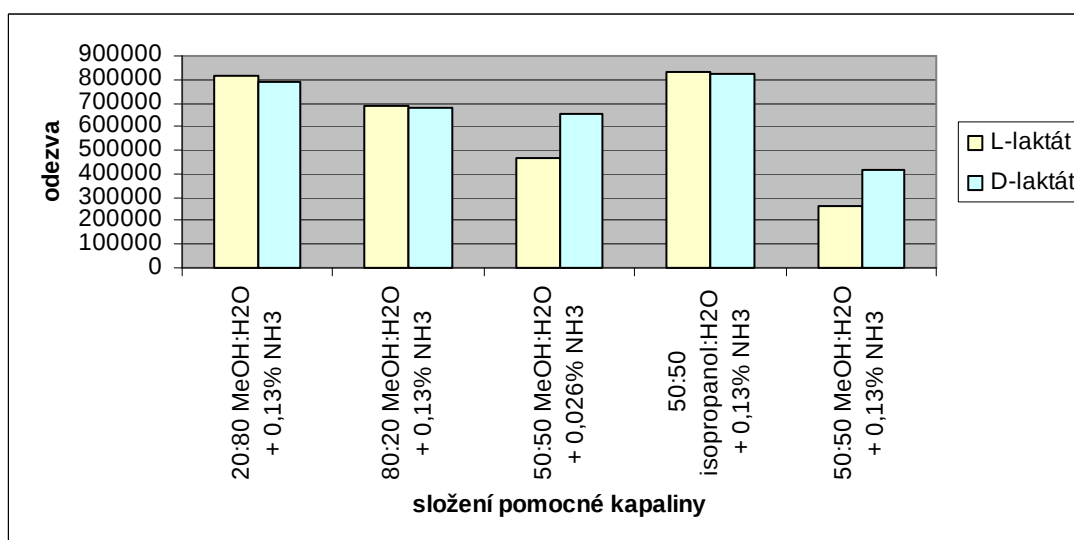
Obrázek 15: Vliv průtoku pomocné kapaliny

Účinnost separace můžeme ovlivnit také nastavením vhodné teploty sprejovací kapiláry. Bylo studováno rozmezí teplot od 150 do 225 $^{\circ}\text{C}$. Z obrázku 16 je patrné, že teplota při které dosahujeme nejvyšší účinnosti je 175 $^{\circ}\text{C}$. Při zvyšování teploty dochází k poklesu účinnosti ionizace a tím se citlivost detekce snižuje.



Obrázek 16: Vliv teploty dusíku na ionizaci

Významným parametrem ovlivňujícím citlivost techniky CE/ESI-MS je složení pomocné kapaliny. Tato kapalina jednak zajišťuje vodivé spojení elektrických okruhů kapilární elektroforézy a hmotnostního spektrometru a jednak upravuje průtok základního elektrolytu pro ionizaci elektrosprejem. Byly studovány různé poměry složení pomocné kapaliny (obrázek 17). Pro separaci D-,L- mléčné kyseliny se ukázalo být nejvhodnější složením methanol:voda 50:50 (v/v) s malým přídavkem amoniaku (0,13 %, v/v) z důvodu nejlepší opakovatelnosti migračních časů a ploch píků.

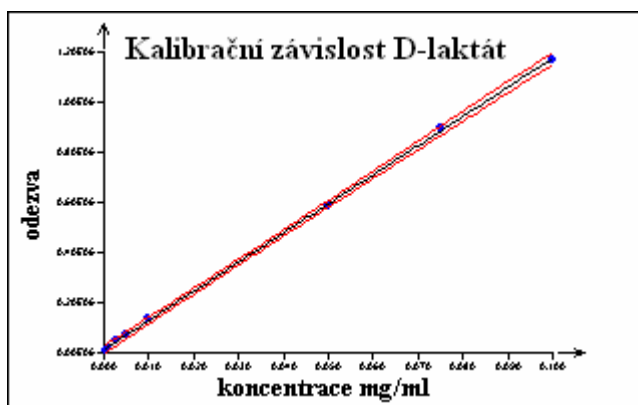


Obrázek 17: Vliv složení pomocné kapaliny

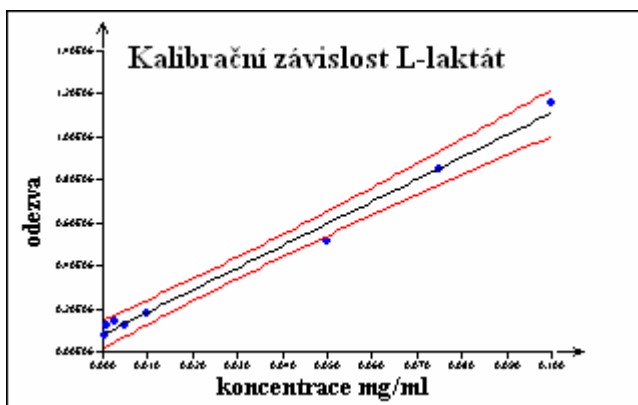
Pro účely stanovení obsahu D- a L-laktátu byla vypracována kalibrace (tabulka 7) a stanoveny některé základní charakteristiky (tabulka 8). Z dat byly zhotoveny kalibrační grafy pro D-a L- laktát (obrázek 18 a 19) za účelem zjištění kalibračních rovnic. K tomuto vyhodnocení byl použit program QC Expert.

Tabulka 7: Kalibrační data pro D- a L- laktát

c (mg/ml)	plocha	
	L-laktát	D-laktát
0,0005	77568,4	10527,1
0,001	121979,1	17085,3
0,0025	142557,9	47480,0
0,005	123462,1	69596,3
0,01	177721,2	139501,6
0,05	508738,3	582903,2
0,075	853015,9	898826,4
0,1	1153158,6	1167635,6



