

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**CHIRÁLNÍ SEPARACE VYBRANÝCH METABOLITŮ POMOCÍ
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ
– DIAGNOSTIKA METABOLICKÝCH PORUCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Ludmila Lněničková
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Vítězslava Maiera, Ph.D. a s použitím uvedené literatury.

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

V Olomouci dne 16. 4. 2014

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mě podporovali při psaní diplomové práce. Velice děkuji všem učitelům, zejména však doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za obětavou a ochotnou spolupráci, trpělivost, cenné připomínky, poskytnuté rady a za čas, který mi věnoval při konzultacích.

Veliké poděkování patří také celé mé rodině za nemalou podporu a pomoc nejen při psaní diplomové práce, ale také po celou dobu studia.

SHRNUTÍ

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody pro chirální separaci enantiomerů pěti hydroxykarboxylových kyselin ve vzorcích moči pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Jedná se o kyselinu mléčnou, glycerovou, 2-hydroxymáselnou, 3-hydroxymáselnou a 2-hydroxyglutarovou. Separace probíhala pomocí chirálního selektoru vankomycin chloridu.

Teoretická část se zabývá vysvětlením pojmu chiralita, který je pro tuto práci stěžejní. Následuje popis základních principů kapilární elektroforézy a spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS). Diskutovány jsou také problémy spojení CE-MS. Další kapitola se zaměřuje na problematiku chirálních separací metodou CE-MS a na možnosti využití netěkavých chirálních selektorů, mezi kterými v současnosti převažuje metoda PFT, případně CFT. Následuje část věnovaná chirálním selektorům – jejich typům, vlastnostem, struktuře. Poslední kapitola teoretické části se zabývá jednotlivými kyselinami, jejich vlastnostmi, ale hlavně možnostmi jejich vzniku v lidském organismu a nemocemi, které přítomnost těchto kyselin v moči pacientů signalizuje.

Experimentální část popisuje chemikálie, pomůcky a přístrojové vybavení použité v diplomové práci. Kromě postupu přípravy standardů, reálného vzorku, separačního pufru a pomocné kapaliny obsahuje finální podmínky separace a detekce. Věnuje se také způsobu kovalentního pokrývání kapilár.

Výsledky a diskuse jsou věnovány postupu optimalizace separace a detekce a nakonec optimalizaci spojení CE-MS. Jedná se hlavně o složení a koncentraci separačního pufru, jeho pH, koncentrace chirálního selektoru, průtok pomocné kapaliny, teplotu sprejovací kapiláry, kolizní energii. Dále jsou zde zaznamenány kalibrační křivky, lineární dynamické rozsahy, limity detekce a kvantifikace pro všech deset stanovovaných enantiomerů i s elektroforegramy. Závěr práce tvoří výsledky separace enantiomerů v reálných a spikovaných vzorcích moči.

SUMMARY

This diploma thesis deals with the development of methods for chiral separation of enantiomers five hydroxycarboxylic acids in urine samples by capillary electrophoresis with mass spectrometry. There are lactic acid, glyceric acid, 2-hydroxybutyric acid, 3-hydroxybutyric acid and 2-hydroxyglutaric acid. Vancomycin chloride has been chosen as chiral selector.

The theoretical part is concerned with the concept of chirality, which is crucial for this thesis. Subsequently, there is a description of the basic principles of capillary electrophoresis and connection of capillary electrophoresis with mass spectrometry (CE-MS). The problems of connection CE-MS are discussed there too. The next chapter is focused on the chiral separations by CE-MS. It deals with the possibility of using non-volatile chiral selectors, where dominate methods PFT and CFT. The following section is about chiral selectors - their types, properties, structures. The last chapter deals with hydroxycarboxylic acids, their properties, but also the possibilities of their formation in human body and the diseases that the presence of these acids in the urine of patients indicate.

The experimental part describes chemicals, equipment and instrumentation used in this thesis. Besides the process of preparation standards, real sample, separation buffer and sheath liquid it contains the final conditions for separation and detection. There is a part about the method of covering capillary too.

Results and discussion are about process of optimization of separation and detection, and the connection CE-MS. These are mainly the composition and concentration of the separation buffer, the pH, the concentration of the chiral selector, the flow and composition of the sheath liquid, the temperature of spray capillary, and the collision energy. There are also mentioned calibration curves, linear dynamic ranges, limits of detections and quantifications for all enantiomers with their electropherograms. The conclusion of this thesis forms the results of separation of the enantiomers in real samples and spiked samples of urine.

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část	2
2.1 Chiralita.....	2
2.2 Kapilární elektroforetické techniky.....	3
2.2.1 Základní principy elektromigrace	4
2.2.2 Elektroosmotický tok	5
2.2.3 Elektroforegram	7
2.2.4 Instrumentace kapilární elektroforézy	8
2.3 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí (CE-MS).....	11
2.3.1 Elektrosprej	13
2.3.2 Kvadrupólový analyzátor	14
2.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	15
2.3.4 Skenovací módy v MS	16
2.3.5 Problémy spojení CE-MS	17
2.4 Chirální separace v CE-MS.....	19
2.4.1 Technika částečného plnění	19
2.4.2 Systém spojených kapilár s přepínáním napětí	23
2.4.3 Protimigrace chirálního selektoru	24
2.5 Mechanismus separace enantiomerů.....	25
2.5.1 Chirální selektory	26
2.6 Vybrané organické kyseliny v lidském organismu	29
2.6.1 Kyselina mléčná.....	30
2.6.2 Kyselina glycerová.....	32
2.6.3 Kyselina 2-hydroxymáselná.....	34

2.6.4 Kyselina 3-hydroxymáselná.....	35
2.6.5 Kyselina 2-hydroxyglutarová.....	36
3. Experimentální část.....	40
3.1 Přístrojové vybavení.....	40
3.2 Chemikálie a pomůcky.....	40
3.3 Příprava standardů, separačního pufru a pomocné kapaliny.....	41
3.4. Podmínky separace a detekce.....	41
3.5 Pokrývání kapilár	42
3.5.1 Teorie kovalentního pokrytí kapiláry.....	42
3.5.2 Postup pokrývání kapiláry	43
3.5.3 Ověření správnosti pokrytí.....	43
3.6 Příprava reálného vzorku moči	43
4. Výsledky a diskuse	44
4.1 Optimalizace chirální separace	44
4.2 Optimalizace hmotnostní detekce	47
4.3 Optimalizace spojení CE-MS/MS.....	51
4.4 Výsledky separace a stanovení jednotlivých kyselin.....	52
4.4.1 D- a L-mléčná kyselina.....	53
4.4.2 D- a L-glycerová kyselina.....	55
4.4.3 D- a L-2-hydroxymáselná kyselina.....	57
4.4.4 D- a L-3-hydroxymáselná kyselina.....	59
4.4.5 D- a L-2-hydroxyglutarová kyselina.....	61
4.5 Analýza reálných vzorků.....	63
5. Závěr	66
6. Seznam použitých zkratk	67
7. Použitá literatura	69

1. ÚVOD

V dnešní době se analytická chemie stále více stává nepostradatelným nástrojem v každé oblasti lidského života. Analytické metody jsou využívány v lékařství, ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v analýzách týkajících se životního prostředí, při kontrolách kvality vod, ve forenzních vědách, ale také například ve všech oborech týkajících se vývinu nových materiálů, barviv, paliv. Proto je velmi důležité věnovat se výzkumu nových, lepších a levnějších metod pro analýzy všech typů vzorků. Analytická chemie vyžaduje mnoho trpělivosti, zkušeností a nápadů, jak daný analyt stanovit. Proto ji považuji za velmi napínavou a často překvapující vědu. Myslím, že zvláště v tomto vědním oboru platí slavný výrok Aristotela: „ Počátek všech věd je úžas nad tím, čím věci jsou a co jsou.“

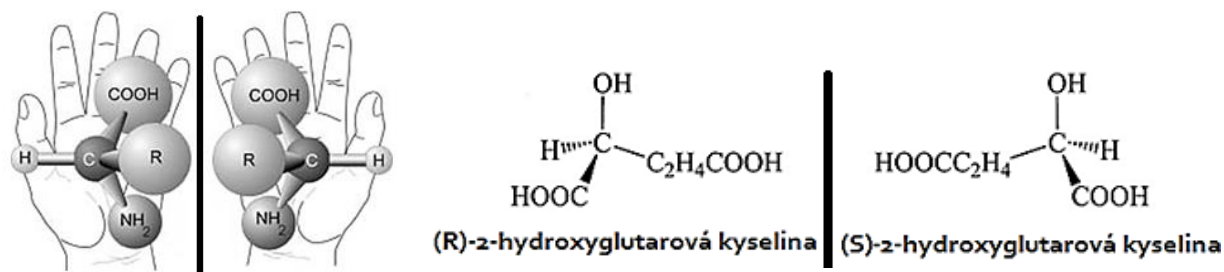
Velmi důležitou skupinu metod tvoří separační metody, které si kladou za cíl rozdělit a následně stanovit jednotlivé složky různých směsí. Kromě všeobecně známých metod, jako je filtrace, centrifugace, krystalizace, sublimace, destilace, extrakce, se do této skupiny řadí i velmi náročné metody s velikou citlivostí a složitou instrumentací, díky kterým dokážeme separované látky i detekovat. Mezi tyto metody patří plynová a kapalinová chromatografie a kapilární elektroforetické metody.

Ve své práci se nejprve zaměřím na vysvětlení problematiky chirálních látek. Poté bude představena jedna z předních separačních metod, kapilární elektroforéza, a to ve spojení s hmotnostní detekcí. Je to spojení metod, které zaznamenalo v poslední době mnoho úspěchů, a stalo se hojně využívané zejména ve forenzní a klinické analytické chemii. V další části této diplomové práce bude pojednáváno o chirálních separacích prováděných právě spojením těchto dvou metod, o problémech, které mohou při chirálních separacích nastat, a o způsobech eliminace těchto problémů. Závěr teoretické části bude věnován vybraným pěti kyselinám, které jsou chirální. Jsou to: 2-hydroxyglutarová kyselina, 2-hydroxybutanová kyselina, 3-hydroxybutanová kyselina, kyselina mléčná a kyselina glycerová. Zvýšená koncentrace těchto kyselin v tělních tekutinách ukazuje na poruchu metabolismu. Důsledkem této poruchy je vznik některého typu organické acidurie. Experimentální část této práce bude zaměřena na vývin a optimalizaci vhodné metody pro separaci a detekci těchto kyselin pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Bude navržena metoda potřebné předúpravy reálného biologického vzorku. Na závěr experimentální části budou vyvinuté metody aplikovány na reálné biologické vzorky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chiralita

Pokud existuje molekula ve dvou prostorových isomerech, které jsou si navzájem zrcadlovými obrazy (jsou k sobě jako pravá a levá ruka), pak tyto isomery nazýváme enantiomery a tuto vlastnost chiralita. Je mnoho chemických látek, které jsou chirální a mají tedy rovinu nebo střed symetrie. Pro přesný název každého enantiomeru vypracovali Cahn, Ingold a Prelog metodu označování každého enantiomeru písmeny *R*- a *S*- podle určitých pravidel. Chirální látky jsou opticky aktivní; pokud stáčí rovinu polarizovaného světla doprava, značíme je (+), doleva (-). Příklad enantiomerů je na následujícím obrázku [1].



Obr. 1 – Příklad enantiomerů. Převzato a upraveno z [2,3].

V běžném životě se setkáváme s velkým množstvím chirálních molekul, kterými jsou například aminokyseliny, cukry, hydroxykarboxylové kyseliny a další. Enantiomery mají v achirálním prostředí stejné fyzikální a chemické vlastnosti, ale často vykazují odlišné biologické, toxikologické a farmaceutické vlastnosti. Jeden enantiomer proto může mít blahodárné účinky na lidské tělo, druhý může být velmi nebezpečný. Proto jsou chirální separace nezbytné hlavně při studiu léčiv, poruch metabolismu, toxikologie, látek z životního prostředí a potravinářského průmyslu [4].

Dělení chirálních látek je velmi obtížné a je možné využít dvou přístupů – přímý a nepřímý. Přímé chirální separace jsou založeny na tvorbě diastereoizomerů přímo při separaci (volba chirální stacionární nebo mobilní fáze v chromatografii, základní elektrolyt s přídavkem chirálního selektoru v elektroforéze); při nepřímé metodě musí vlastní separaci předcházet derivatizační krok pro vytvoření diastereoizomerů. Tradiční metodou pro separaci chirálních látek je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV-VIS spektrometrií. Hlavním problémem použití HPLC pro separaci těchto látek je špatná efektivita, která vede k nedostačující separaci enantiomerů. Kromě toho musí být provedena buď derivatizace pro

vytvoření diastereomerních komplexů enantiomerů s chirálním selektorem, nebo se musí použít velmi drahá chirální kolona [5]. Proto se nyní dostávají do popředí metody kapilární elektroforézy, které využívají přímých chirálních separací.

Pro rozdělení enantiomerů přímou metodou je nutná interakce s chirálním selektorem, kterým je čistá opticky aktivní látka v *R*- nebo *S*- formě, při které musí dojít k tzv. tříbodové interakci. Tento pojem zavedl v roce 1952 Dalglisch na základě teorie, podle které jsou pro úspěšnou separaci enantiomerů potřebné tři různé současně probíhající interakce (vodíková vazba, elektrostatické interakce, sterické stínění, π - π interakce, van der Waalovy síly, interakce iont-dipól, dipól-dipól) mezi každým enantiomerem a chirálním selektorem, díky kterým vznikají dva diastereoizomerní komplexy [1]. Pokud má dojít k separaci, musí každý enantiomer reagovat s chirálním selektorem různě silně, což vede k rozdílům ve vlastnostech obou diastereoizomerů [6].

2.2 Kapilární elektroforetické techniky

Elektroforéza je proces separace nabitých částic založený na jejich pohyblivosti, která je ovlivněna aplikovaným stejnosměrným elektrickým polem [7]. Při aplikaci stejnosměrného elektrického pole na elektrolyt v kapiláře obsahující nabitě částice, dojde k migraci částic s nábojem elektrolytem. Rychlost a směr migrace nabitých částic závisí na druhu a velikosti jejich náboje, ale také na velikosti samotných částic [8].

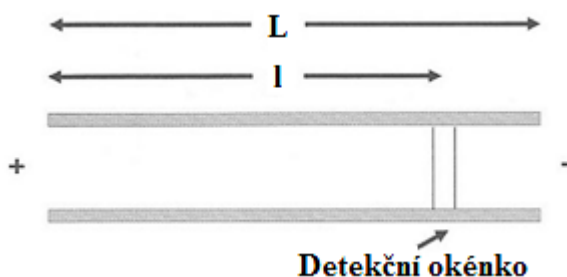
Kapilární elektroforetické techniky zahrnují mnoho metod, z nichž každá má odlišný mechanismus separace. Jedná se především o kapilární zónovou elektroforézu (CZE), micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF), kapilární gelovou elektroforézu (CGE), kapilární izotachoforézu (CITP) a kapilární elektrochromatografii (CEC).

2.2.1 Základní principy elektromigrace

Při vložení napětí mezi elektrody vzniká v kapiláře elektrické pole, které je charakterizováno veličinou intenzita elektrického pole. Tuto veličinu značíme E a je dána vztahem (1), kde U je napětí vložené na elektrody a L je celková délka kapiláry.

$$E = \frac{U}{L} \quad (1)$$

Rozdíl mezi celkovou délkou kapiláry a efektivní délkou kapiláry je ukázán na obrázku 2.



Obr. 2 – Rozdíl mezi celkovou (L) a efektivní (l) délkou kapiláry. Převzato a upraveno z [9].

Úvaha, která je základem kapilární elektroforézy (CE), je velmi jednoduchá: kulová částice s poloměrem r a s nábojem z je přitahována k elektrodě s opačným nábojem díky elektrické síle F_e , jejíž velikost je dána vztahem (2); je tedy přímo úměrná celkovému náboji částice q a intenzitě elektrického pole E .

$$F_e = qE = q \frac{U}{L} \quad (2)$$

Protože se částice pohybuje elektrolytem, který má viskozitu η , je bržděná třením podle Stokesova zákona, který popisuje vztah (3). Třecí síla F_t působící na danou částici závisí přímo úměrně na viskozitě elektrolytu η , hydrodynamickém poloměru částice r (poloměr částice i s jejím solvatačním obalem) a na její rychlosti v .

$$F_t = -6\pi\eta r v \quad (3)$$

V rovnovážném stavu dojde k vyrovnání obou těchto sil působících na nabitou částici a dostáváme vztah (4):

$$\begin{aligned} -F_t &= F_e \\ 6\pi\eta r v &= qE \end{aligned} \quad (4)$$

Jestliže je ze vztahu (4) vyjádřena rychlost částice v , dostaneme vztah (5), ve kterém je zřejmé, že mezi rychlostí pohybu částice a intenzitou elektrického pole je přímá úměrnost. Konstantou úměrnosti je elektroforetická mobilita μ_{ef} [1,9].