Obrázek 18: Kalibrační graf D-laktátu

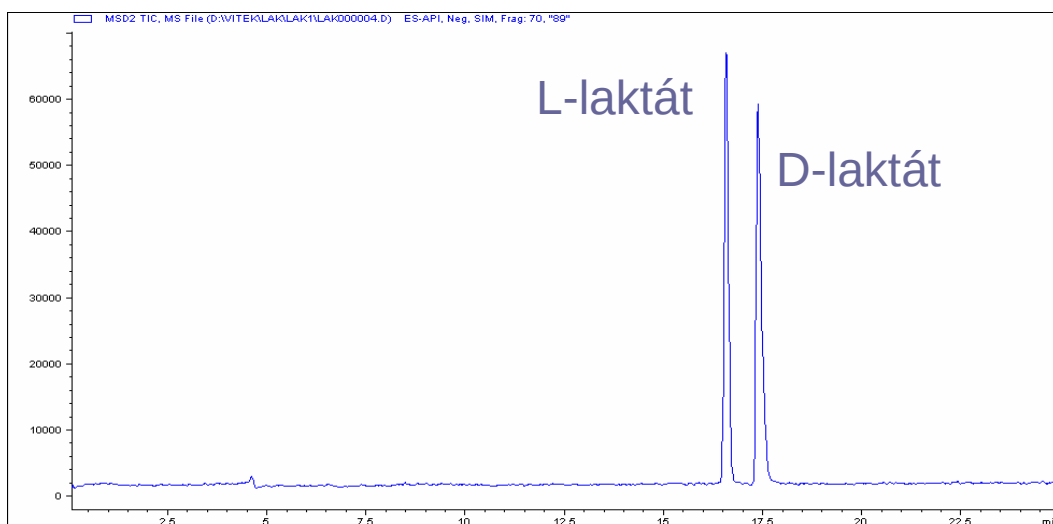


Obrázek 19: Kalibrační graf L-laktátu

Tabulka 8: Základní analytické parametry pro stanovení D-,L-mléčné kyseliny

	Rovnice kalibrační přímky	r^2	Limit detekce (mg/l)	Limit stanovitelnosti (mg/l)
D-laktát	$y = 1440020,38x + 3449,22$	0,9998	0,14	0,47
L-laktát	$y = 1351265,91x + 18731,93$	0,9948	0,16	0,53

Elektroferogram separace standardu D- a L-laktátu vankomycinem je na obrázku 20.



Obrázek 20: Podmínky separace: 0,05 mg/ml D,L-laktát, $U = -20$ kV, separační pufr: 50 mM acetát amonný $pH = 4,5$ s přidavkem 5 mM VAN (dávkování pufru s vankomycin chloridem do 90 % celkové délky kapiláry: 50 mbar/1500s

MS detekce: negativní ESI ionizace – 3,5 kV, $T = 175$ °C, tlak zmlžujícího plynu je 10 psig, průtok zmlžujícího plynu je 13 l/min, pomocná kapalina 50:50 methanol:voda (v/v) s přidavkem 0,13 % amoniaku, průtok 4 μ l/min.

6.1.4.1. Analýza reálných vzorků

Cílem aplikace vyvinuté metody chirální separace D,L-mléčné kyseliny s pomocí CE-ESI-MS byla demonstrace její aplikovatelnosti na reálné vzorky. Byly vybrány dva typy reálných vzorků.

Jako první typ vzorků byly analyzovány piva značky Pilsner urquel, Kozel, Radegast, Braník, Gambrinus, Zlatopramen a Staropramen s různou stupňovitostí.

Stupňovitost udává koncentraci rozpuštěných látek ze sladu v uvařené mladině před zakvašením. Udává kolik bylo při vaření mladiny použito sladu a kolik zkvasetilného extraktu uvařená mladina obsahuje.

Pivo obsahuje rozpuštěný CO₂, který se musí před samotnou CE-MS analýzou odstranit. Dále je nutné vzorek přefiltrovat, tak aby nedocházelo k ucpání kapiláry. Postup přípravy vzorku piva lze shrnout do následujících kroků:

- vzorek byl umístěn po dobu 15 minut na ultrazvuk
- poté bylo přefiltrováno 500 µl vzorku přes mikrofiltr (0,45 µm NYLON) do vialky
- vialka se vzorkem byla umístěna po dobu 5 minut na ultrazvuk

Dalším typem vzorku u nichž byla provedena separace a stanovení D,L-mléčné kyseliny bylo krevní sérum. Krevní sérum je možné izolovat z plné nesrážlivé krve po centrifugaci. Vzhledem k tomu, že krevní sérum obsahuje celou řadu látek vysokomolekulární povahy (proteiny apod.) je nutné provést úpravu vzorku krevního séra (deproteinaci) před vlastním nadávkováním do kapiláry. Postup přípravy vzorku krevního séra lze shrnout do následujících kroků:

- vzorek plné nesrážlivé krve byl centrifugován po dobu 10 minut při 5 000 ot/min
- 200 µl krevního séra bylo po centrifugaci odpipetováno do mikrozkušavky a přidáno 200 µl acetonitrilu jako deproteinačního činidla, směs séra a acetonitrilu byla dána na 10 minut do ultrazvuku a poté zcentrifugována 10 minut při 10 000 ot/min
- horní acetonitrilová vrstva byla odpipetována do další mikrozkušavky a acetonitrilový extrakt byl odpařen do sucha pomocí mírného proudu dusíku při laboratorní teplotě
- odparek byl rekonstituován v 200 µl deionizované vody a dávkován do kapiláry

7. Výsledky a diskuze

Koncentrace mléčné kyseliny je v mnoha zejména potravinových vzorcích poměrně vysoká. Uvedenou metodu separace D-,L- mléčné kyseliny lze tedy použít pro analýzu reálných vzorků. Jako modelové reálné vzorky byly zvoleny vzorky piva, které by měly podle odborné literatury obsahovat stejné množství D- a L- laktátu a to přibližně 50 mg/l.

V tabulce 9 jsou uvedeny výsledky analýz piva. Každá analýza piva byla provedena 5x.

Tabulka 9: Analýzy vzorků piva

Vzorky (n=5)	D-laktát (mg/l)	RSD (%)	L-laktát (mg/l)	RSD (%)
pilsner urquel 12°	10,79	2,07	6,91	4,07
kozel 10°	13,65	8,4	1,86	7,71
zlatopramen 11°	39,67	0,96	42,57	1,49
staropramen 12°	28,1	17,27	6,27	12,26
radegast 12°	11,82	0,53	1,92	5,55
radegast 10°	8,81	19,92	7,2	2,28
gambrinus 10°	6,27	1,32	< LOD*	
kozel černý	12,9	11,44	9,91	5,16
staropramen 10°	7,24	3,68	22,8	2,98

* L-laktát ve vzorku piva Gambrinus 10° nebyl detekován

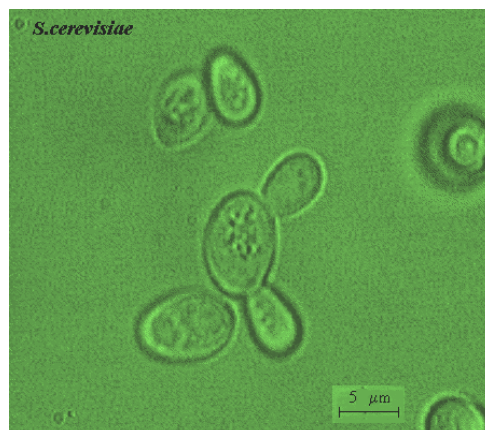
V tabulce 9 jsou uvedeny výsledky chirální separace D- a L- laktátu u vzorků piv s použitím vankomycinu jako chirálního selektoru. Jak je patrné z tabulky 9, tak množství D-laktátu ve vzorcích piva převažuje nad množstvím L-laktátu. Toto zvýšení D-laktátu v pivě je způsobeno bakteriální kontaminací při výrobě piva.