$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r} = \mu_{ef}E \quad (5)$$

Elektroforetická mobilita μ_{ef} je podle vztahu (6) tedy přímo úměrná náboji částice q , nepřímo úměrná svému poloměru r a viskozitě prostředí η . Nejvyšší elektroforetickou mobilitu budou mít malé částice s velkým nábojem, budou se tedy pohybovat rychleji, než velké částice s malým nábojem.

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (6)$$

Čas, za který se částice dostane z místa nástřiku do detektoru, se nazývá migrační čas t_m , který je možno vypočítat podle vztahu (7). Migrační čas je dán vzdáleností, kterou částice musí urazit, ale také takzvanou zdánlivou mobilitou částice μ_{av} , která je definována vektorovým součtem elektroforetické mobility částice μ_{ef} a elektroosmotické mobility elektroosmotického toku μ_{eof} . Zdánlivá mobilita μ_{av} totiž není konstantou jako elektroforetická mobilita μ_{ef} , ale funkcí závislé na mnoha parametrech, jako například teplota, viskozita, iontová síla, pH a velikosti elektroosmotického toku.

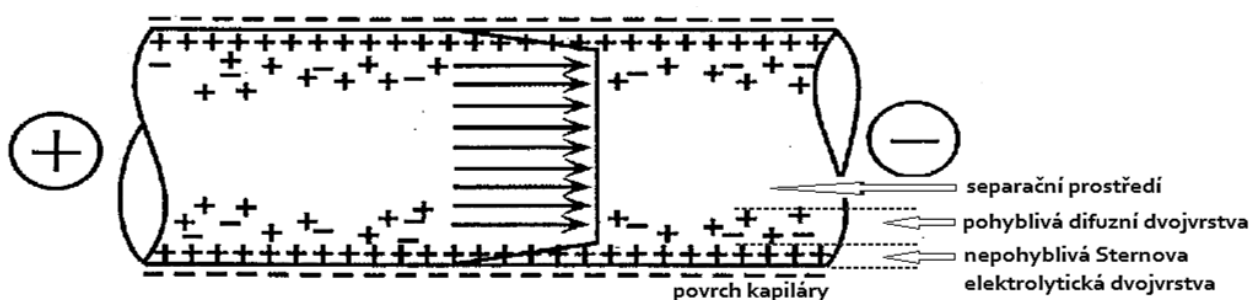
$$t_m = \frac{l}{\mu_{av}E} = \frac{6\pi\eta r l}{qE} \quad (7)$$

2.2.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je děj, který významně ovlivňuje elektroforetickou separaci. Křemenné nepokryté kapiláry mají na svém vnitřním povrchu siloxanové skupiny (-Si-O-Si-) a silanolové skupiny (-Si-O-H) s hodnotou $pK_a \sim 3$ [10]. Pokud je v kapiláře elektrolyt s pH o stejné hodnotě jako pK_a silanolových skupin, je polovina těchto skupin disociována. Jestliže je v kapiláře elektrolyt s $pH > 3$, bude vliv disociace ještě větší. Vnitřní povrch křemenné kapiláry se tedy nabíjí záporně, což vede ke vzniku nepohyblivé Sternovy elektrolytické dvojvrstvy, protože záporný náboj na stěně kapiláry přitahuje kationty z elektrolytu takovou silou, že se stávají součástí vnitřní stěny kapiláry. Vnitřní stěna kapiláry je nyní kladně nabitá, proto přitahuje záporně nabitě částice z elektrolytu v těsné blízkosti Sternovy dvojvrstvy. Tyto přitažlivé síly jsou ale mnohem menší než mezi záporně nabitým

vnitřním povrchem kapiláry a kationty, proto vzniká pohyblivá tzv. difuzní dvojvrstva a přitahované záporně nabitě částice mohou migrovat v elektrickém poli.

Pokud je jeden konec takovéto křemenné kapiláry připojen ke katodě a druhý k anodě, které jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu, budou kationty v kapiláře i se svými solvatačními obaly přitahovány ke katodě a zároveň odpuzovány od kationtů, které jsou součástí Sternovy elektrolytické dvojvrstvy. Tím dochází k pohybu celé kapaliny uvnitř kapiláry, tedy nabitých i nenabitých částic. Tento pohyb je nazýván EOF, který se pohybuje směrem od anody ke katodě. Pokud se bude pH v kapiláře snižovat, bude se EOF blížit nulové hodnotě; pokud se pH bude zvyšovat, bude se zvyšovat i rychlost EOF.



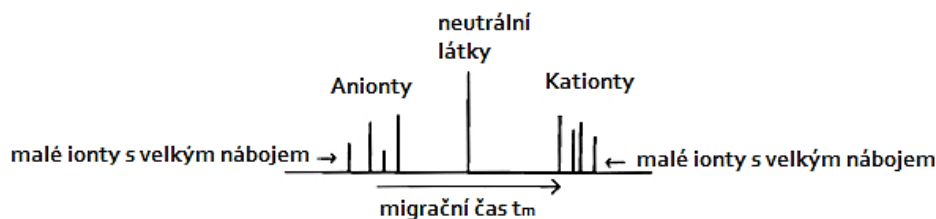
Obr. 3 – Vznik elektroosmotického toku v kapiláře. Převzato a upraveno z [11].

Z elektroforegramu lze odečíst migrační čas EOF a vypočítat elektroosmotickou mobilitu pomocí vztahu (8):

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{l}{E t_m} \quad (8)$$

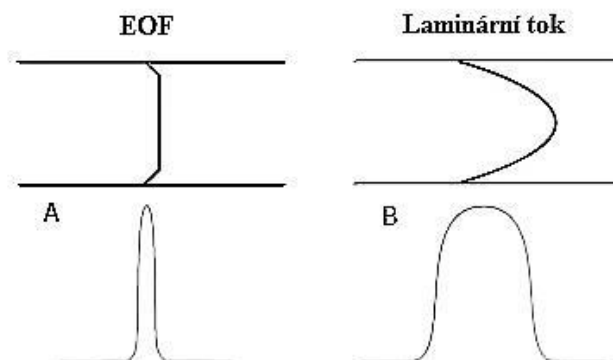
Důsledky přítomnosti EOF při separaci iontů

Díky EOF lze v jedné analýze separovat a detekovat kationty, anionty i neutrální látky, protože se pohybují ve stejném směru různě rychle v případě, že efektivní mobilita částic pohybujících se proti směru EOF není větší než elektroosmotická mobilita. Jestliže je směr EOF anody ke katodě, budou kationty urychleny a všechny neutrální látky se budou pohybovat rychlostí EOF. Anionty, které mají větší efektivní mobilitu než je elektroosmotická mobilita EOF, jsou zpomalovány, ale nemění svůj směr, na rozdíl od aniontů s menší efektivní mobilitou. Ty jsou unášeny ke katodě, ale pomaleji než kationty a neutrální látky.



Obr. 4 – Pořadí částic při vstupu do detektoru. Převzato z [8].

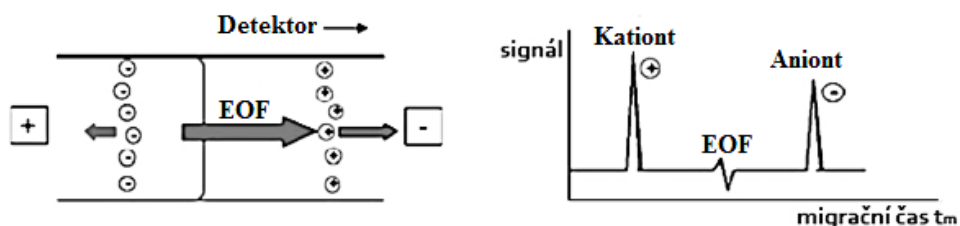
Další významnou vlastností EOF v kapiláře je plochý profil kapaliny na rozdíl od parabolického profilu laminárního toku v chromatografii. Kapalina je hnána vnitřním povrchovým nábojem kapiláry, který způsobuje, že v každém místě průřezu kapaliny se dané částice pohybují stejnou rychlostí, což minimalizuje rozmytí zóny. Plochý profil kapaliny se rozruší, pokud vnitřní průměr kapiláry bude příliš velký (nad 200 μm).



Obr. 5 – Profil toků a jim odpovídající píky. Převzato a upraveno z [9].

2.2.3 Elektroforegram

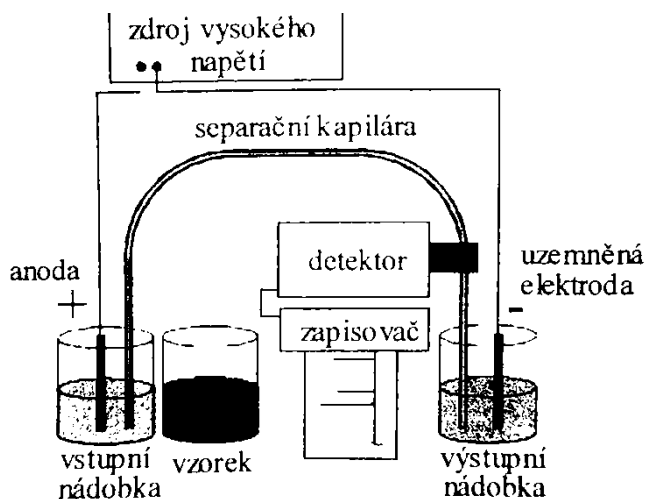
Změna signálu z detektoru je zaznamenávána a v počítači zaznamenávána jako elektroforegram, což je závislost signálu sledované analytické vlastnosti na migračním čase. Každé zóně analytu, která projde detektorem, náleží pík. Čím je zóna užší a koncentrovanější, tím je užší a vyšší pík. Právě takové píky jsou vhodné pro integraci. Migrační čas, při kterém dosáhl pík své největší výšky, odpovídá kvalitativní charakteristice analytu, plocha píku odpovídá kvantitativní charakteristice.



Obr. 6 – Záznam píků v elektroforegramu. Převzato a upraveno z [12].

2.2.4 Instrumentace kapilární elektroforézy

Jednou z mnoha předností CE je poměrně jednoduchá instrumentace, kterou tvoří kapilára, vstupní a výstupní vialka, vialka se vzorkem, dávkovací zařízení, tlakové a vakuové pumpy, elektrody, zdroj vysokého napětí, regulace teploty, detektor a počítač s vyhodnocovacím softwarem.



Obr. 7 – Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu. Převzato z [1].

Kapiláry

Pro CE se mohou používat křemenné, teflonové nebo i skleněné kapiláry. Nejčastěji jsou využívány kapiláry křemenné obalené polyimidem pro snadný odvod tepla generovaného průchodem proudu uvnitř kapiláry, ale také kvůli snazší manipulaci (menší křehkost a větší ohebnost kapiláry). Používají se kapiláry s vnitřním průměrem 25 – 100 μm , nejčastěji o průměru 75 μm . Vnější průměr kapiláry bývá 350 – 400 μm , nejčastěji 375 μm . Délka kapiláry dosahuje až jednoho metru.

Pokud je při analýze EOF nežádoucí, je potřeba pracovat s pokrytými křemennými kapilárami, jejichž vnitřní povrch je modifikován neutrální látkou, nebo s teflonovými kapilárami, ve kterých EOF není. Z hlediska mechanismu modifikace vnitřního povrchu kapiláry rozlišujeme dynamicky pokryté kapiláry, mechanismem pokrývání je adsorpce, a kovalentně (permanentně) pokryté kapiláry, mechanismem je tvorba kovalentních vazeb. Kovalentní pokrytí je pevnější a odolnější a bylo v této práci využito. Pokrytí kapilár je limitujícím faktorem pro pH, které nesmí být vyšší než 8, jinak by došlo k hydrolyze vazeb mezi silanolovými skupinami na povrchu kapiláry a neutrálními látkami [9,13].

Zdroj napětí

Jako zdroje napětí se v kapilární elektroforéze využívají vysokonapěťové zdroje. Jejich rozsah je mezi 0 – 30 kV a 0 – 300 μ A. Vyšší napětí nelze použít, protože by docházelo k ionizaci vzduchu a v kapiláře by bylo generováno příliš velké Jouleovo teplo, které je vytvářené průchodem elektrického proudu vodičem. Jouleovo teplo je nežádoucí, protože způsobuje lokální změny teplotního gradientu, viskozity a následné rozšíření zóny analytu. Zdroje napětí mají jednu elektrodu uzemněnou, ta je připojena na konec kapiláry blíže detektoru, na druhé elektrodě je vysoké napětí. Pokud by tomu tak nebylo, mohlo by výbojem dojít ke zničení detekční cely, protože napětí mezi roztokem v detekční cele a uzemněným detektorem by bylo moc veliké. Separační napětí je vhodné vkládat na elektrody postupným zvyšováním z důvodu eliminace vzniku vzduchových bublinek, které vznikají jako důsledek příliš velkého Jouleova tepla.

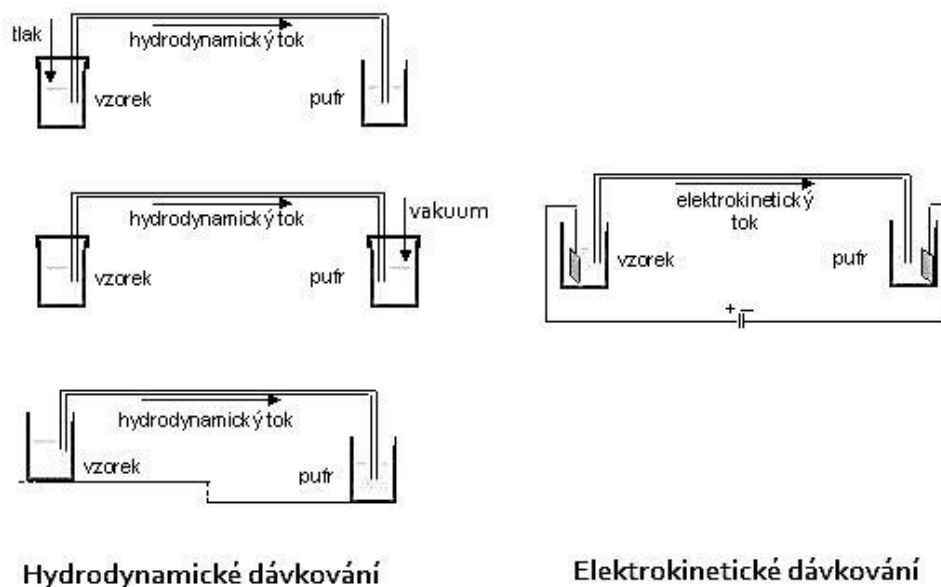
Dávkování vzorku

Dávkovaná zóna vzorku by neměla být delší, než je 1 až 2% celkové délky kapiláry L , protože by docházelo k rozšiřování píků vlivem difuze, ale také k deformaci tvaru píků kvůli rozdílné vodivosti separačního pufru a vzorku. Tento jev je nazýván „Sample overloading“ [9].

Dvě nejběžněji používané metody dávkování vzorku do kapiláry jsou:

Hydrodynamické dávkování – konec kapiláry, na který se má nadávkovat vzorek, je ponořen do vialky se vzorkem, druhý konec kapiláry je ponořen do vialky s pufrem. Vzorek je nadávkován zvýšením tlaku na konci kapiláry ponořeném ve vzorku, snížením tlaku na konci kapiláry ponořeném v pufru nebo vytvořením výškového gradientu obou konců kapiláry.

Elektrokinetické dávkování – na oba konce kapiláry vložíme na krátkou dobu napětí, což způsobí migraci vzorku do kapiláry. Nevýhodou je, že do kapiláry přednostně vstupují molekuly s vyšší mobilitou, proto nemusí poměr látkových množství vzorku v kapiláře odpovídat složení vzorku [7,9,13]. Proto se pro kvantitativní stanovení tento nástřik nevyužívá.



Hydrodynamické dávkování

Elektrokinetické dávkování

Obr. 8 – Schéma dávkování vzorku v kapilární elektroforéze. Převzato a upraveno z [14].

Detekce

Detektor zaznamenává změnu signálu, která je vyvolána tím, že do detektoru vstoupí analyt s jinými vlastnostmi, než má samotný pufr. V CE se do detektoru dostávají objemy vzorku v řádu nanolitřů, což klade vyšší požadavky na instrumentaci. Mezi nejčastěji používané detektory patří UV-VIS absorpční, fluorescenční, amperometrické, vodivostní detektory, hmotnostní spektrometrie a další.