Pivo se vyrábí tzv. kvasným procesem, je to soubor mikrobiálních pochodů, při kterých probíhá kvašení neboli fermentace, tj. anaerobní (bez přístupu vzduchu) odbourání cukrů (sacharidů glukózy, maltózy a maltotriózy) za vzniku oxidu uhličitého a ethanolu. Obecné schéma mikrobiálního procesu zahrnuje:

- přípravu média
- přípravu kvasu
- vlastní fermentaci (mikrobiologický pochod, růst buněk a tvorba produktů)
- oddělení buněk a jejich případné zpracování
- izolaci produktů

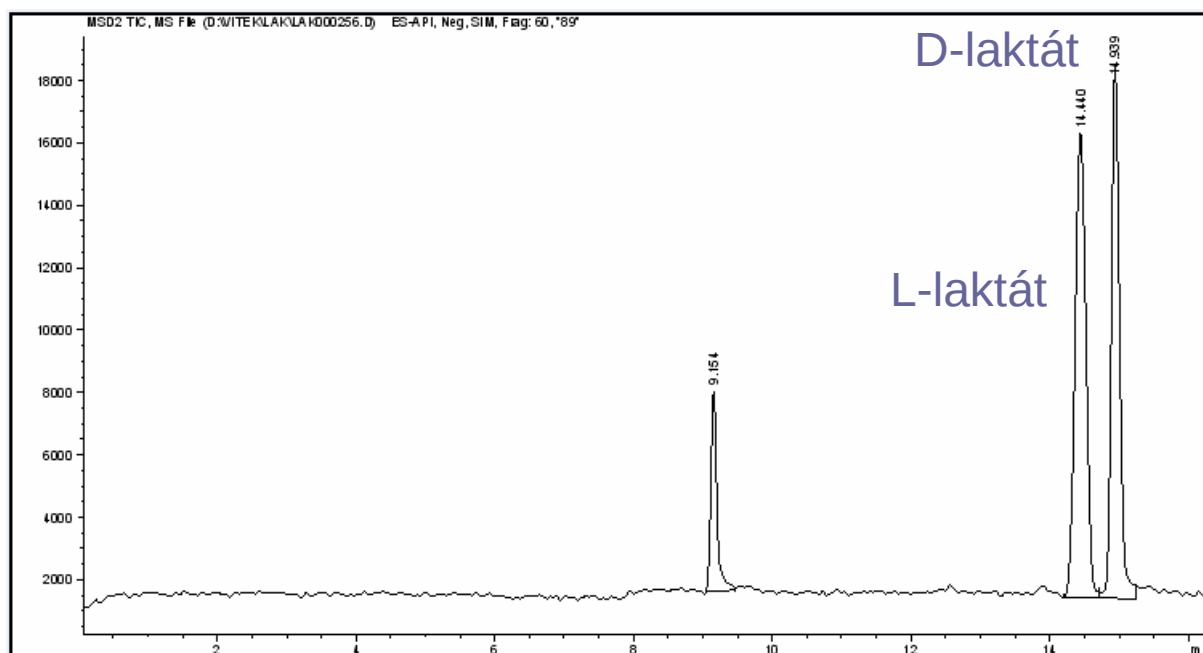
Fermentační proces nemusí mít všechny uvedené operace, protože jejich volba závisí na použité surovině, ze které se připravuje fermentační medium, pokud je produktem nápoj jako pivo, je nutné oddělit kvasinky od kvasu, jinak dochází k mikrobiální kontaminaci surovin používaných pro přípravu fermentačních médií a značně to ovlivňuje celý proces fermentace. K tomu, abychom zabránili této kontaminaci, se používají různé operace, které vedou k redukci počtu těchto nežádoucích látek, jako tepelná sterilace nebo pasterace. Složky, které jsou citlivé na působení vysoké teploty se destruuji a v těchto případech se místo tepelné sterilace využívá filtrace např. s použitím speciálních filtrů⁶¹.

Pivovarské kvasinky neboli kvasnice na obrázku 21 jsou vedlejším produktem, který se získává při výrobě piva. Jsou to jednobuněčné, kulovité organismy, které mají schopnost přeměňovat zkvasitelné cukry na alkohol a oxid uhličitý. Kromě těchto hlavních produktů metabolismu vytvářejí i řadu vedlejších metabolitů jako jsou estery, vyšší alkoholy a kyseliny, které se významnou měrou podílejí na utváření sensorických vlastností piva. K výrobě piva se používají kvasinky spodního kvašení (*Sacharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis*), které jsou po proběhnutí kvašení vynášeny na povrch fermentační kapaliny a tvoří na ni hustou pěnu a kvasinky svrchního kvašení (*Sacharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*), které se v konečné fázi shlukují ve vločky a sedimentují na dně kvasné nádoby⁶².