UV-VIS absorpce:

Tato detekční technika je založena na absorpci monochromatického světla molekulami vzorku a srovnání původní intenzity záření I_0 a intenzity záření I po průchodu vzorkem. Měřená veličina se nazývá absorbance a je dána jednak dekadickým logaritmem podílu intenzit záření, ale také Lambert-Beerovým zákonem, kde d je délka optické dráhy, ε je molární absorpční koeficient a c je koncentrace.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon cd \quad (9)$$

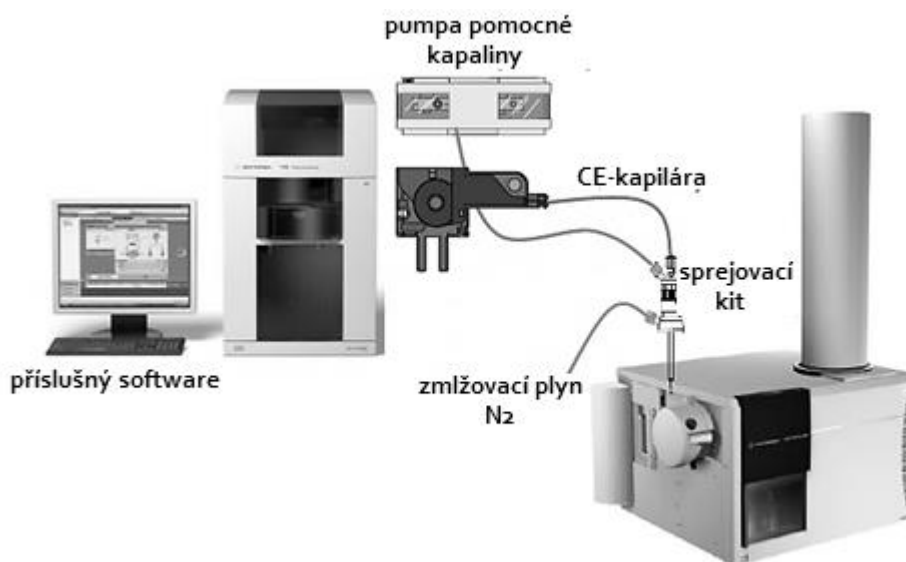
Pokud separace probíhá v křemenné kapiláře, lze po vytvoření detekčního okénka detekovat záření v rozmezí vlnových délek 200-800 nm. Protože detekce probíhá on-column, nedochází k rozšíření zón, ale dochází ke snižování citlivosti v důsledku příliš krátké optické dráhy, která je rovna průměru kapiláry. Tento problém se řeší použitím například Z-cely, bublinové cely nebo odrazové komůrky, kdy se optická dráha světelného paprsku prodlouží.

2.3 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí (CE-MS)

Mezi detekčními technikami, které jsou používány ve spojení s kapilární elektroforézou (CE), poskytuje hmotnostní spektrometrie (MS) vysokou citlivost, velmi dobré informace o struktuře analytu a umožňuje monitorování vybraného iontu, což je velmi vhodné zvláště pro identifikaci analytu ve složité matici [15].

MS je metoda, která ovlivňuje pohyb iontů ve vakuu působením elektrického nebo magnetického pole a separuje je na základě poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Celá detekce pomocí MS je založena na třech krocích. Nejprve musí dojít k tvorbě iontů některou z ionizačních technik, poté se vyrobené ionty separují v hmotnostním analyzátoru, a nakonec jsou detekovány. Každý přístroj má tyto základní části: zavádění vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, zařízení pro detekci iontů – nejčastěji dinodový elektronový násobič, zařízení pro zpracování dat, vakuová čerpadla, která zajišťují vysoké vakuum hmotnostního analyzátoru a detekčního zařízení.

Díky stále se rozvíjející technice bylo možné spojit tyto dvě metody – separaci v kapalně fázi a detekci ve vakuu - a začít je komerčně využívat k řešení různých úkolů, jako je analýza drog, farmaceutická analýza, studium metabolitů, analýza proteinů a fragmentů nukleových kyselin, chirální separace opticky aktivních látek a další.

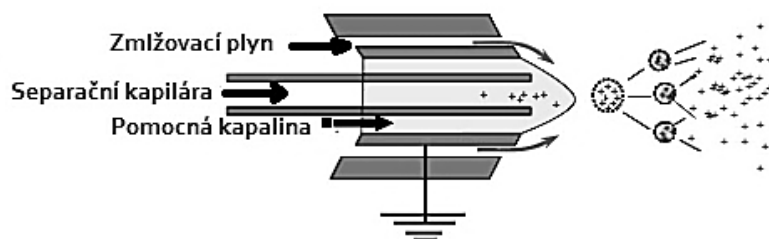


Obr. 9 – Schéma spojení CE-MS. Převzato a upraveno z [16].

Spojení CE-MS je on-line spojením, proto musí být separační kapilára přímo zavedena do hmotnostního spektrometru. Kapilára musí být tedy delší, než ve spojení CE s jinými detekčními technikami, a to mezi 60 – 120 cm; efektivní délka kapiláry l se zde rovná celkové délce kapiláry L . Nejvhodnějším iontovým zdrojem pro spojení těchto dvou technik je elektrosprej (ESI), kdy konec kapiláry slouží jako sprejovací špička, proto musí být rovně uříznutý, zbavený polyimidu na povrchu kapiláry a očištěný od nečistot, aby nedošlo k jeho zacpání.

Dále je při tomto spojení nutné použití pomocné kapaliny, tzv. sheath liquid, protože průtok separační kapilárou je velmi malý [nl/min] a nestačil by ke stabilnímu sprejování (tvorbě nabitých kapiček analytu) v elektrospreji, zvláště při práci s pokrytými kapilárami, kde je EOF nulový. Je to roztok methanolu, vody a buď organické těkavé kyseliny (nejčastěji kyselina mravenčí či octová) pro podpoření tvorby kationtů, tj. ionizace v pozitivním módu, nebo těkavé báze (amoniak) pro lepší tvorbu aniontů, tj. ionizace v negativním módu, v daném poměru. Tato kapalina také umožňuje vodivé spojení mezi koncem separační kapiláry a uzemněnou elektroforetickou elektrodou. Pro vytvoření stabilního spreje se do prostoru ESI přivádí ještě inertní zmlžovací plyn.

Samotné jádro spojení CE-ESI-MS je tvořeno tzv. sprejovacím kitem, který se skládá ze tří v sobě umístěných kapilár. Vnitřní kapilárou je separační kapilára, která tvoří sprejovací špičku. Pomocná kapalina se nachází v prostřední uzemněné kapiláře a proudí okolo separační kapiláry. Vnější kapilárou proudí inertní zmlžovací plyn, například dusík. Detail tohoto spojení ukazuje obrázek 10. Další možné spojení CE-ESI-MS je bez pomocné kapaliny, kdy je vodivé spojení realizováno pomocí pokovené sprejovací špičky. Tento typ spojení je citlivější, protože nedochází ke zředění rozseparovaných zón pomocnou kapalinou, ovšem zatím není dost robustní a komerčně dodávaný.

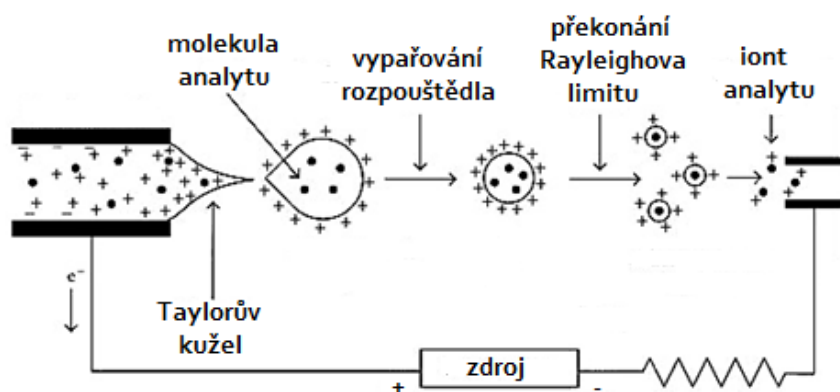


Obr. 10 – Sprejovací špička. Převzato a upraveno z [9].

2.3.1 Elektrosprej

Ionizace elektrosprejem (ESI) je měkká ionizační technika, proto nedochází k tak bohaté fragmentaci a dostáváme informaci o molekulové hmotnosti iontu. Tato technika dovoluje vznik vícenásobně nabitých iontů, lze však velmi těžko použít pro nepolární látky. Pomocí napětí mezi špičkou kapiláry a vstupem do druhé části iontového zdroje, tzv. sušící kapilárou, vznikají nabitě kapičky s analytem. Kapičky jsou díky potenciálu vloženému na sušící kapiláru vtahovány dovnitř do vyhřívaného prostoru sušící kapiláry, okolo které proudí sušící plyn. Kapičky se suší a trhají až na jednotlivé ionty, které vstupují do hmotnostního analyzátoru.

Pokud je na sušící kapiláru vložen potenciál menší než nula, je výsledné sprejovací napětí kladné a práce tedy probíhá v kladném módu. Se zvyšujícím se napětím dochází k hromadění kladně nabitých iontů na sprejovací špičce, tedy k nárůstu odpudivých sil. Na sprejovací špičce vzniká tzv. Taylorův kužel, ze kterého se překonáním povrchového napětí γ odtrhávají kapky. Z kapek se v sušící kapiláře odpařuje rozpouštědlo, čímž dochází ke zvýšení koncentrace kladného náboje na povrchu kapky, a tedy k nárůstu odpudivých sil. Pokud je náboj tak velký, že odpudivé síly opět překonají povrchové napětí kapky, dojde k jejímu roztržení, protože byl překonán tzv. Rayleighův limit stability. Zmenšování a trhání kapky se několikrát opakuje, až zůstanou jen jednotlivé ionty.



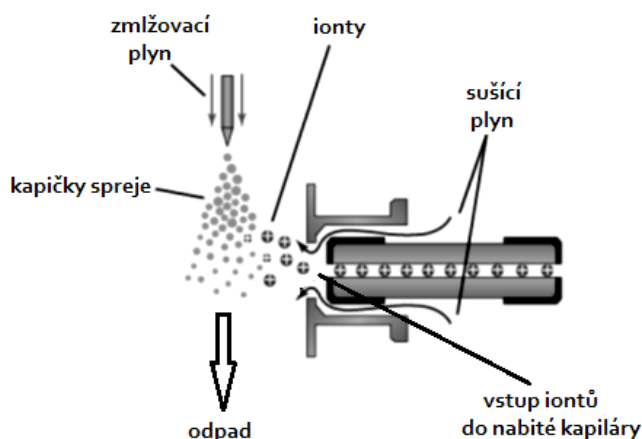
Obr. 11 – Model ionizačního procesu v elektrospreji. Převzato a upraveno z [17].

Rayleighův limit stability odpovídá maximálnímu náboji kapičky, při kterém je povrchové napětí schopno udržet kapičku pohromadě. Je určen vztahem (10), kde q je celkový náboj kapky, a je závislý na permitivitě vakua ϵ_0 , povrchovém napětí γ , a poloměru kapky R .

$$q = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (10)$$

Stabilitu spreje ovlivňuje vložené napětí, vnější a vnitřní průměr kapiláry, tvar kapiláry a složení rozprašované kapaliny. Vzhledem k těmto individuální parametrům je důležité vložit na sprejovací špičku správné napětí, aby byl elektrosprej stabilní a nedocházelo k elektrickým výbojům. Ideální je sprejovat při nejnižším napětí, při kterém se vytvoří Taylorův kužel. Při zvyšování napětí se kužel trhá na několik kuželů a nakonec dochází k výboji. Pro ionizaci v pozitivním módu je rozsah napětí od 3,5 do 5 kV, pro negativní mód jsou vhodné hodnoty okolo - 4 kV.

Aby byl iontový zdroj alespoň částečně chráněn před kontaminací netěkavými složkami pufru nebo pomocné kapaliny, upřednostňuje se tzv. ortogonální uspořádání, které ukazuje obrázek 12, kdy je sprejovací špička elektrospreje vzhledem ke vstupu do další části iontového zdroje pod určitým úhlem, zpravidla 90°.



Obr. 12 – Ortogonální uspořádání CE-ESI-MS. Převzato a upraveno [18].

2.3.2 Kvadrupólový analyzátor

Tento analyzátor je jedním z nejrozšířenějších hmotnostních analyzátorů nejen díky jeho jednoduchosti a menší ceně, ale také vhodnosti pro spojení se separačními technikami. Jeho velkou výhodou je vysoká skenovací frekvence. Mezi nevýhody patří nižší rozlišení a diskriminace iontů s vyšší m/z než 4000. Jeho schéma je na obrázku 13.

Kvadrupólový analyzátor (Q) založený na ovlivňování pohybu iontů oscilujícím elektrickým polem je tvořen čtyřmi rovnoběžnými tyčemi, které slouží jako elektrody. Průřez tohoto analyzátoru je hyperbolický. Protilehlé tyče jsou elektricky propojeny; jedna dvojice je připojena ke kladnému pólu stejnosměrného zdroje napětí, druhá k pólu zápornému. Na tyče je také vkládáno vysokofrekvenční napětí, které je na jednom páru protilehlých tyčí posunuto o celou fázi, oproti napětí na druhém páru protilehlých tyčí. Potenciál na tyčích kvadrupólu Φ_0

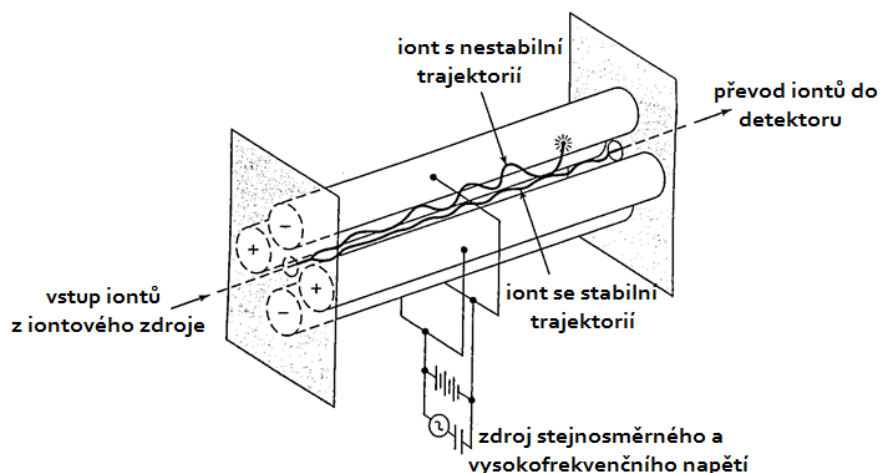
je dán vztahem (11), kde U je stejnosměrné napětí, V je amplituda střídavého napětí, ω je úhlová rychlost a t je čas.

$$\Phi_0 = U - V \cos \omega t \quad (11)$$

Ionty, které vstoupí do analyzátoru z iontového zdroje, jsou urychleny do prostoru mezi tyčemi potenciálem o velikosti od 5 do 10 V. Podle toho, jaký je použit soubor napětí na kvadrupólových tyčích, projdou ionty s určitým m/z až do detektoru. Ionty s jinými hodnotami m/z narazí v průběhu průletu analyzátozem na kvadrupólovou tyč a ztrácí svůj náboj; jsou nazývány jako ionty s nestabilní trajektorií [19]. Trajektorie iontu je určena diferenciální rovnicí (12), která se nazývá Mathieuova rovnice, kde a , q , ζ jsou bezrozměrné parametry a u značí souřadnice x , y , z .

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (12)$$

Řešením této rovnice jsou dva parametry a_u a q_u , které určují, jaké musí být nastaveny parametry ω , U a V , aby iont o dané hodnotě m/z prošel mezi tyčemi. Při skenování je úhlová rychlost ω konstantní, mění se současně U a V tak, že jejich poměr U/V zůstává konstantní.



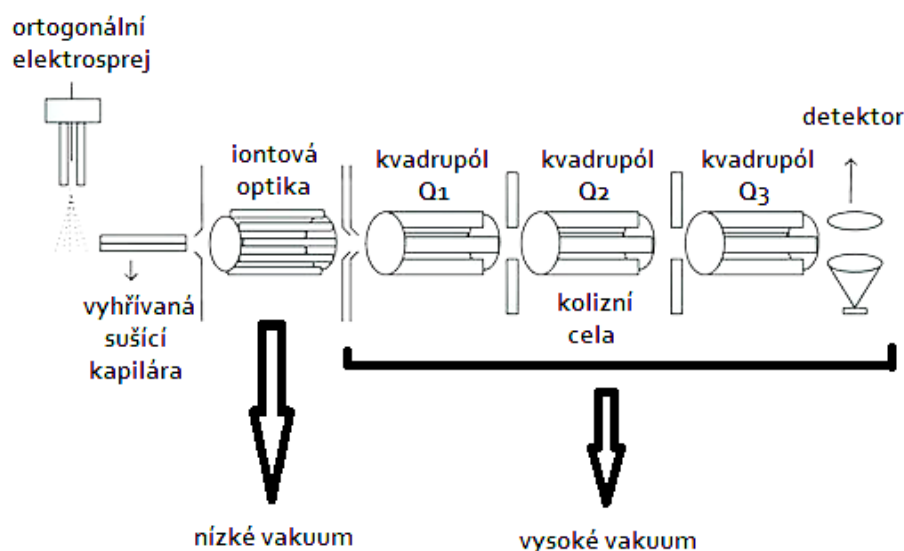
Obr. 13 – Schéma kvadrupólového analyzátoru. Převzato a upraveno z [19].