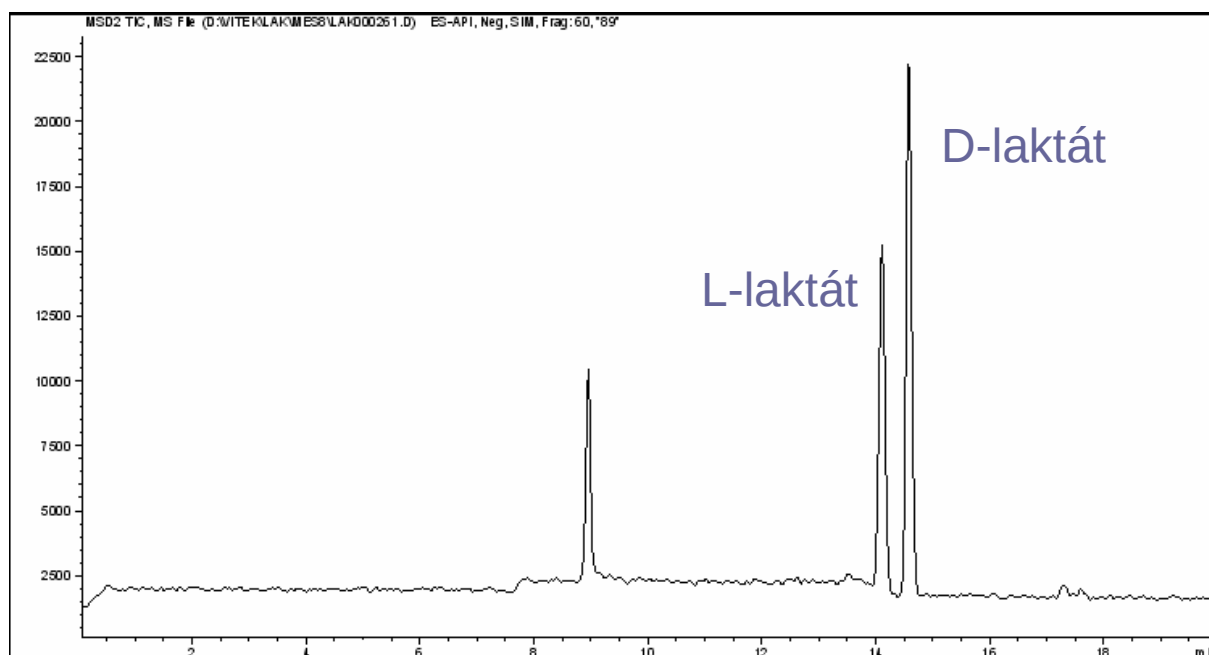


Obrázek 21: pivovarské kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*

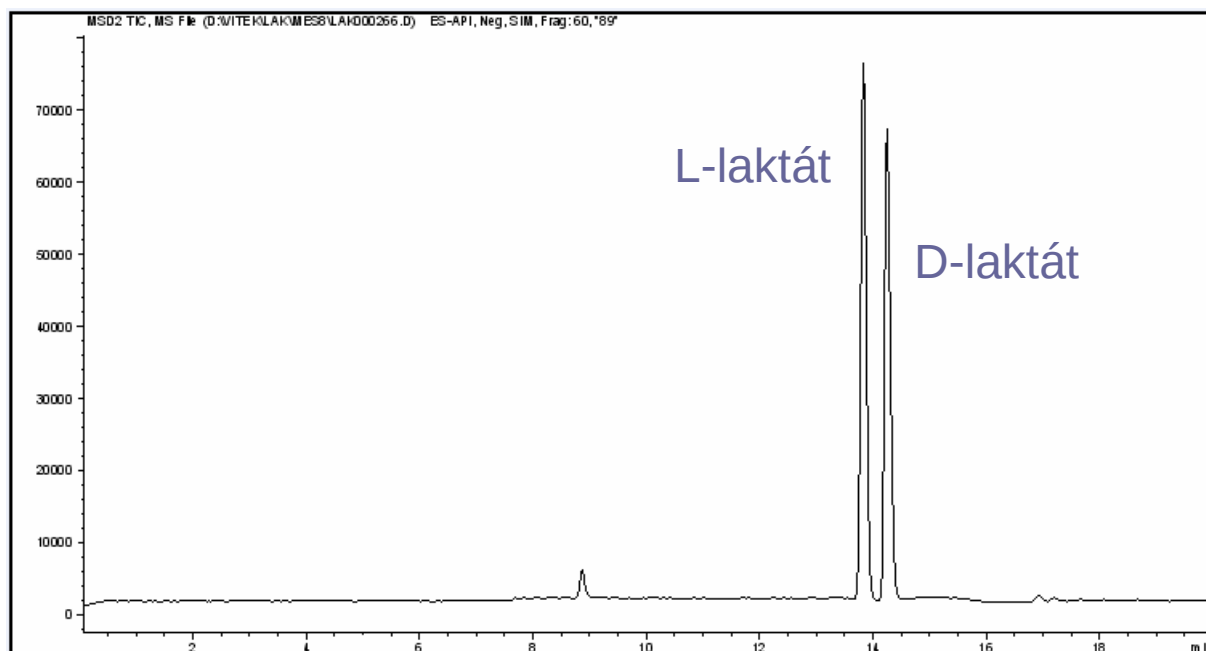
Separace D- a L- laktátu ve vzorcích piva jsou na obrázku 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 a 30. Podmínky jsou stejné jakou jsou uvedené u obrázku 20.



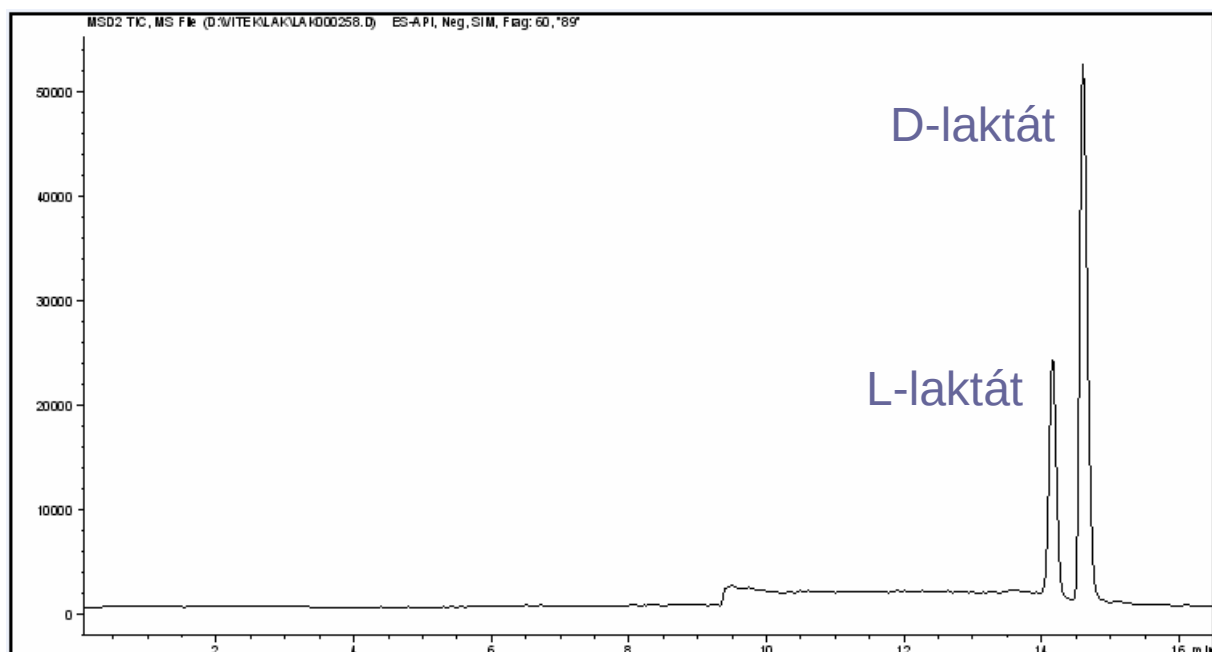
Obrázek 22: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Pilsner urquel 12°



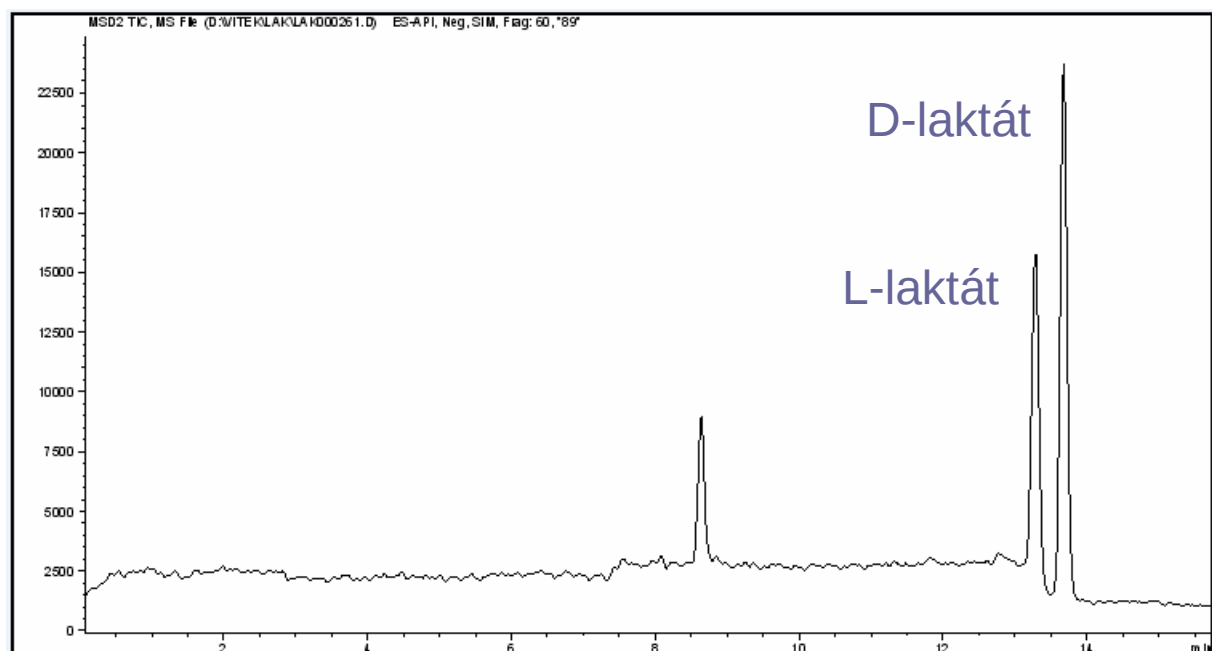
Obrázek 23: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Kozel 10°



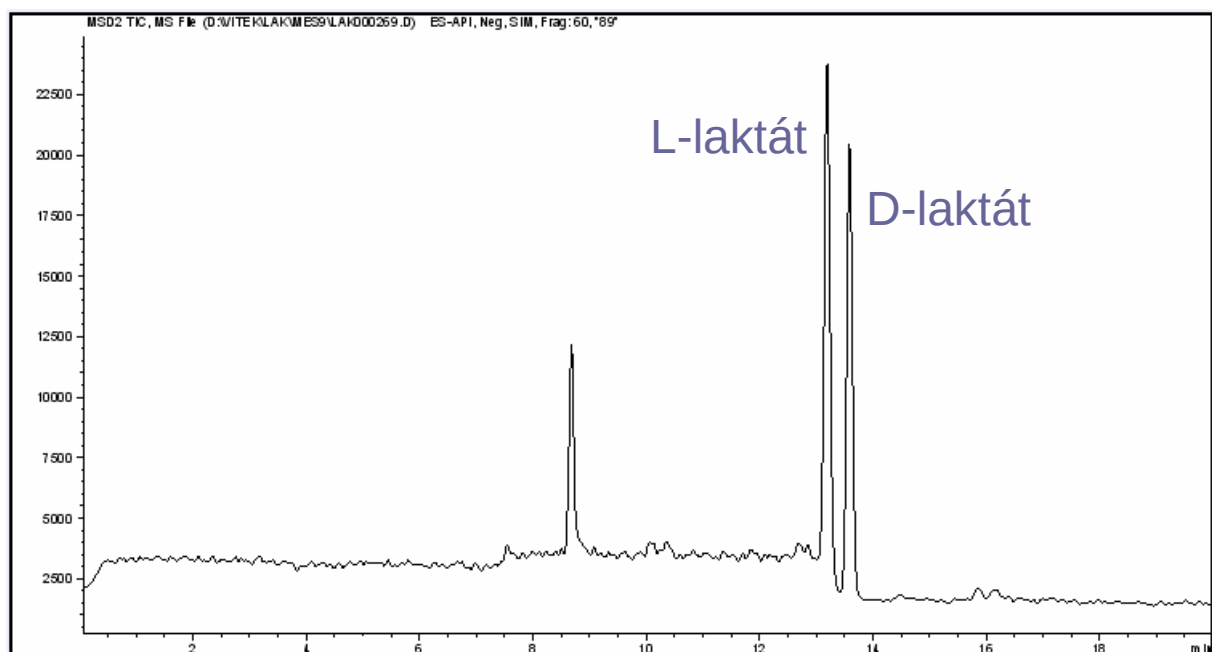
Obrázek 24: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Zlatopramen 11°