2.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Je to metoda zahrnující alespoň dva stupně hmotnostně spektrometrické analýzy, ale také proces fragmentace iontu, při kterém dochází ke změně hmotnosti nebo velikosti náboje iontu. Provádí se tedy alespoň dva výběry iontů. Tandemová MS se proto označuje jako MS^n a je hojně využívána ke studiu struktury látek, ale také ke studiu vlastností iontů a jejich přeměn.

Tandemová MS může být realizována zapojením více (alespoň tří) hmotnostních analyzátorů za sebou, přičemž prostřední z nich slouží jako kolizní cela, ve které probíhá aktivace iontů dodáním energie a následná fragmentace. Aktivovat ionty je možné několika způsoby – ozáření fotonem, interakcí s elektronem, srážkou s povrchem. Nejčastěji využívanou metodou je však srážka s atomem nebo molekulou tzv. kolizního plynu (helium, argon, dusík), kterou nazýváme kolizí indukovaná disociace (CID, z angl. collision-induced dissociation).

V této práci byl použit trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQ), který je popsán na obrázku 14. Množství za sebou zapojených analyzátorů je limitováno snižováním koncentrace sledovaných iontů v každém analyzátoru, protože část iontů se při analýze ztrácí.



Obr. 14 – Schéma hmotnostního spektrometru ESI – QqQ. Převzato a upraveno z [20].

2.3.4 Skenovací módy v MS

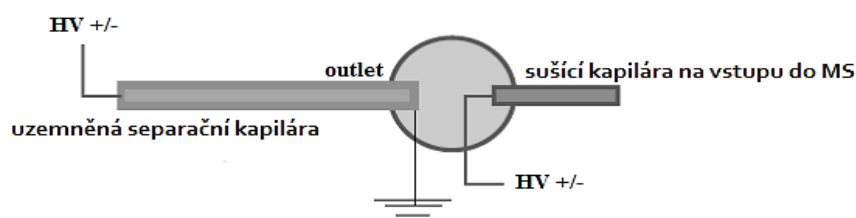
Záznamem MS je závislost intenzity I jednotlivých iontů na jejich poměru m/z . Nejzákladnější skenovací mód je TIC (celkový iontový proud, z angl. total ion current), který v nastaveném širokém intervalu poměrů m/z zaznamenává intenzitu iontů s m/z patřícím do tohoto intervalu. Je často používán při analýze neznámých směsí, problémem je možnost překrytí signálu analytu signálem matrice, nebo dalším analytem. Dobrou pomůckou je schopnost softwaru spojeného s MS vyextrahovat ze záznamu pouze ionty, které odpovídají vybrané hodnotě m/z . Dalším módem pro skenování je SIM (monitorování vybraného iontu, z angl. selected-ion monitoring), při kterém je zadána hodnota poměru m/z a je zaznamenávána pouze intenzita iontů s touto hodnotou. Proto se tento mód využívá při analýzách známých látek.

V tandemové analýze se kromě TIC a SIM díky fragmentaci může využívat mnohem větší počet skenovacích módů. Mezi nepoužívanější patří sken produktových (dceřiných) iontů, kdy je v prvním analyzátoru vybrán jeden iont, v kolizní cele je fragmentován a v posledním analyzátoru jsou fragmenty skenovány. Získáváme tak strukturní informace o vybraném iontu. Dalším módem je sken prekurzorových (mateřských) iontů, který se využívá při analýze strukturně velmi podobných látek. V prvním analyzátoru je skenován požadovaný interval m/z , v kolizní cele proběhne fragmentace všech naskenovaných iontů a ve třetím analyzátoru proběhne volba jednoho fragmentu, který je typický pro sledovanou látku. Při NLS (skenování neutrálních ztrát) je skenován interval m/z v prvním i třetím analyzátoru (po fragmentaci v kolizní cele) a jsou hledány změny - typické ztráty určitých skupin. Mezi hojně používané skenovací módy patří také SRM nebo MRM (monitorování vybrané reakce), kdy je v prvním analyzátoru vybrán jeden iont, v kolizní cele je fragmentován a v třetím analyzátoru je vybrán buď jeden, nebo více fragmentů, které jsou detekovány.

2.3.5 Problémy spojení CE-MS

Náročné propojení dvou systémů s vysokým napětím

Jednou z nejnáročnějších částí spojení CE-MS je potřeba dvou různých elektrických obvodů; jiné hodnoty vysokého napětí potřebujeme pro separaci analytů v CE, jiné pro správné sprejování elektrospreje. Separační a sprejovací napětí se navzájem nesmí ovlivňovat, proto musí být zaručena uzavřenost elektrického obvodu. V CE je vysoké napětí umístěno na elektrodu u vstupu do separační kapiláry, na konci separační kapiláry je elektroda, která je uzemněná, aby byl elektrický proud nesený základním elektrolytem odveden. Při spojení CE-MS je konec separační kapiláry s touto uzemněnou elektrodou vodivě spojen díky pomocné kapalině. Pro vytvoření elektrospreje je požadováno vysoké napětí mezi sprejovací špičkou a sušící kapilárou, která vede dál do MS. Nejčastěji je konec sprejovací špičky uzemněn a sprejovací napětí je aplikováno na sušící kapiláru, jak je to znázorněno na obrázku 15.



Obr. 15 – Nejčastější elektrické spojení CE-MS. Převzato a upraveno z [34].

Potenciál uzemněných těles je nulový. Má-li těleso vyšší potenciál než uzemněné těleso, má potenciál pozitivní. Má-li naopak těleso nižší potenciál než nula, má potenciál negativní. Mezi místy s různým potenciálem vzniká napětí, které je rozdílem potenciálů. Celkové napětí při sprejování lze tedy vypočítat pomocí vztahu (13), kde U_{CE} je potenciál vkládaný na sprejovací špičku, U_{MS} je potenciál na sušící kapiláře.

$$U = U_{CE} - U_{MS} \quad (13)$$

Pokud je začátek separační kapiláry nabit kladně, sprejovací špička na konci kapiláry je uzemněna a sušící kapilára je nabita záporně, mluvíme o pozitivním iontovém módu, protože v elektrospreji vznikají kationty. Pokud je začátek separační kapiláry nabit záporně, pak musí být na sušící kapiláře potenciál pozitivní a jedná se o negativní iontový mód, při kterém vznikají anionty.

Při separaci kationtů je tedy U_{MS} záporné a celkové sprejovací napětí je dáno součtem potenciálu na sprejovací špičce a na sušící kapiláře, při separaci aniontů je celkové napětí dáno jejich rozdílem [9,15].

Omezení v použití základních elektrolytů

Mezi hlavní omezení spojení CE-MS patří nutnost používat jako základní elektrolyty pouze polární, středně polární nebo termolabilní látky (kyselina octová, mravenčí, amoniak, triethylamin). Používání netěkavých základních elektrolytů (kyselina fosforečná, alkylsulfáty, hydroxid sodný) nebo netěkavých látek přidávaných do základního elektrolytu (tenzidy, chirální selektory) vede ke snížení intenzity signálu analytu, snížení poměru signál-šum a ke znečištění hmotnostního spektrometru v důsledku kontaminace iontového zdroje [21]. Existují však techniky, jak zabránit kontaminaci zdroje, například použitím techniky částečného plnění [15]. Tyto techniky však mají několik nevýhod – mohou snížit signál analytu, jsou náročné na optimalizaci nebo vyžadují složitou instrumentaci.

2.4 Chirální separace v CE-MS

Spojení CE-MS využívá separace na základě přidavku chirálního selektoru (CS) přímo do základního elektrolytu, ve kterém separace probíhá. Pro chirální separace lze využít CZE, CGE (chirální selektor může být zabudován v gelu), MEKC, ITP (selektor je přidán pouze do vedoucího elektrolytu) i CEC (může být použita chirální stacionární fáze).

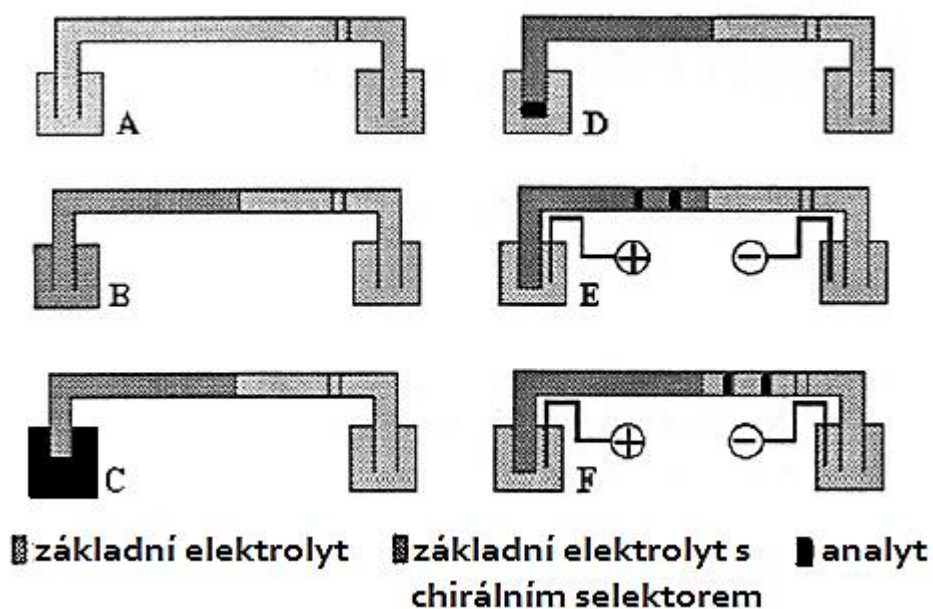
Tyto metody jsou velmi efektivní, levnější než chromatografické a rychlé. Velkou výhodou těchto metod je možnost měnit koncentraci CS v základním elektrolytu. Objem spotřebovaný při jedné analýze je velmi malý a umožňuje použití i velmi drahých CS. Protože MS umožňuje sledovat pouze ionty se zvoleným poměrem m/z , byly odstraněny problémy s matričním efektem, který často způsoboval překryv signálů obou enantiomerů. Tandemová MS dokonce poskytuje informace o struktuře vybraného iontu. Kombinace chirálních kapilárních elektroforetických metod ve spojení s ESI-MS se stala velmi využívanou technikou s vysokou citlivostí a selektivitou, která dovoluje identifikovat neznámé chirální složky v reálném vzorku. Je velmi využívaná zvláště při analýzách drog, léčiv, farmakokinetických a farmakodynamických studiích.

Mezi nevýhody přidání CS do základního elektrolytu patří například možnost jeho interakce se stěnou kapiláry, nerozpustnost v základním elektrolytu, ovlivnění vodivosti systému, ale také častá absorpce UV-záření nebo nedostatečná těkavost CS, která je překážkou pro klasické CE-MS spojení. Pro použití tohoto spojení je nutno zabránit kontaminaci iontového zdroje. Při použití kovalentně pokrytých kapilár je snížen EOF, což výrazně omezí množství CS, který se dostane do iontového zdroje. Mezi nejvýznamnější metody ochrany iontového zdroje proti kontaminaci chirálním selektorem jsou technika částečného plnění kapiláry, systém spojených kapilár s přepínáním napětí a proti-migrace chirálního selektoru.

2.4.1 Technika částečného plnění

Technika částečného plnění (PFT – partial-filling technique) byla nejprve vyvinuta pro použití tam, kde by přílišná absorpce některého aditiva v základním elektrolytu znemožnila UV-detekci analytu. Dnes se však nejhojněji využívanou technikou pro spojení CE-MS pro chirální separace nabitými i nenabitými CS. Postup při použití této techniky je ukázán na obrázku 16. Nejprve je kapilára naplněna základním elektrolytem. Poté je do kapiláry dávkován základní elektrolyt s přidavkem CS tak, aby byla dosažena potřebná délka separační zóny. Tlak a doba dávkování musí být určena experimentálně nebo početně před samotnou analýzou.

Nakonec je nadávkován i samotný analyt a na kapiláru je vloženo separační napětí. Analyt je v důsledku interakce s CS separován na jednotlivé enantiomery, které následně migrují až do základního elektrolytu bez CS ke konci kapiláry a do iontového zdroje. PFT vyžaduje eliminaci EOF, proto jsou používány kovalentně pokryté kapiláry. Kdyby EOF nebyl potlačen, byl by CS unášen do iontového zdroje [21]. Bylo prokázáno, že aplikace separační zóny o jiné délce než je efektivní délka kapiláry má pozitivní vliv na rozlišení a selektivitu enantiomerů. Velkou výhodou této techniky je nízká spotřeba CS, což je velmi vhodné, zvláště když je selektor málo dostupný a drahý. Nevýhodou je ale dlouhá doba analýzy, která je způsobena jednak potlačením EOF použitím pokrytých kapilár, jednak dlouhotrvajícím dávkováním základního elektrolytu s přídavkem CS.



Obr. 16 – Schéma metody částečného plnění. Převzato a upraveno z [22].

V PFT jsou voleny podmínky separace podle toho, zda selektor migruje nebo je jeho mobilita jen zanedbatelná. Délka separační zóny, která byla před začátkem separace nadávkována, se nazývá aplikovaná délka separační zóny a značí se PL_{app} . Délka separační zóny, ve které skutečně probíhá separace enantiomerů, se nazývá efektivní délka separační zóny a značí se PL_{eff} .

Aplikovaná délka separační zóny

Při hydrodynamickém dávkování separační zóny je základní elektrolyt s přidavkem chirálního selektoru dávkován po určitý čas (2-16 minut) do kapiláry naplněné základním elektrolytem pomocí tlaku, jehož velikost je obvykle 3-5 kPa. Čas, který je potřeba k nadávkování separační zóny o požadované délce, se značí t_{app} . Čím déle bude probíhat dávkování, tím delší bude separační zóna. Rychlost dávkování se nazývá aplikovaná rychlost v_{app} , která je nepřímo úměrná koncentraci selektoru díky změně viskozity základního elektrolytu způsobené přidavkem CS. Aplikovaná délka separační zóny PL_{app} je dána vztahem (14).

$$PL_{app} = t_{app}v_{app} = \frac{\Delta P d^2}{32\eta L} \quad (14)$$

Aplikovaná délka separační zóny PL_{app} a aplikovaná rychlost v_{app} jsou tedy přímo úměrně ovlivněny velikostí tlaku ΔP při dávkování separační zóny a vnitřním průměrem kapiláry d , nepřímo úměrně celkovou délkou kapiláry L a viskozitou η . Pokud by bylo použito elektrokinetické dávkování, což je možné jen u nabitých chirálních selektorů, byla by aplikovaná délka separační zóny dána vztahem (15), kde μ_{ef} je elektroforetická mobilita chirálního selektoru, μ_{eof} je elektroosmotická mobilita a V_{app} je dávkovací napětí [22].

$$PL_{app} = \frac{t_{app}(\mu_{ef} + \mu_{eof})V_{app}}{L} \quad (15)$$

Efektivní délka separační zóny

Migrační čas analytu t_{mig} je součtem jeho času migrace separační zónou t_{sz} , ve které je CS, a samotným základním elektrolytem t_{ze} . Rychlost pohybu separační zóny je značena v_{sz} . Efektivní délka separační zóny PL_{eff} je vyjádřena pomocí vztahu (16).

$$PL_{eff} = v_{sz}t_{sz} + PL_{app} = v_{sz}(t_{mig} - t_{ze}) + PL_{app} \quad (16)$$

Pokud se selektor pohybuje směrem od detektoru a analyt proti němu, platí, že $PL_{eff} < PL_{app}$. Pokud se ale separační zóna i analyt pohybují stejným směrem, bude efektivní délka separační zóny delší než aplikovaná. Rychlost separační zóny s elektricky neutrálním CS v_{sz} je dána vztahem (17), kde $v_{eof(sz)}$ je velikost EOF v separační zóně a $v_{eof(ze)}$ je velikost EOF v základním elektrolytu [22].

$$v_{sz} = \frac{PL_{app}}{PL_{eff}} v_{eof(sz)} + \left(1 - \frac{PL_{app}}{PL_{eff}}\right) v_{eof(ze)} \quad (17)$$

V praxi se nejčastěji využívá situace, pro kterou platí $PL_{eff} < PL_{app}$. Nabité CS mohou být použity pro separaci nabitých i nenabitých enantiomerů. Příkladem využití této metody je separace enantiomerů karboxylových kyselin za použití vankomycinu jako chirálního selektoru. Při práci v pH menším než 7,5 je vankomycin nabit kladně, ale karboxylové kyseliny nesou v tomto intervalu pH záporný náboj. Při hodnotách $pH < 4$ je už vankomycin nestabilní, proto v této oblasti nepracujeme.

Účinnost separace v PFT

Pokud je v kapiláře nějaký EOF, pak rozdíl EOF v separační zóně a v základním elektrolytu způsobuje změnu plochého toku kapaliny na laminární, který zhoršuje efektivitu separace. Z tohoto důvodu je nutno maximálně snížit koncentraci CS v základním elektrolytu. Také přechod přes rozhraní separační zóna - základní elektrolyt způsobuje tím větší rozšiřování píků, čím je větší rozdíl ve složení separační zóny a základního elektrolytu. Rychlost migrace analytů je totiž nižší v separační zóně s CS než v základním elektrolytu.

Rozlišení v PFT

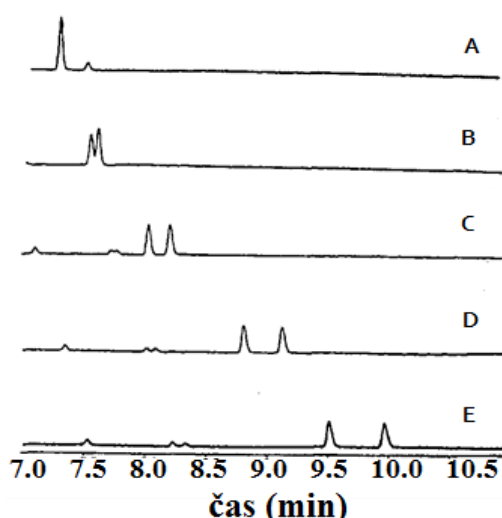
Rozlišení popisuje kvalitu separace dvou analytů. Čím větší rozlišení, tím jsou od sebe píky odpovídající daným dvěma analytům dál, a separace je tedy lepší. Rozlišení značíme $R_{1,2}$ a jeho hodnota je uváděna vždy pro dva píky, které odpovídají analytům 1 a 2.

V technice PFT je rozlišení dvou enantiomerů závislé na efektivní délce separační zóny, protože pouze tam probíhá separace. Separace enantiomerů se dá zlepšit prodloužením separační zóny, což vede ke zvýšení počtu interakcí mezi jednotlivými enantiomery a CS. V případě použití neutrálního CS je rozlišení dáno vztahem (18), kde $v_{1(sz)}$ a $v_{2(sz)}$ jsou rychlosti prvního a druhého enantiomeru v separační zóně. Hodnota rozlišení separovaných enantiomerů je tedy přímo úměrná aplikované velikosti separační zóny a rozdílu rychlostí enantiomerů v separační zóně. Pokud CS migruje díky vlastnímu náboji nebo díky přítomnosti EOF, pak je rozlišení dáno vztahem (19). Veličiny $v_{0(ze)}$ a $v_{CS(ze)}$ jsou rychlosti analytu a CS v základním elektrolytu. V tomto druhém případě je rozlišení přímo úměrně závislé na efektivní délce zóny a rozdílu rychlostí CS a analytu v základním elektrolytu.

$$R_{1,2} = \frac{2PL_{\text{app}}(v_{1(\text{sz})} - v_{2(\text{sz})})}{v_{1(\text{sz})}v_{2(\text{sz})}(w_1 + w_2)} \quad (18)$$

$$R_{1,2} = \frac{\Delta PL_{\text{eff}}(v_{0(\text{ze})}^{-1} - v_{\text{CS}(\text{ze})}^{-1})}{(w_1 + w_2)} = \frac{\Delta PL_{\text{eff}}(v_{\text{CS}(\text{ze})} - v_{0(\text{ze})})}{v_{0(\text{ze})}v_{\text{CS}(\text{ze})}(w_1 + w_2)} \quad (19)$$

Následující obrázek dokumentuje závislost rozlišení na délce separační zóny, která je přímo úměrná rozlišení. Dávkování separační zóny do kapiláry trvalo 0 s - A, 60 s - B, 180 s - C, 300 s - D, 420 s - E.



Obr. 17 – Závislost rozlišení enantiomerů na délce separační zóny. Převzato z [22].

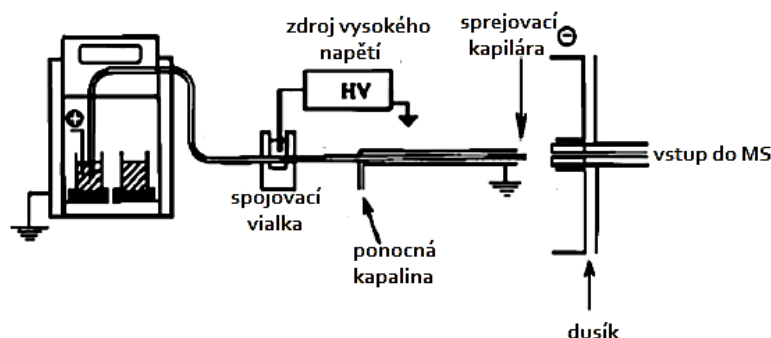
Pokud se použitím techniky PFT nedojde k uspokojivým výsledkům, je možné použít podobnou techniku nazývanou technika úplného plnění (CFT). Kapilára je celá naplněna základním elektrolytem s CS a poté je nadávkován vzorek. Díky této technice je možné dosáhnout zkrácení doby analýzy a zlepšení rozlišení využitím celé efektivní délky kapiláry. Musí být ale zaručeno, že se CS nedostane do iontového zdroje [22].

2.4.2 Systém spojených kapilár s přepínáním napětí

Systém spojených kapilár s přepínáním napětí (Combined column coupling with voltage switching) je jedním z možných řešení spojení CZE -MS. Separované enantiomery však musí mít větší mobilitu než mobilita je CS. Jedná se o systém tří spojených a za sebou umístěných kapilár. První a druhá kapilára jsou vodivě spojeny díky spojovací vialce. Schéma

tohoto spojení je na obrázku 18. V první kapiláře probíhá chirální separace, ve druhé se separují rozdělené enantiomery od chirálního selektoru a třetí kapilára je sprejovací kapilárou.

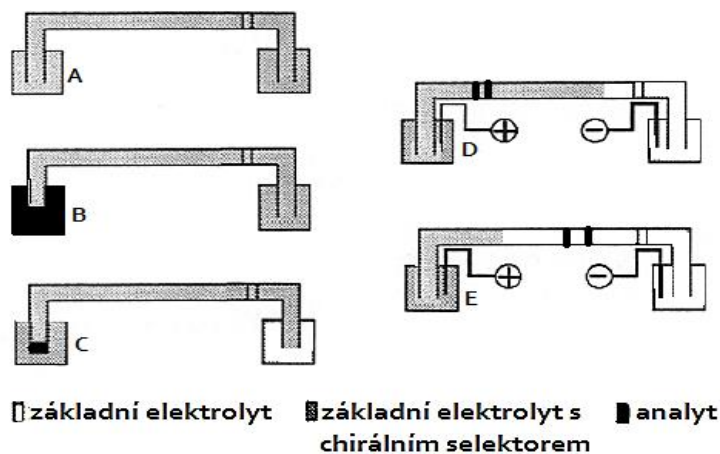
Pomocí aplikování různých napětí na tyto tři kapiláry je dosaženo ochrany iontového zdroje před kontaminací netěkavým CS. Nevýhodou této metody je však nutnost tohoto speciálního vybavení, dlouhý čas analýzy a možnost použití jen pro analyty s mnohem vyšší mobilitou ve srovnání s neutrálním CS [21].



Obr. 18 – Schéma přístroje pro systém spojených kapilár. Převzato a upraveno z [21].

2.4.3 Protimigrace chirálního selektoru

Protimigrace chirálního selektoru (CS counter-migration) je metoda, při které se využívá nabitý chirální selektor, a to s opačným nábojem, než mají dělené enantiomery. Další podmínkou je, že CS musí mít větší elektroforetickou mobilitu v opačném směru, než je směr a mobilita EOF. Separační kapilára je naplněna základním elektrolytem s přídavkem vhodného CS, který se po nadávkování vzorku a vložení separačního napětí pohybuje směrem k začátku kapiláry proti směru pohybu enantiomerů. Přídavek nabitého selektoru do elektrolytu však způsobuje zvýšení elektrické vodivosti elektrolytu a možnou adsorpci na stěnu kapiláry způsobenou elektrostatickými přitažlivými silami mezi náboji selektoru a stěn kapiláry [21,22].



Obr. 19 – Schéma CS counter-migration. Převzato a upraveno z [23].

2.5 Mechanismus separace enantiomerů

Pokud je CS obsažen v základním elektrolytu a na začátek separační kapiláry je nadávkován vzorek, bude se ustavovat termodynamická rovnováha reakce mezi enantiomerem E_i a CS za neustálého vzniku a rozpadu diastereomerního komplexu E_i -CS. Silnější interakce mezi enantiomerem E_i a CS způsobují vznik stabilnějšího komplexu s vyšší konstantou stability. Konstanty stability (obecně K_i) diastereomerních komplexů s R - a S - enantiomerem jsou dány vztahy (20, 21).

$$K_R = \frac{[R-CS]}{[R][CS]} \quad (20)$$

$$K_S = \frac{[S-CS]}{[S][CS]} \quad (21)$$

Elektroforetická mobilita enantiomeru μ_i je při dané koncentraci CS vyjádřena vztahem (22),

$$\mu_i = \frac{\mu^f + \mu^c K_i [CS]}{1 + K_i [CS]} \quad (22)$$

kde μ^f je elektroforetická mobilita volných enantiomerů, μ^c mobilita enantiomerů pevně vázaných v diastereomerním komplexu se selektorem a $[CS]$ je okamžitá koncentrace selektoru [6].

Rozlišení při separaci dvou enantiomerů je dáno vztahem (23), který je určen počtem teoretických pater N , rozdílem elektroforetických mobilit obou enantiomerů $\Delta\mu$, průměrnou elektroforetickou mobilitou enantiomerů μ_{avg} vypočtenou jako průměr μ_i a mobilitou EOF μ_{eof} . Z tohoto vztahu plynou možnosti optimalizace chirální separace. Pro zvýšení hodnoty $\Delta\mu$ je rozhodující typ a koncentrace CS, pH, iontová síla základního elektrolytu, teplota, ale také velikost EOF [15].

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\Delta\mu}{\mu_{avg} + \mu_{eof}} \right) \quad (23)$$

2.5.1 Chirální selektory

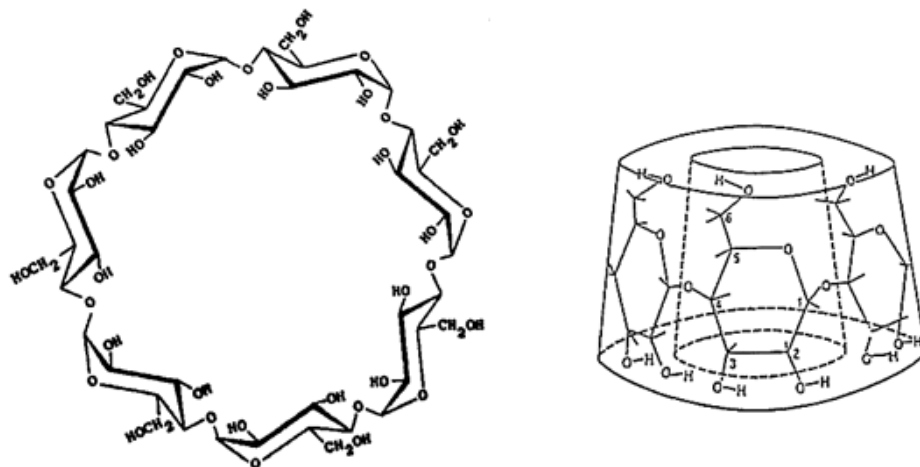
Existuje mnoho druhů CS s různými vlastnostmi - jiné interakce, různá selektivita, rozpustnost. Z výše uvedeného vztahu (22) vyplývá, že volba selektoru má vliv na hodnotu konstanty stability diastereomerního komplexu, ale také na elektroforetické mobility μ^f a μ^c . CS by měly rychle tvořit diastereomerní komplexy s oběma enantiomery, měly by být chemicky stabilní a neměly by interferovat při detekci. Rozpustnost CS v základním elektrolytu by měla být velká, aby bylo možné zkoušet dělení dvou enantiomerů pomocí různých koncentrací CS v základním elektrolytu a stanovit tak nejlepší podmínky pro separaci, protože pro každé dva enantiomery existuje optimum koncentrace CS. Hodnota optima, která je dána vztahem (24), je nepřímo úměrná průměru konstant stability diastereomerních komplexů [6].

$$[\text{CD}]_{\text{opt}} = \frac{1}{\sqrt{K_1 K_2}} \quad (24)$$

V CE jsou využívány tyto typy CS: nativní cyklodextriny, deriváty cyklodextrinů, antibiotika, proteiny, polysacharidy, chirální tenzidy a crown ethery, které jsou schopné tvořit pevné komplexy s kationty kovů, ale také s aminoskupinou.

Nativní cyklodextriny

Nativní cyklodextriny patří mezi nejrozšířenější chirální selektory. Jsou to cyklické oligosacharidy složené z různého počtu D-glukopyranosových jednotek, které tvoří kruhovou strukturu přes α -1,4-glykosidické vazby. Cyklodextriny tvořené z šesti D-glukopyranosových jednotek jsou nazývány α -cyklodextriny, ze sedmi jednotek β - a z osmi jednotek γ -cyklodextriny. Cyklodextriny mají hydrofilní povrch díky OH- skupinám, což umožňuje hydrofilní interakce s polárními skupinami enantiomerů. Vnitřek, tzv. kavita, je hydrofobní, tedy nepolární, a umožňuje nepolární interakce. Na obrázku 20 je struktura β -cyklodextrinu, který je nejvíce používaný, ale bohužel málo rozpustný. Nativní cyklodextriny jsou vhodné pro chirální separace drog, jako je efedrin, epinefrin, norefedrin a další [6,24].



Obr. 20 – Struktura β -cyklodextrinu. Převzato z [1,24].

Derivatizované cyklodextriny

Derivatizované cyklodextriny mají místo atomů vodíku nativních cyklodextrinů jiné funkční skupiny, např. síranové skupiny, karboxylové skupiny, aminoskupiny, aminokarboxylové skupiny. Mohou být neutrální (estery) nebo nabitě. Nabitě cyklodextriny umožňují také elektrostatické interakce s enantiomery a jsou často používané díky schopnosti separovat i nenabitě enantiomery [6,15,24].

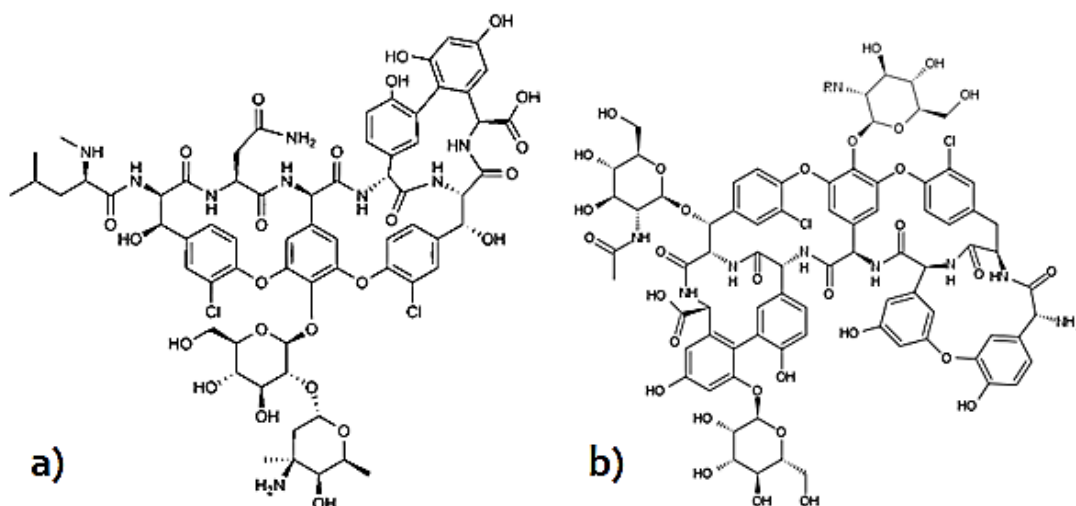
Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika tvoří početnou a hojně využívanou skupinu chirálních selektorů, která se podle rozdílné struktury dále dělí na ansamyciny, polypeptidy, aminoglykosidy a glykopeptidy. Struktura makrocyclických antibiotik je velmi pestrá s několika chirálními centry a různými funkčními skupinami, což umožňuje vytvářet různé druhy interakcí s enantiomery [6]. Největší využití má skupina glykopeptidů, mezi které se řadí například vankomycin, teicoplanin, ristocetin, rifamicyn. Glykopeptidy mají tvar basketbalového koše složeného z jednoho nebo více monosacharidů a ze tří nebo čtyř makrocyclických kruhů aminokyselin a substituovaných fenolů. Na tomto skeletu je pak jeden nebo více monosacharidů, které jsou volně otáčivé a zaujímají tak různé konformace [25]. Protože volné aminoskupiny mají tendenci reagovat se stěnami kapiláry, glykopeptidy s větším obsahem těchto aminoskupin zpomalují analýzu. Při použití pokrytých kapilár je však tento problém eliminován. Glykopeptidy silně absorbují světlo s vlnovou délkou pod 250 nm (pro detekci enantiomerů při vlnové délce nižší než 250 nm je nutné použít techniku částečného

plnění kapiláry). Díky obsahu hydrofilních a ionizovatelných skupin jsou dobře rozpustné ve vodě, pufrch a kyselých vodných roztocích, nerozpustné jsou v nepolárních organických rozpouštědlech. Ve struktuře jsou obsaženy jak kyselé, tak i zásadité skupiny, proto jsou glykopeptidy řazeny mezi amfoterní látky a jejich vlastnosti velmi závisí na pH. Se snižujícím se pH základního elektrolytu se zvyšuje efektivita chirální separace. Vliv pH se projevuje i při sledování stability antibiotik; nejstabilnější jsou v oblasti mezi pH 4 až 9. Degradace antibiotik způsobuje šum na základní linii, zhoršení separace a prodloužení analýzy [6,25].