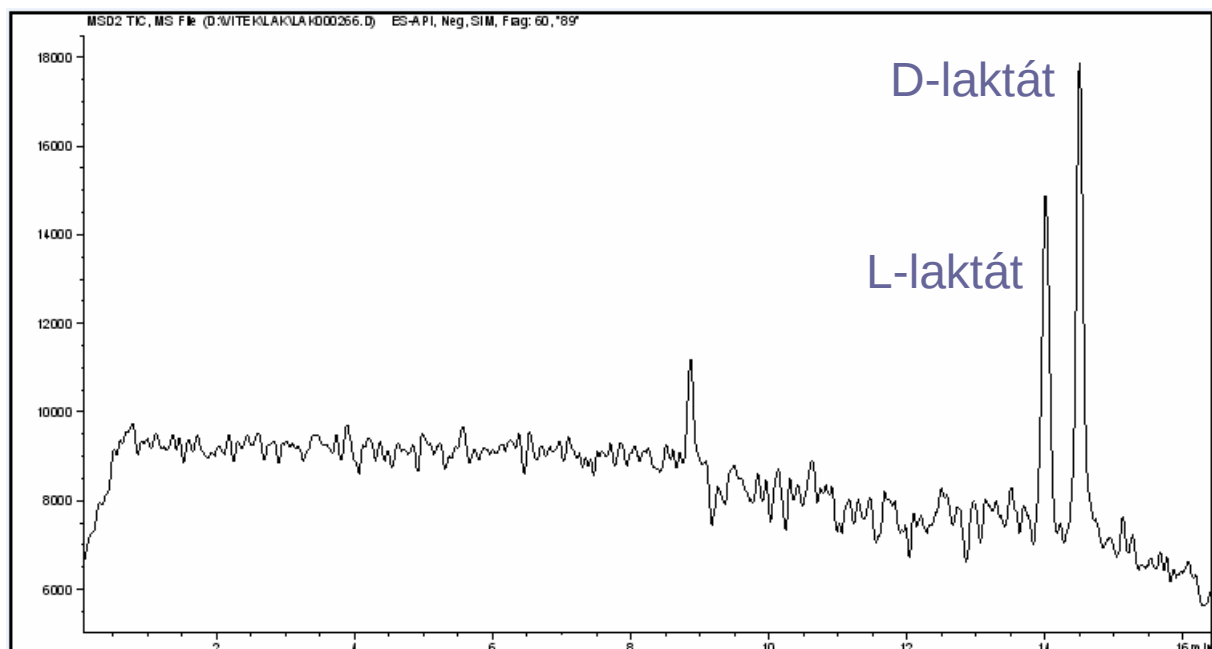
Obrázek 25: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Staropramen 12°



Obrázek 26: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Radegast 12°



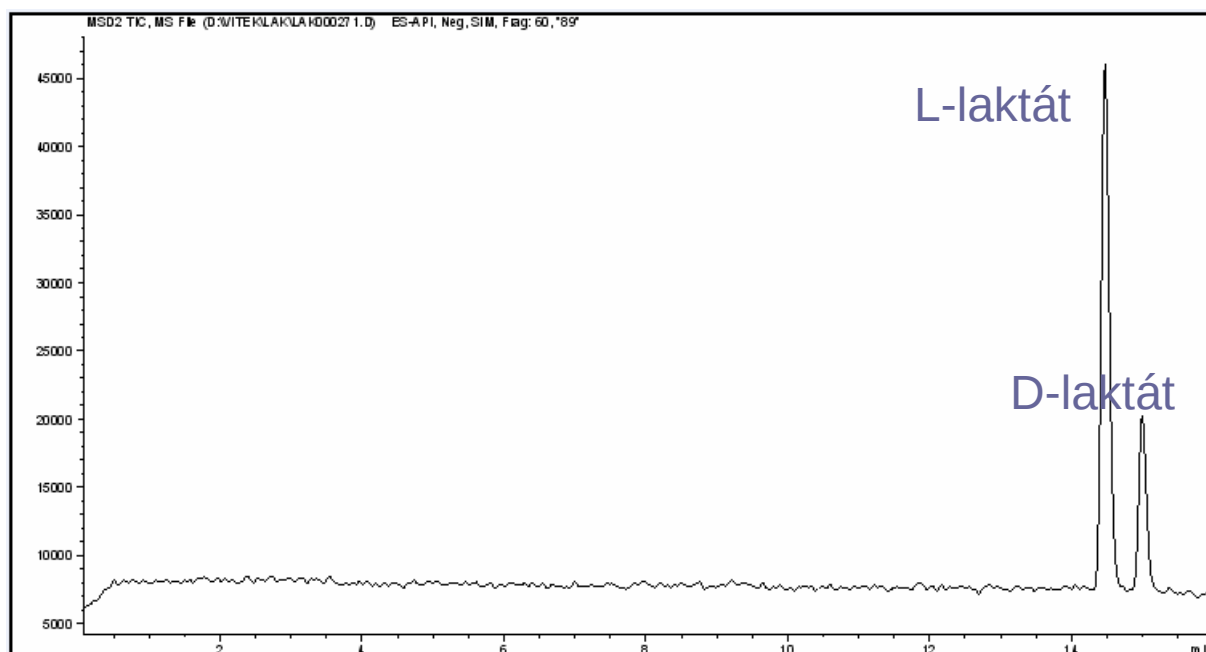
Obrázek 27: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Radegast 10°



Obrázek 28: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Gambrinus 10°

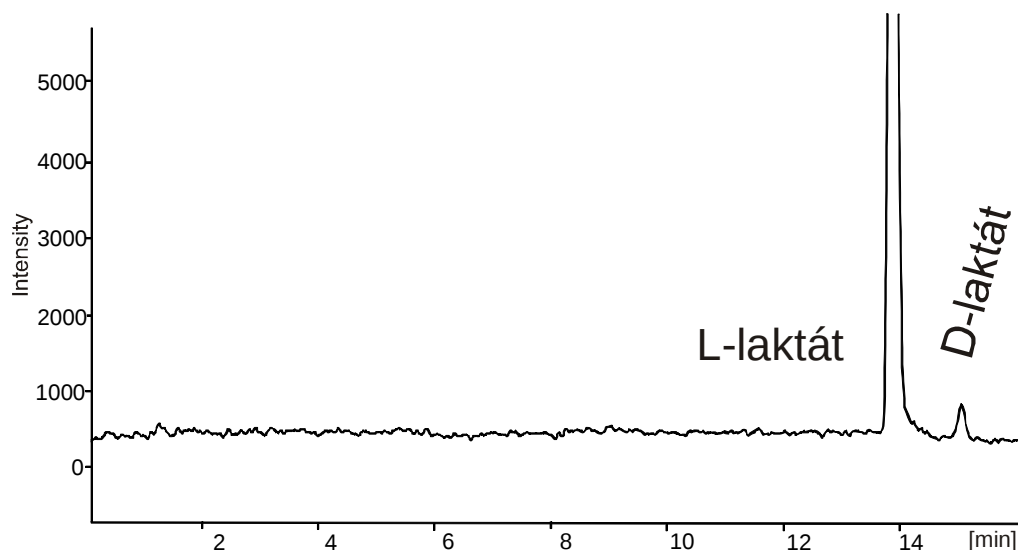


Obrázek 29: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Kozel černý



Obrázek 30: separace D- a L-laktátu u vzorku piva značky Staropramen 10°

Elektroferogram separace D,L-mléčné kyseliny ve vzorku krevního séra po deproteinaci je uveden na obrázku 31.