Vankomycin je glykoprotein, který se v CE používá nejčastěji. Má tři makrocyclické kruhy a jeden připojený disacharid. Vankomycin je tvořen 18 chirálními centry a mezi jeho funkční skupiny patří hydroxylové, chloro, amino a amidokarboxylové skupiny. Isoelektrický bod (pI) vankomycinu je přibližně 7,5. Při pH nižším než je hodnota pI převládá na vankomycinu kladný náboj [6,15,21].

Teicoplanin také patří do skupiny glykoproteinů a je vhodným doplňkem tam, kde vankomycin nestačí. Má 4 makrocyclické kruhy, 23 chirálních center a mnoho funkčních skupin mezi které patří amidokarboxylové skupiny, hydroxyskupiny a oproti vankomycinu pouze jedna volná aminoskupina. Proto teicoplanin tolik neinteraguje se stěnou kapiláry. Teicoplanin je povrchově aktivní. Jeho pI je 3,8, proto se hodí hlavně pro separaci záporně nabitých enantiomerů [6,26].



Obr. 21 – Struktura vankomycinu (a) a teicoplaninu (b). Převzato a upraveno z [27,28].

2.6 Vybrané organické kyseliny v lidském organismu

Organické kyseliny jsou v lidském těle součástí mnoha životně důležitých biochemických procesů a metabolických drah látek přítomných v organismu. Například do Krebsova cyklu, který probíhá v mitochondriích a je centrálním biochemickým procesem pro získání energie ze sacharidů, lipidů i proteinů, je zapojeno devět organických kyselin a osm enzymů. Jestliže je některý enzym defektní, způsobuje změny v metabolických drahách Krebsova cyklu, což vede ke vzniku atypických meziproduktů. Podobně vznikají atypické meziprodukty i u ostatních metabolických drah s defektním enzymem. Meziprodukty nebo jejich metabolity jsou následně vyloučeny močí, kde jsou obsaženy ve vyšší koncentraci, než je obvyklé u zdravých jedinců. Tyto poruchy v metabolických drahách jsou nazývány organické acidurie a spadají do skupiny dědičných poruch metabolismu. Dědičné poruchy metabolismu jsou vzácné a vyskytují se obecně u 1 z 5000 živě narozených dětí. Ohrožení života může být způsobeno hromaděním toxických reaktantů, nedostatkem produktů biochemických procesů nebo vznikem toxických meziproduktů alternativními biochemickými procesy [29].

Je důležité si uvědomit, že organická acidurie nemusí být vždy důsledkem dědičné poruchy metabolismu. Defektivní enzymová aktivita může být více či méně ovlivněna řadou faktorů, jako je požití drog, léků, vitamínů a dalších látek.

Analýza organických kyselin je velmi používanou technikou pro úspěšnou diagnózu vrozených poruch metabolismu a dalších fyziologických a patofyziologických procesů v lidském organismu. Pacienti s organickou acidurií často trpí závažnými symptomy a včasná diagnóza a vhodná léčba jim mohou zachránit život. Zvláště důležitá je rychlost stanovení u novorozenců, kteří mají příznaky metabolické acidurie.

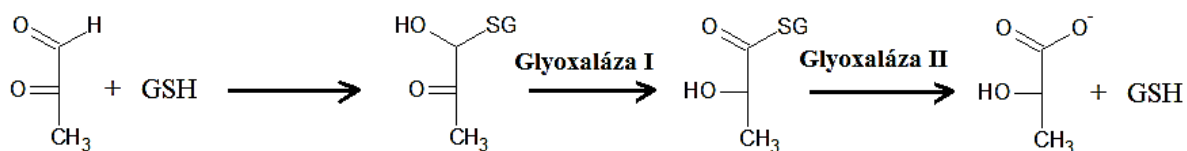
CE dovoluje rychlé a jednoduché stanovení organických kyselin z tělních tekutin pacientů bez složité předúpravy vzorku a derivatizace, tzv. profiling [30]. Zároveň je tato metoda vhodná pro chirální separace organických kyselin, protože jejich optická izomerie je velmi častá. Každý optický izomer může být důležitým markerem pro jinou poruchu metabolismu.

Nejčastěji se využívá stanovení z moči pacientů. Moč je obvykle prostá proteinů, proto pro úpravu vzorku stačí jednoduchá filtrace a takto upravený a naředěný vzorek je možno nadávkovat do kapiláry. Pokud je požadována vysoká citlivost, upravují se vzorky moči pomocí extrakce pevnou fází (SPE) nebo klasické extrakce kapalina-kapalina (LLE). Při stanovení z plazmy nebo krevního séra se vyhýbáme dávkování neupraveného vzorku

Koncentrace D-mléčné kyseliny je ve zdravém organismu asi stokrát menší, než koncentrace druhého enantiomeru, a je odbourávána enzymem D-laktát dehydrogenázou na pyruvát [34]. Pokud se mnohonásobně zvýší produkce D-mléčné kyseliny, hromadí se v organismu z důvodu nedostatku enzymu D-laktát dehydrogenázy ve své původní formě, což vede k příznakům D-laktátové acidurie, jako jsou bolesti hlavy, porucha koordinace pohybů, ospalost, strnulost, poruchy chování a ochrnutí očních svalů.

Zvýšená koncentrace kyseliny D-mléčné v moči může být ukazatelem syndromu krátkého střeva (SBS). Je to bakteriální infekce, kdy se D-mléčná kyselina do organismu dostává ve zvýšené míře jako produkt grampozitivních bakterií s buněčnou stěnou tvořenou proteoglykanem a polysacharidy (např. *Lactobacillus* a *Eubacterium*), které se v poškozené mikroflóře tlustého střeva množí v důsledku fermentace nevstřebaných sacharidů [34,35,36].

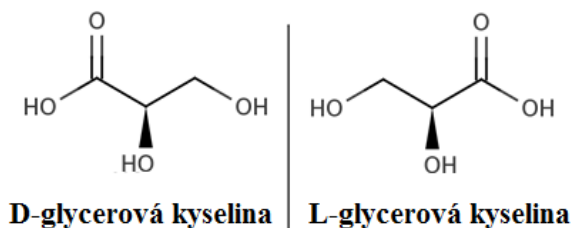
Druhá možnost zvýšení hladiny D-mléčné kyseliny v organismu je odbourávání zvýšeného množství vytvořeného methylglyoxalu, který je velmi jedovatý a v organismu vzniká jako vedlejší produkt glykolýzy (z dihydroxyacetonfosfátu) nebo jako metabolit degradace acetonu (při cukrovce nebo hladovění) a aminokyselin glycinu a threoninu [34,37]. Tato metabolická dráha je znázorněna na obrázku 24; methylglyoxal je přeměněn na kyselinu D-mléčnou reakcí s glutathionem (GSH) za následné katalýzy enzymy glyoxalasa I a II [38].



Obr. 24 – Přeměna methylglyoxalu na D-mléčnou kyselinu. Převzato a upraveno z [39].

2.6.2 Kyselina glycerová

Glycerová kyselina (2,3-dihydroxypropanová kyselina) má molekulovou hmotnost 106,08 g/mol. Vyskytuje se jako bezbarvá sirupovitá kapalina o hustotě 1,55 g/cm³; v bezvodém stavu je to bílá krystalická látka, která je dobře rozpustná ve vodě, alkoholu a acetonu. O tom, že se nejedná o silnou kyselinu, svědčí hodnota disociační konstanty, která je při 25 °C rovna $2,81 \cdot 10^{-4}$, pK_a je 3,55 [40]. Součástí struktury této látky je jeden chirální uhlík.



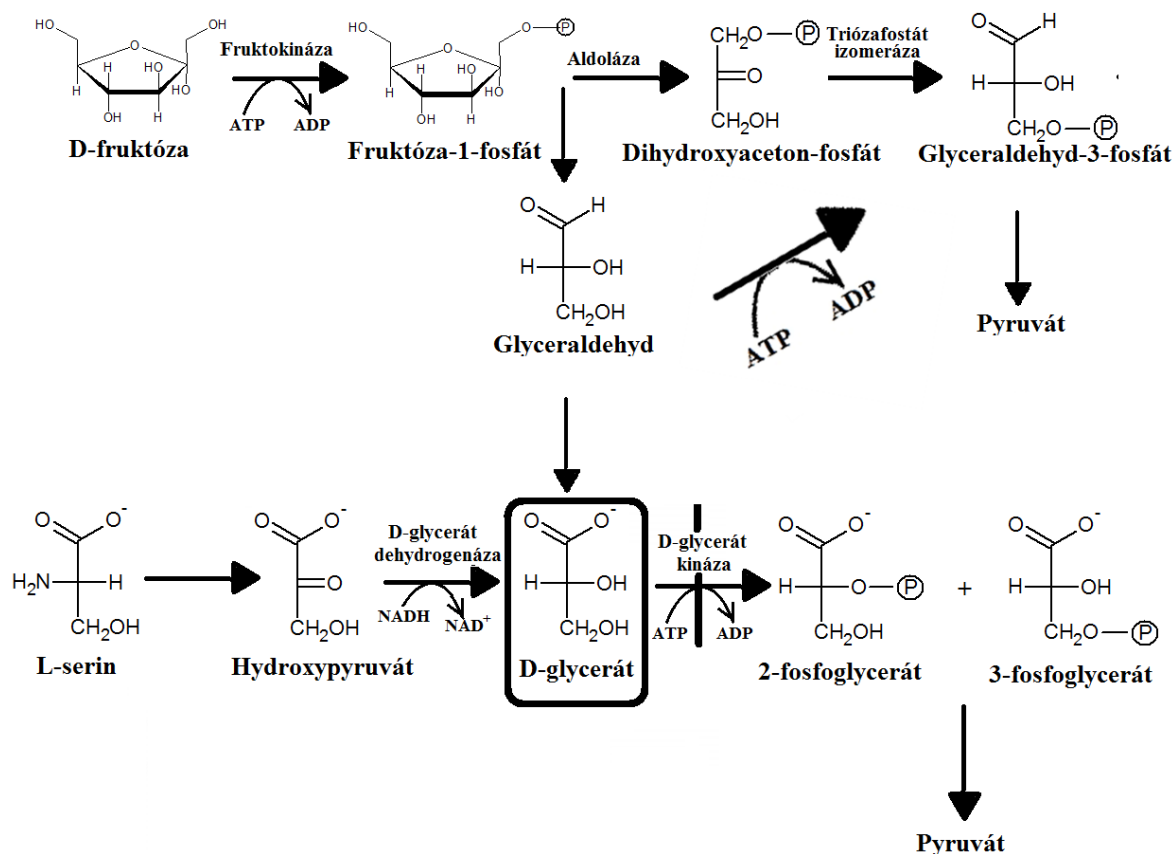
Obr. 25 – Enantiomery glycerové kyseliny. Převzato a upraveno z [41].

Oba enantiomery glycerové kyseliny jsou významné metabolity lidského organismu, které jsou vylučovány močí ve stopových koncentracích. Výskyt zvýšeného množství glycerové kyseliny v moči je velmi vzácný a je zaznamenán pouze ve dvou případech vrozených poruch metabolismu, kterými jsou D-glycerová acidurie (D-GA) a L-glycerová acidurie (L-GA) [42,43].

D-glycerová acidurie

Zvýšená koncentrace D-glycerové kyseliny v moči je jediným indikátorem nemoci D-glycerové acidurie, která se projevuje velmi vážnými příznaky, jako je opožděný vývoj psychomotoriky, mentální retardace, slabé svalové napětí, úbytek váhy a silné křeče. Většina pacientů postižených touto vzácnou poruchou metabolismu umírá v dětském věku [43].

D-glycerová kyselina je jedním z meziproductů metabolismu fruktózy a degradace serinu. Akumulace této kyseliny v těle pacienta je způsobena buď zvýšením její produkce (zvýšené množství odbourávaného serinu nebo fruktózy), nebo snížením jejího využití v organismu. Vědci předpokládají, že jediným osudem v organismu vznikající D-glycerové kyseliny je konverze katalyzovaná D-glycerát kinázou na 2-fosfoglycerát a 3-fosfoglycerát [42]. Pokud je aktivita tohoto enzymu z nějakého důvodu nedostatečná, dochází k hromadění D-glycerové kyseliny v organismu, což způsobuje zdravotní problémy.

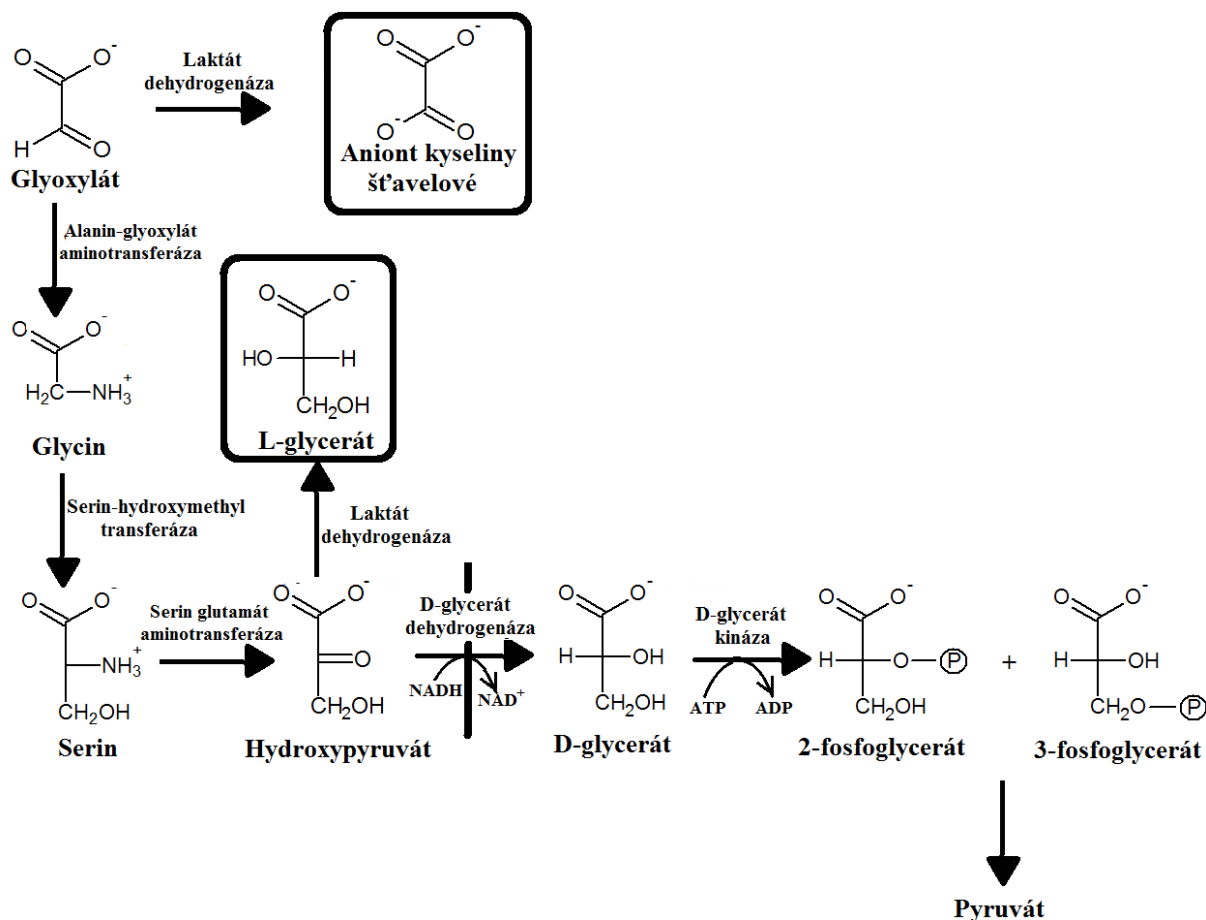


Obr. 26 – Metabolické dráhy vedoucí na D-glycerát. Převzato a upraveno z [42,44,45].

L-glycerová acidurie

Tato porucha metabolismu je také známá pod názvem primární hyperoxalurie typu 2. Kromě zvýšené hladiny L-glycerové kyseliny, která je indikátorem této nemoci, je také zaznamenána abnormálně zvýšená produkce šťavelové kyseliny, která se v ledvinách slučuje s vápníkem za vzniku krystalického šťavelanu vápenatého. Tím je způsobena nefrolitiáza – vznik přesycené moči, ve které dochází k tvorbě krystalů, k jejich růstu a ke vzniku ledvinových kamenů, k selhání ledvin, infekci močových cest, k přítomnosti krve v moči a poškození dalších orgánů [42,46,47,48]. Symptomy se objevují v průběhu dětství.

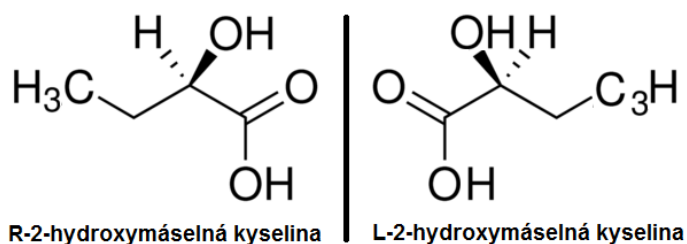
Příčinou L-glycerové acidurie je nedostatek enzymu D-glycerát dehydrogenázy. Důsledkem je jednak hromadění hydroxypyruvátu, ze kterého vzniká díky enzymu laktát dehydrogenáza L-glycerová kyselina, ale také podpora syntézy kyseliny šťavelové z glyoxylátu místo obvyklé transaminace této sloučeniny na glycin [46].



Obr. 27 – Metabolické dráhy vedoucí na L-glycerát. Převzato a upraveno z [42,46,49].

2.6.3 Kyselina 2-hydroxymáselná

Tato kyselina, známá také pod názvem 2-hydroxybutanová kyselina (2-HB), je bílou krystalickou látkou s hustotou 1,196 g/cm³, která taje při teplotě 44,2 °C. Její molekulová hmotnost je 104,10 g/mol. Vyznačuje se poměrně velkou rozpustností ve vodě, a to 484 g/l. Hodnota disociační konstanty této 2-HB kyseliny je při 25 °C rovna 10,23·10⁻⁵, pK_a je tedy 3,99 [50,51]. Také tato kyselina obsahuje ve své struktuře jedno chirální centrum.

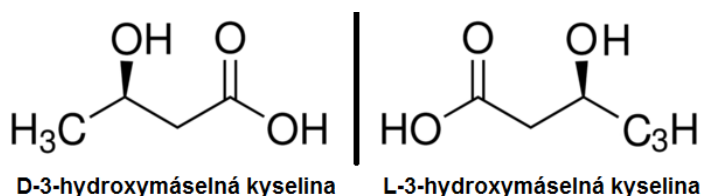


Obr. 28 – Enantiomery 2-hydroxymáselné kyseliny. Převzato a upraveno z [52].

Kyselina 2-hydroxymáselná se v lidském organismu vyskytuje jako vedlejší produkt tvorby 2-oxomáselné kyseliny. Tato přeměna je katalyzována enzymy laktát dehydrogenáza nebo α -hydroxybutyrát dehydrogenáza. 2-oxomáselná kyselina je výchozí látkou pro anabolismus glutathionu. Pokud je z nějakého důvodu tato dráha inhibována nebo zpomalena, hromadí se 2-oxomáselná kyselina v organismu a je přeměňována na 2-hydroxymáselnou kyselinu. Ta je pak vylučována močí v abnormálně vysoké koncentraci. 2-hydroxymáselná kyselina je tedy mimo jiné důležitým indikátorem laktátové acidózy a ketoacidózy nebo poruchy regulace glukózy. V poslední době bylo zjištěno, že pomocí monitorování zvýšení hladiny 2-HB kyseliny v plazmě lze odhalit rané stadium diabetes typu II [50,53]. Role jednotlivých enantiomerů v organismu člověka však stále zůstává nejasná.

2.6.4 Kyselina 3-hydroxymáselná

3-hydroxymáselná kyselina, která je také nazývaná 3-hydroxybutanová (3-HB), je polohovým izomerem 2-HB kyseliny, proto je molekulová hmotnost také 104,10 g/mol. Jedná se také o krystalickou látku, protože bod tání je 46 °C. Hustota této látky je 1,126 g/cm³, rozpustnost je 539 g/l. Protože má při 25 °C disociační konstantu $3,89 \cdot 10^{-5}$, je tedy slabší kyselinou než 2-HB kyselina. Hodnota pK_a je rovna 4,41 [54,55].



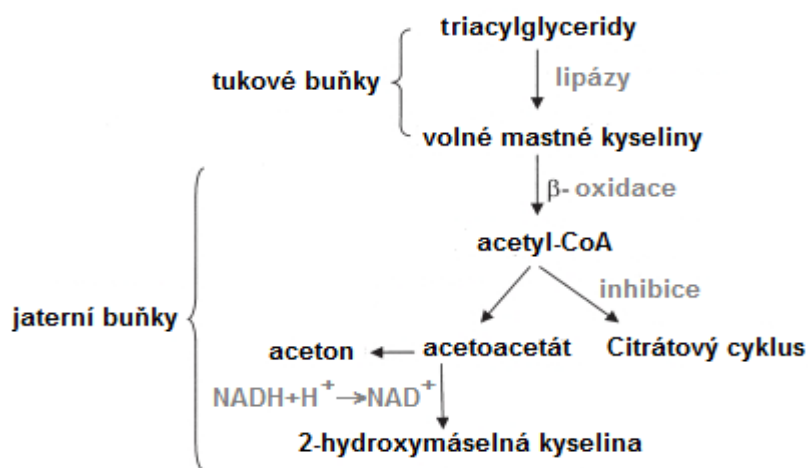
Obr. 29 – Enantiomery 3-hydroxymáselné kyseliny. Převzato a upraveno z [56].

V lidském organismu je tato látka běžná a velmi důležitá. Nízká hladina inzulínu je signálem pro játra, že organismus hladoví a nemá dostatek energie z glukózy. Začne probíhat katabolismus lipidů na acetyl-CoA, ze kterého se v játrech syntetizuje acetoacetát, aceton a 3-HB kyselinu. Pokud člověk opravdu hladoví, nazýváme tento stav, který není škodlivý, ketóza.

Lidé trpící nedostatkem inzulínu mají dostatečnou koncentraci glukózy v krvi, ale přesto probíhají katabolické reakce a játra produkují acetoacetát, aceton a 3-HB kyselinu. Tyto

látky však v organismu nejsou využity a hromadí se. Protože jsou to slabé kyseliny, snižují pH krve a způsobují ketoacidózu, která může vést až k selhání orgánů [57,58,59].

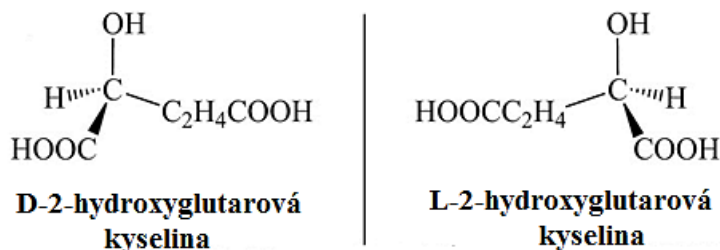
Hladina 3-HB kyseliny v krvi nebo v moči spolu s acetonem a acetoacetátem je tedy sledována jako marker diabetické ketoacidózy [54]. Za normálního stavu jsou acetoacetát a 3-HB kyselina přítomny v krvi v ekvimolárních množstvích. Pokud je však v tkáních nedostatek kyslíku, je acetoacetát redukován na kyselinu 3-HB, kterou klasické testovací proužky nedetekují. Nemuselo by tedy dojít k včasnému rozpoznání ketoacidózy. Proto je důležité studovat možnosti stanovení této kyseliny instrumentálně [57]. Podobně jako u 2-HB kyseliny není známá úloha enantiomerů L-3-HB kyseliny a D-3-HB kyseliny v lidském organismu.



Obr. 30 – Schéma reakcí probíhajících při ketóze a ketoacidóze. Převzato a upraveno z [58].

2.6.5 Kyselina 2-hydroxyglutarová

2-hydroxyglutarová kyselina (2-HG), kterou je také nazývána 2-hydroxypentandiová kyselina, je bílá krystalická látka snadno rozpustná ve vodě s molekulovou hmotností 148,11 g/mol a hustotou 1.5 g/cm³. Disociační konstanta 2-HG kyseliny při 25 °C je $5,24 \cdot 10^{-4}$, pK_{a1} je rovno 3,28, pK_{a2} nebylo publikováno [60]. Ve struktuře této látky je jedno chirální centrum, a to na uhlíku číslo dvě, jak je vidět na obrázku 31.



Obr. 31 – Enantiomery 2-HG kyseliny. Převzato a upraveno z [4].

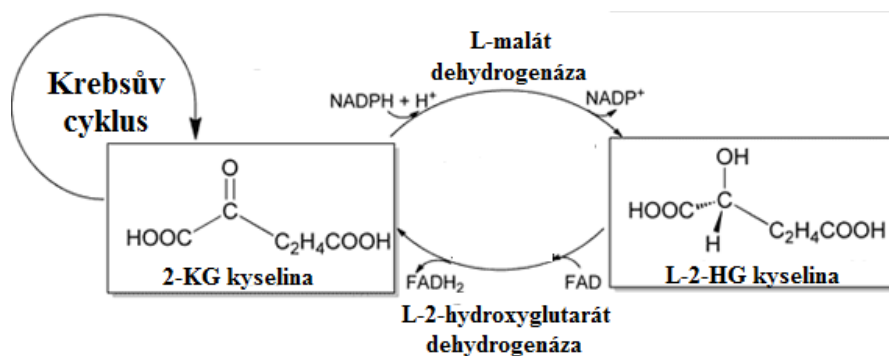
Přebytek 2-HG kyseliny v organismu, tedy i v tělních tekutinách, je způsoben mutací některého ze čtyř genů, které řídí mitochondriální enzymy D- a L-2-hydroxyglutarát dehydrogenázu nebo isocitrát dehydrogenázu 2. Tato vzácná vrozená porucha metabolismu je nazývána 2-hydroxyglutarová acidurie (2-HGA), která se u většiny pacientů projevuje nevysvětlitelným vývojovým opožděním nebo jinou neurologickou dysfunkcí neznámého původu [2].

Podle příčiny 2-HGA rozlišujeme čtyři druhy této nemoci, proto je velmi důležitá správná identifikace enantiomerů v tělních tekutinách, díky které je možné určit typ nemoci pacienta.

L-2-hydroxyglutarová acidurie

Tato nemoc se začíná projevovat až v průběhu dětství, kdy je zaznamenáno duševní i motorické vývojové opoždění dítěte, epilepsie, ale také cerebelární ataxie, což je dysfunkce mozečku, který se podílí na smyslovém vnímání a koordinaci pohybů. Proto se u dítěte často projevuje ochablost svalů, nedostatečná koordinace pohybů, zhoršená schopnost odhadovat vzdálenost, sílu, rychlost, čas a neschopnost provádět rychlé a střídavé pohyby. Často se tuto nemoc podaří diagnostikovat až v období dospívání. V pozdějších fázích nemoci se projevují další příznaky, jako jsou křeče, neschopnost chůze a smysluplné řeči [2].

L-2-HG kyselina nemá v organismu žádnou funkci, protože je pro něj toxická. Vzniká jako nežádoucí vedlejší reakce přeměny L-malátu na oxalacetát v Krebsově cyklu za katalýzy L-malát dehydrogenázy. Katabolismus L-2-HG kyseliny je zajištěn její přeměnou na 2-ketoglutarát (2-KG) enzymem L-2-hydroxyglutarát dehydrogenázou, který slouží jako náprava nežádoucí výše uvedené reakce, za redukce koenzymu FAD. Pokud ale tento enzym nepracuje správně, hromadí se L-2-HG kyselina v buňkách, pro které je velmi toxická. Tuto nemoc značí 10 až 300 krát zvýšená koncentrace L-2-HG kyseliny v moči [61]. Metabolismus L-2-HG kyseliny je naznačen na obrázku 32.

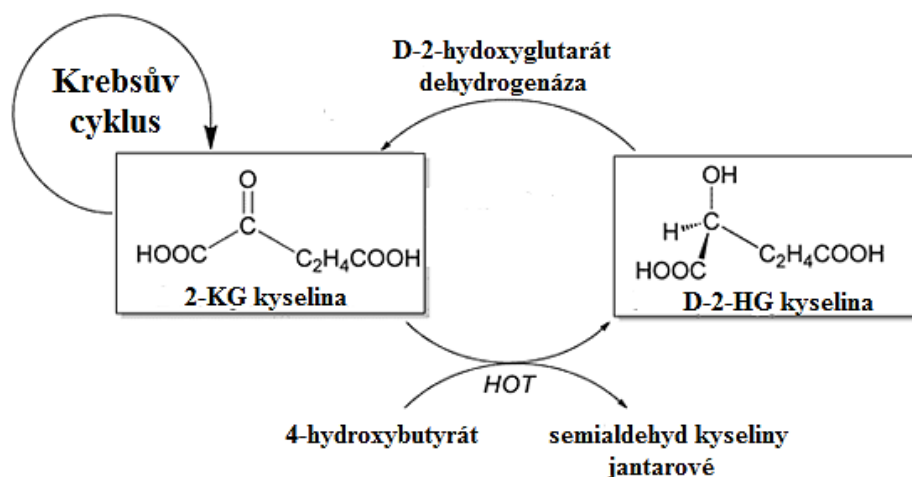


Obr. 32 – Schéma metabolismu L-2-HG kyseliny. Převzato a upraveno z [61].

D-2-hydroxyglutarová acidurie typu I

První příznaky tohoto typu 2-HGA, kterými jsou opožděný vývoj, slabé svalové napětí (děti jsou jako hadrové panenky) a epileptické záchvaty, se začínají projevovat během prvních šesti let života dítěte. Délka života těchto pacientů není nijak omezena.

D-2-HGA typu I a II se liší způsobem vzniku nadměrného množství D-2-HG kyseliny. D-2-HG kyselina vzniká v organismu jako nepotřebný a toxický produkt reakce, při které vzniká semialdehyd kyseliny jantarové reakcí 2-KG s γ -hydroxybutyrátem za katalýzy transhydrogenázou HOT. Proto je potřeba enzym D-2-hydroxyglutarát dehydrogenáza katalyzující přeměnu D-2-HG kyseliny zpět na 2-KG [2,61]. Pokud je ale tento enzym defektní, D-2-HG kyselina se hromadí a působí toxicky na buňky. Metabolismus D-2-HG kyseliny je naznačen na obrázku 33.

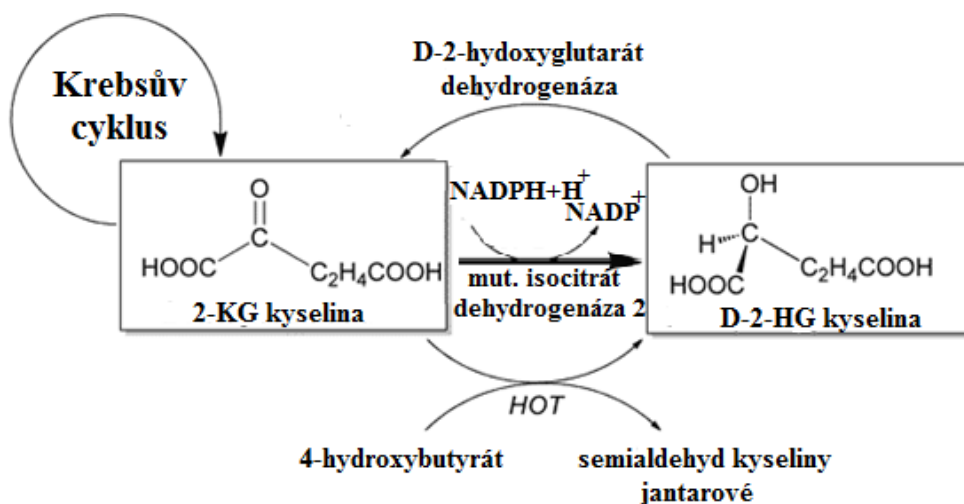


Obr. 33 – Schéma metabolismu D-2-HG kyseliny. Převzato a upraveno z [61].

D-2-hydroxyglutarová acidurie typu II

Příznaky D-2-HGA typu II jsou shodné s příznaky typu I, objevují se ale během prvních dvou let života dítěte. Epileptické záchvaty jsou oproti typu I mnohem častější a závažnější, navíc se objevuje kardiomyopatie, což je označení pro skupinu chorob postihujících samotný srdeční sval. Stav pacienta se většinou v průběhu nemoci nezhoršuje, v některých případech bylo zaznamenáno i zlepšení. Průměrná délka života pacientů trpících touto nemocí je v rozmezí od několika měsíců až po časnou dospělost [2,61].

Enzym isocitrát dehydrogenáza 2 je mitochondriální enzym Krebsova cyklu, jehož normální funkcí je reverzibilně převádět isocitrát na 2-ketoglutarát. Pokud je však tento enzym pozměněn genovou mutací, má novou funkci, kterou je vyrábět toxickou sloučeninu D-2-HG kyseliny. Koncentrace D-2-HG kyseliny v tělních tekutinách je v tomto případě 2-8 krát vyšší než u typu I [2,62].



Obr. 34 – Vznik D-2-HG kyseliny při D-2-HGA typu II. Převzato a upraveno z [61].