Obrázek 31: Elektroferogram separace D,L-laktátu v krevním séru po deproteinaci

Koncentrace L-laktátu v séru byla stanovena 1,27 mM, koncentrace D-laktátu byla 11,40 μ M. Normální povolené obsahy kyseliny mléčné u zdravého člověka jsou přibližně od 0,6 do 2,4 mmol/l. Hodnoty, které jsou naměřeny u vzorku krevního séra jsou v tomto rozmezí a nepřekročuje maximální povolené množství u zdravého člověka. Může ale dojít k výchyлкám těchto hodnot. Zvýšenou hladinu v krvi způsobuje zvýšení kyseliny mléčné ve tkáních, kde probíhá glykolýza bez přístupu kyslíku, nebo při nedostatečném odstraňování laktátu z organismu. Zvýšené hodnoty kyseliny mléčné se objevují u velkého počtu systémových onemocnění, metabolických onemocnění, infekcí, vrozených chorob či po podání některých léčiv. Dochází k laktátové acidóze. Diagnóza laktátové acidózy je potvrzena snížením krevního pH pod 7,2 a zvýšením laktátu nad 5 mmol. Léčba laktátové acidózy má i v současnosti neuspokojivé výsledky, mortalita je vysoká a všechny tyto stavy patří na jednotku intenzivní péče. Důvodem vysoké mortality je většinou velmi závažná primární porucha a současně se na neúspěchu léčby podílí i fakt, že specifická léčba laktátové acidózy neexistuje. Ke zvýšení laktátu dochází i ve svalích po nadměrném cvičení. Svalům nestačí kyslík při tak velice zátěži, a proto anaerobní glykolýzou vzniká laktát a hromadí se. Proto také svaly při námaze bolí^{63,64}.

8. Souhrn

Teoretická část

- byla popsána kyselina mléčná, jak z hlediska obecných vlastností, optické aktivity, mléčného kvašení, tak i z hlediska biologického působení na organismus
- byly popsány teoretické základy separační metody kapilární elektroforézy a detekční techniky hmotnostní spektrometrie a také jejich spojení, které je realizováno iontovým zdrojem typu elektrosprej
- byly popsány chirální separace enantiomerů kyseliny mléčné metodou CE-ESI-MS
- byl sepsán přehled nejčastějších metod zabývajících se stanovením kyseliny mléčné jak s chirální tak i bez chirální separace

Experimentální část

- byla provedena optimalizace systému CE-ESI-MS pro chirální separaci standardů D- a L-mléčné kyseliny (pozornost byla věnována zejména koncentraci vankomycin chloridu, průtoku přídatné kapaliny, teplotě dusíku při ionizaci a složení stínící kapaliny)
- byly provedeny stanovení D,L-mléčné kyseliny ve vzorcích českých piv a vzorků krevního séra po deproteinaci
- pomocí statistického programu QC Expert byly vyhodnoceny základní parametry pro stanovení obsahu D- a L- mléčné kyseliny v reálných vzorcích

9. Závěr

Kapilární elektroforéza je analytická separační metoda, která se používá pro separaci enantiomerů různých analytů mimo jiné i pro separaci enantiomerů kyseliny mléčné. Metody kapilární elektroforézy našly v oblasti chirálních separací významné uplatnění. Důkazem je mnoho výhod této metody jako je např. univerzálnost, vysoká účinnost, vysoká rychlost a nízká spotřeba činidel a vzorků, tak i bohatý výběr chirálních selektorů. Další výhodou kapilární elektroforézy je také dostupnost vhodné detekční techniky od běžné UV-vis spektrofotometrie až po hmotnostní detekci.

Pro chirální separaci enantiomerů D- a L-mléčné kyseliny byly prostudovány experimentální podmínky metody CE-ESI-MS. Pozornost byla věnována zejména závislosti rozlišení na koncentraci vankomycin chloridu, vlivu průtoku pomocné kapaliny, vlivu teploty dusíku na ionizaci a vlivu složení pomocné kapaliny. Byla provedena separace enantiomerů standardů D- a L-mléčné kyseliny a následná chirální separace reálných vzorků. Jako modelové reálné vzorky byly použity vzorky českých pív a krevního séra.

Srovnáním prezentovaných výsledků obsahu jednotlivých enantiomerů mléčné kyseliny s výsledky v odborné literatuře je vidět, že metoda CE-ESI-MS je vhodná pro separaci enantiomerů mléčné kyseliny. Pro další ověření, zda je tato metoda využitelná pro reálné analýzy obsahu enantiomerů kyseliny mléčné v pivě, je nutné provést srovnání s jinou analytickou metodou. Ze statistického zpracování výsledků je patrné, že ve vzorcích převažuje množství D-laktátu nad L-laktátem. Zvýšení D-laktátu v pivě je způsobeno bakteriální kontaminací při výrobě piva. Kromě vzorků pív byla provedena i analýza D,L-laktátu v krevním séru, aby byla demonstrována i aplikovatelnost metody na biologické vzorky.

10. LITERATURA

1. <http://www.infoplease.com> (staženo 19.3.2008).
2. Herrero A. M., Requena T., Reviejo A. J., Pingarrón J.M.: Eur. Food Res. Technol. **219**,556-559 (2004).
3. <http://uoch.vscht.cz> (staženo 2.3.2010).
4. Budavari S.: *The Merck index*- twelfth edition, Merck Research Laboratoriem, USA 1996.
5. Rozsypal S. a kolektiv: Nový přehled biologie, Scientia , Praha 2003.
6. Klouda P.: Základy biochemie, Pavel Klouda, Ostrava 2005.
7. Zehnálek J.: Biochemie, Mendlova univerzita v Brně, Brno 2002.
8. Montagné M., Erdmann H.: Sens. Actuators B **26-27**, 440-443, (1995).
9. Šilhánková L.: Mikrobiologie, Victoria Publishing Praha, Praha 1995.
10. Nezatli Y., Aspi B., Onal D., Bozkurt H.: Deutsche lebensmittel-rundschau **11**, 517-522 (2007).
11. <http://www.eufic.org> (staženo 19.3.2008).
12. <http://www.symbinatur.com> (staženo 19.3.2008).
13. <http://www.cellsalive.com/strep.htm> (staženo 19.3.2008).
14. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus> (staženo 19.3.2008).
15. <http://www.triatlon.cz> (staženo 19.3.2008).
16. <http://biochemie.sweb.cz> (staženo 11.3.2010)
17. Dušek M.: *Využití kapilární elektroforézy v analýze potravin*. Disertační práce, VŠCHT Praha, Praha 2004
18. Kroutil J.: Chirální organické sloučeniny- přehled typů a jejich názvosloví, str.3., Pražské analytické centrum inovací, VŠCHT Praha 2007.
19. Tesařová E.: *Chirální chování v přírodě a chirální separace*, str.13., Pražské analytické centrum inovací, VŠCHT Praha 2007.
20. Maier V.: *Ovlivnění selektivity v analýze fyziologicky aktivních látek kapilární zónovou elektroforézou*, Disertační práce, UP Olomouc, Olomouc 2006.
21. Maier V., Petr J., Znaležiona J., Ševčík J.: *Kapilárna elektroforéza v analýze opticky aktivních látek*, str.47., Pražské analytické centrum inovací, VŠCHT Praha 2007.

22. Fanali S., Desiderio C., Schulte G., Heitmeier S., Strickmann D.: J. Chromatogr. A, **800**, 69-76, (1998)
23. Wei W., Shuaibing H., Wenrui J.: J. Chromatogr B, **831**, 57-62, (2006).
24. Wei W., Xuemei S., Wenrui J.: J. Chromatogr B, **798**, 175-178, (2003).
25. Qian D., Rui D., Mingliang J., Wenrui J.: J. Chromatogr B, **774**, 121-126, (2002).
26. Qifeng X., Yeung E.S.: J. Chromatogr B, **677**, 233-240, (1996).
27. Dolník V., Dolníková J.: J. Chromatogr B, **716**, 269-277, (1995).
28. Qifeng X., Yeung E.S.: J. Chromatogr B, **661**, 287-295, (1994).
29. Tan L., Wang Y., Liu X.: J. Chromatogr B, **814**, 393-398, (2005).
30. Kodama S., Yamamoto A.: J. Chromatogr A, **875**, 371-377, (2000).
31. Hagberg J.: J. Chromatogr A, **988**, 127-133, (2003).
32. Saavedra L., Barbar C.: J. Chromatogr B, **766**, 235-242, (2002).
33. Lee J.A., Tsai Y., Chen H.: Anal.Chim.Acta, **534**, 185-191, (2005).
34. Ichichari H., Fukushima T.: Analytical Biochemistry, **269**, 379-385, (1999).
35. Staniforth M., O'Hanlon M.: J. Chromatogr A, **833**, 195-208, (1999).
36. Mazzei F., Azzoni A.: Food Chemistry, **55**, 413-418, (1996).
37. Marrazza G., Cagnini A., Mascini M.: Talanta, **41**, 1007-1014, (1994).
38. Serra B., Reviejo A., Pingarrón J.: Biosens. Bioelectron, **14**, 505-513, (1999).
39. Villamil M.J.F., Miranda Ordieres A.J.: Anal.Chim.Acta, **345**, 37-43, (1997).
40. Sato N., Okuma H.: Anal.Chim.Acta, **565**, 250-254, (2006).
41. Skotova L.V., Goriushkina T.B., Soldatkin A.P.: Materials and Engineering C, **28**, 943-948, (2008).
42. Tarmure C., Sandulescu R., Ionescu C.: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **22**, 355-361, (2000).
43. Faridnia M.H., Palleschi G., Lubrano G.: Anal.Chim.Acta, **278**, 35-40, (1993).
44. Lupu A., Valsesia A., Bretagnol F.: Sens. Actuators B, **127**, 606-612, (2007).
45. Esti M., Messina M.C., Lembo P.: J.Agric.Food Chem., **44**, 3102-3107, (1996).
46. Hadik P., Szabo L.P., Nagy E.: Desalination, **148**, 193-198, (2002)
47. Hasegawa H., Fukushima T.: Anal.Bioanal.Chem., **377**, 886-891, (2003)
48. Ewaschuk J.B., Barabash W.A., Naylor J.M., Zello G.A.: J. Chromatogr B, **805**, 347-351, (2004)
49. Fukushima T., Lee J.A., Korenaga T., Ichihara H., Kato M.: Biomed. Chromatogr., **15**, 189-195, (2001)

50. Omole O., Brocks D.R., Nappert G.: J. Chromatogr B, **727**, 23-29 (1999)
51. Fukushima T., Adachi S., Ichihara H.: Biomed. Chromatogr., **13**, 418-424, (1999)
52. Heil M., Podebrad F., Beck T.: J. Chromatogr B, **714**, 119-126, (1998)
53. Jirkovský D.: *Vysokoúčinné separační techniky v analýze fyziologicky významných látek*. Habilitační práce, UP Olomouc, Olomouc 2007
54. Štulík K. a kolektiv: Analytické separační metody, Karolinum- UK v Praze, Praha 2004.
55. Vřeštil J.: Hmotnostní spektrometrie, Masarykova univerzita v Brně, Brno 2000.
56. Landers J.P.: Capillary Electrophoresis and associated microtechniques, Third Edition, CRC Press, United States of America 1997.
57. Harris D.C.: (Exploring) Chemical Analysis, Second Edition, W.H. Freeman and Company, United States of America 2003.
58. Camilleri P.: Capillary Electrophoresis (Theory and Practise), CRC Press, United States of America 1998.
59. Volka K.: Analytická chemie II, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 1995.
60. <http://www.pmfhk.cz/Prednasky> (staženo 10.4.2010).
61. <http://www.vscht.cz/kch> (staženo 1.3.2010).
62. <http://www.pivecko.estranky.cz> (staženo 1.3.2010)
63. <http://laborator.vitalion.cz/laktat/> (staženo 10.4.2010)
64. <http://www.medicabaze.cz> (staženo 10.4.2010)

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
α -CD	α -cyklodextrin
β -CD	β -cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CD	cyklodextrin
CS	chirální selektor
CM- β -CD	karboxymethyl- β -cyklodextrin
DM- β -CD	dimethyl- β -cyklodextrin
D-LDH	D-laktátdehydrogenasa
ESI	elektrosprej
EOF	elektroosmotický tok
FIA	průtoková injekční analýza
γ -CD	γ -cyklodextrin
GC	plynová chromatografie
HP- β -CD	hydroxypropyl- β -cyklodextrin
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPO	křenová peroxidasa
L-LDH	L-laktátdehydrogenasa
LC	kapalinová chromatografie
LOX	laktátoxidasa
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MS	hmotnostní spektrometrie
Na ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan sodný

NaH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan sodný
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NBD-PZ	4-nitro-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazol
pg	piktogram
QA-β-CD	kvarterní amoniový-β-cyklodextrin
S-β-CD	sulfatovaný-β-cyklodextrin
SBE-β-CD	sulfobuthylether-β-cyklodextrin
TM-β-CD	trimethyl-β-cyklodextrin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTAB	tetradecyltrimethylamoniumbromid
TMA	1,3,4-benzentrikarboxylová kyselina
UV-vis	ultrafialové a viditelné záření
VAN	vankomycin