Kombinovaná D, L-2-hydroxyglutarová acidurie

Tento nejvzácnější, ale také nejvážnější typ 2-HGA je prokázán přítomností obou enantiomerů 2-HG kyseliny v moči. Opožděný vývoj, příliš malé svalové napětí, epileptické záchvaty a křeče, porucha funkce srdce a problémy s dýcháním jsou tak závažné příznaky, že většina takto nemocných pacientů umírá do věku 3 let [2,62].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Všechna měření byla prováděna kapilární elektroforézou Agilent 7100 (Waldbronn, Německo) s hmotnostní detekcí trojitým kvadrupólem Agilent G6460. Iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru byl elektrosprej. Pomocná kapalina pro elektrosprej byla přiváděna isokratickou pumpou Agilent G1310 s děličem toku v poměru 1:100. Veškerý sběr a vyhodnocení dat bylo prováděno softwarem Agilent ChemStation a Agilent MassHunter v příslušných verzích k daným přístrojům.

3.2 Chemikálie a pomůcky

Chemikálie, které byly v této práci použity, byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA, St. Louis), a to v p.a. čistotě. Jedná se o kyselinu octovou, hydroxid amonný, vankomycin chlorid, methanol a chemikálie na pokrývání kapilár, kterými jsou hydroxid sodný, kyselina dusičná, absolutní ethanol, 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát, akrylamid, *N,N,N',N'*-tetramethyldiamin, peroxodisulfát draselný. Standardy jednotlivých kyselin byly zakoupeny taktéž v p.a. čistotě od firmy Sigma-Aldrich. Jsou to L-(+)-mléčná kyselina ($M_r = 90,08$), lithná sůl kyseliny D-mléčné ($M_r = 96,01$), *S*-3-hydroxybutanová ($M_r = 104,1$), *R*-3-hydroxybutanová kyselina ($M_r = 104,1$), *S*-2-hydroxybutanová kyselina ($M_r = 104,1$), sodná sůl 2-hydroxybutanové kyseliny ($M_r = 126,09$), vápenatá sůl kyseliny L-(-)-glycerové ($M_r = 125,1$), vápenatá sůl kyseliny glycerové ($M_r = 125,1$), sodná sůl D-2-hydroxyglutarové kyseliny ($M_r = 192,08$), sodná sůl L-2-hydroxyglutarové kyseliny ($M_r = 192,08$). Dále byly použity reálné vzorky moči. Deionizovaná voda byla připravena přístrojem na přípravu deionizované vody Millipore (Francie).

Dále byl použit ultrazvuk ElmaSonic S4OH, analytické váhy Mettler-Toledo, pH-metr InoLab-IDS (Multi 9310P, WTW, Německo), automatické pipety, filtry Millipore (průměr 22 μm) a laboratorní sklo.

3.3 Příprava standardů, separačního pufru a pomocné kapaliny

Roztoky standardů daných kyselin byly připraveny díky jejich dobré rozpustnosti rozpuštěním v deionizované vodě v ultrazvukové lázni tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1 mg/ml. Tyto roztoky byly dále podle potřeby ředěny deionizovanou vodou.

Pro přípravu separačního pufru bylo potřeba nejprve připravit vodný roztok kyseliny octové o dané koncentraci. Poté bylo požadované pH dosaženo přidáváním hydroxidu amonného až do požadované hodnoty pH. Pevný vankomycin chlorid byl přidáván do připraveného separačního pufru v předem vypočítaných množstvích, aby byla dosažena požadovaná koncentrace chirálního selektoru v pufru. Jeho rozpustnost v separačním pufru na ultrazvukové lázni byla dobrá.

Pomocná kapalina byla složena z methanolu, deionizované vody a 25% (w/w) hydroxidu amonného v poměru 50:48:2. Připravená pomocná kapalina byla umístěna do ultrazvukové lázně, a poté zapojena do spojení CE-MS.

3.4. Podmínky separace a detekce

K separaci metodou úplného plnění kovalentně pokryté kapiláry byla použita kapilára (MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA) o celkové délce 60 cm s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 365 μm . Vnitřní povrch kapiláry byl před použitím kovalentně pokryt. Postup pokrytí je v kapitole 3.5. Separační pufr byl použit 50 mM acetát amonný o pH 4,5.

Kapilára byla termostatována na 25 $^{\circ}\text{C}$; separační napětí bylo -25 kV. Protože k separaci byla použita metoda úplného plnění separační kapiláry, byla kapilára celá naplněna separačním pufrem, který obsahoval vankomycin chlorid. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 100 mbar po dobu 150 s. Každý den před experimentem byla kapilára 15 minut promývána deionizovanou vodou a poté dalších 15 minut základním elektrolytem bez chirálního selektoru. Po skončení experimentu byla kapilára promývána 15 minut deionizovanou vodou a dalších 15 minut vzduchem. Mezi analýzami byla kapilára 2 minuty promývána separačním pufrem s chirálním selektorem.

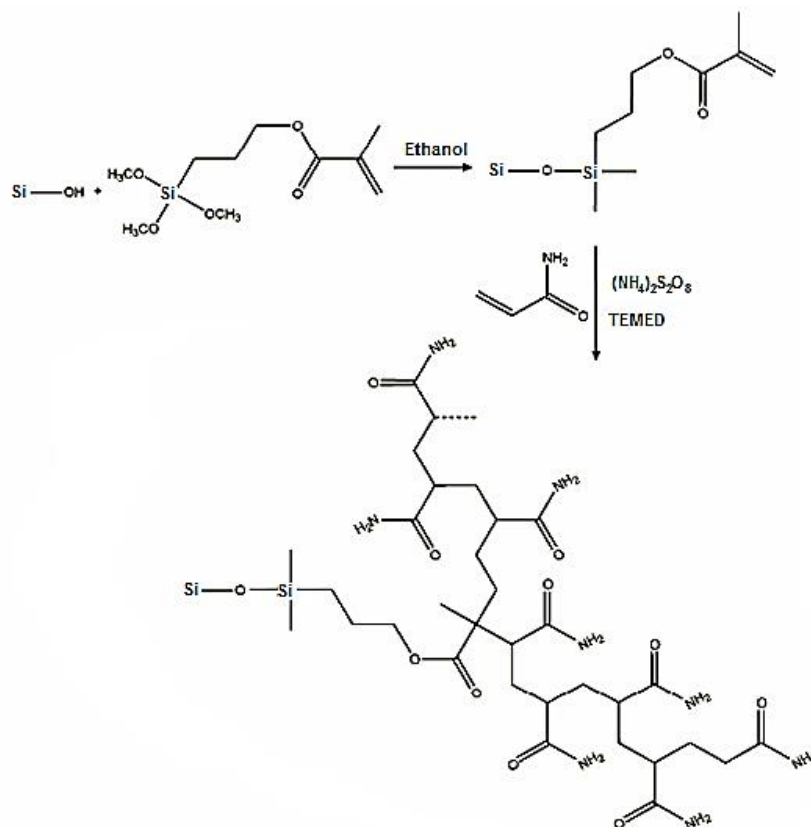
Podmínky pro hmotnostní detekci byly následovné. Napětí na konci sprejovací kapiláry bylo -2,5 kV, průtok sušícího plynu o teplotě 200 $^{\circ}\text{C}$ byl 10 L/min. Průtok pomocné kapaliny byl 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ a tlak zmlžovacího plynu byl 10 psi. Kvadrupól pracoval ve skenovacím

módu TIC, SIM (nastavený na určitou hodnotu m/z pro [M-H]) a SRM (monitorování odštěpení molekuly vody z molekuly sledované kyseliny [M-H-18]).

3.5 Pokrývání kapilár

3.5.1 Teorie kovalentního pokrytí kapilár

Pro chirální separace karboxylových kyselin s využitím vankomycin chloridu je potřeba pracovat s kovalentně pokrytými kapilárami, ve kterých bude potlačen EOF. Jednou z možností je vytvořit polyakrylamidové kovalentní pokrytí kopolymerací na vnitřním povrchu kapiláry. Zjednodušená rovnice znázorňující chemickou reakci probíhající při vzniku polyakrylamidového kovalentního pokrytí je na obrázku 35 [63].



Obr. 35 – Vznik kovalentního pokrytí kapiláry. Převzato z [63].

3.5.2 Postup pokrývání kapiláry

Kapilára se promývá tři hodiny roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/dm^3 , poté třicet minut deionizovanou vodou a nakonec tři hodiny roztokem kyseliny dusičné o koncentraci 1 mol/dm^3 . Následuje silylace kapiláry 1% (v/v) roztokem 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylátu v absolutním ethanolu, která trvá tři hodiny. Po třicetiminutovém promytí silylované kapiláry deionizovanou vodou probíhá polymerace roztokem 4% (w/v) akrylamidu v čerstvě převařené deionizované a zchlazené vodě, která obsahuje 0,1% (w/v) peroxodisulfátu draselného a 0,1% (v/v) *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiaminu (TEMED). Tato polymerace trvá dvanáct hodin. Nakonec se kapiláry promývají třicet minut deionizovanou vodou.

Tento postup vytváří poměrně stabilní pokrytí kapiláry, které je použitelné v kyselém pH, to je v rozmezí pH 2,0 – 8,0.

3.5.3 Ověření správnosti pokrytí

Pokud chceme ověřit, zda je pokrytí kapiláry kvalitní, musíme změřit elektroosmotický tok v kapiláře. Nulový EOF znamená dobře provedené pokrytí kapiláry. Nejprve je do pokryté kapiláry elektrokineticky nadávkován neutrální marker. Protože marker není nabitý, dostane se do kapiláry při dávkování jen takové množství markeru, které odpovídá velikosti EOF. Toto množství markeru je detekováno. Pokud je v kapiláře nulový EOF, nebude marker detekován [64].

3.6 Příprava reálného vzorku moči

Vzorky moči byly desetkrát naředěny deionizovanou vodou, 1 minutu protřepány a přefiltrovány přes 22 μm nylonový stříkačkový filtr do vialky. Poté byla zředěná moč nadávkována do kapiláry.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Jeden z možných přístupů k optimalizaci analytické metody pro více strukturně podobných látek je optimalizovat metodu pro jednu látku. Předpokladem pak je, že tyto podmínky budou vyhovovat separaci i ostatních látek. Metodu jsem optimalizovala pro 2-hydroxyglutarovou kyselinu.

Pro separace všech kyselin, na které je tato práce zaměřena, byla použita metoda úplného plnění kovalentně pokryté kapiláry (angl. complete filling technique; CFT), což je obdoba metody částečného plnění kapiláry (angl. partial filling technique; PFT). Této metody se využívá v případě, že nějaká složka separačního pufru, v tomto případě použitý chirální selektor vankomycin chlorid ($M_r = 1485,72$), není dostatečně těkává. Nesmí se tedy dostat do iontového zdroje kvůli riziku jeho kontaminace a v důsledku toho snížení citlivosti detekce. Pracovním elektrolytem s vankomycin chloridem je naplněna celá pokrytá kapilára. Vzorek je nadávkován na začátek kapiláry a vložení negativního separačního napětí dojde při vhodné zvoleném pH separačního pufru k protisměrné migraci vankomycin chloridu (od iontového zdroje) a enantiomerů kyselin (k iontovému zdroji).

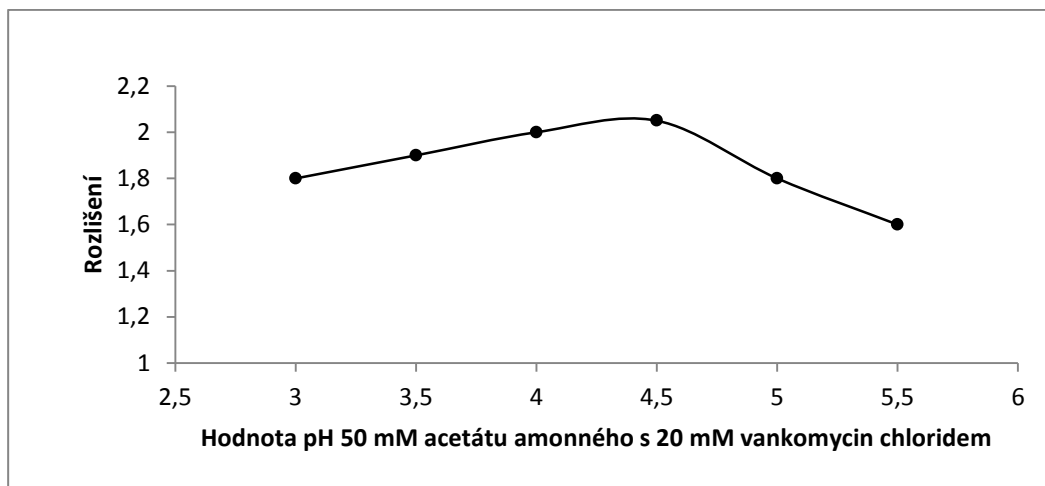
4.1 Optimalizace chirální separace

Při hledání vhodných podmínek pro chirální separaci je třeba brát v úvahu typ detektoru, kterým je v tomto případě hmotnostní spektrometr. Separací pufr by tedy měl být dostatečně těkávý, což splňují pouze dva pufrы – acetát amonný a formiát amonný o zvolené koncentraci 50 mmol/l. Optimální koncentrace separačního pufru byla ověřena jako poslední bod optimalizace chirální separace.

Vankomycin chlorid je využíváný chirální selektor pro separace enantiomerů α -hydroxykarboxylových kyselin, kterými se také zabývá i tato práce. Nejprve byl studován vliv délky separační zóny s vankomycin chloridem na rozlišení (metoda PFT). Pro tento experiment byla zvolena koncentrace chirálního selektoru v separačním pufru 20 mmol/l. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při využití celé délky separační kapiláry jako separační zóny s chirálním selektorem, protože separace mohla probíhat v celé délce kapiláry. Proto byla jako vhodná metoda separace zvolena CFT.

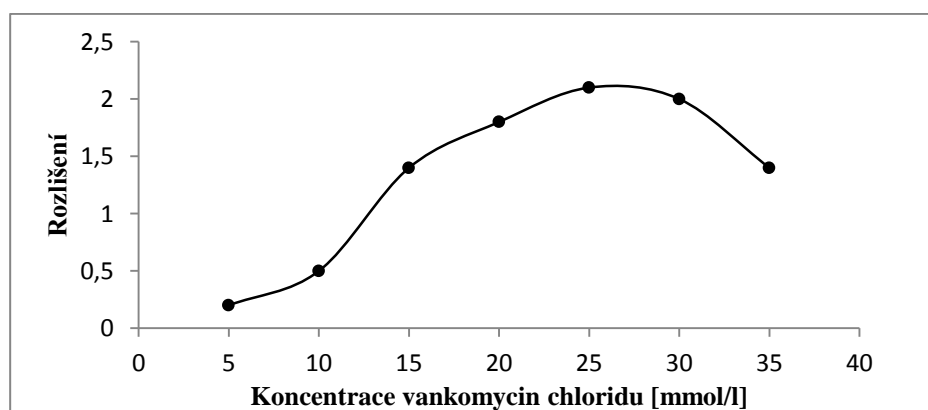
Při použití CFT s kovalentně pokrytými kapilárami (s nulovým EOF) je třeba ověřit, že se netěkavý chirální selektor opravdu nedostává do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. V prvním experimentu byla kapilára naplněna elektrolytem s 20 mM vankomycin chloridem; bylo aplikováno separační napětí -20 kV. Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním i negativním TIC módu v rozmezí m/z 100 až 2000. Protože v tomto rozmezí nebyly zaznamenány žádné píky, znamená to, že iont vankomycinu, ani žádný jeho fragment, se do zdroje nedostává. Druhý experiment spočíval v porovnání ploch píků při stanovení čistého enantiomeru (L-2-HG kyseliny) v separačním pufru bez vankomycin chloridu a s vankomycin chloridem při zachování všech ostatních podmínek. Protože plochy píků byly srovnatelné (s rozdílem nižším než 8%), bylo možné vyvodit nulovou kontaminaci vzorku i iontového zdroje chirálním selektorem. Proto byla metoda CFT použita pro další optimalizaci a stanovení.

V kyselém pH 3,0 - 5,0 je vankomycin chlorid dvakrát kladně nabitý, což zaručuje jeho migraci v opačném směru než separované kyseliny. Protože podmínky měly být optimalizovány pro separaci 2-HG kyseliny, bylo nutno zvolit takové pH, ve kterém bude dobře disociována, tedy záporně nabitá. Tato kyselina má při 25 °C pK_{a1} rovno 3,28, pK_{a2} nebylo publikováno. Vhodné pH chirální separace enantiomerů 2-HG kyseliny s využitím vankomycin chloridu jako chirálního selektoru je tedy v kyselé oblasti. Byl proměřen 50 mM formiát amonný a 50 mM acetát amonný, oba s koncentrací vankomycin chloridu 20 mmol/l o pH 3,0 až 5,5. Formiát amonný poskytoval neopakovatelné plochy a migrační časy separovaných enantiomerů, proto byl dále studován jen vhodnější acetát amonný. Závislost rozlišení na pH acetátového separačního pufru ukazuje obrázek 36. Nejlepšího rozlišení, a také nejsymetričtějšího píku, bylo dosaženo při separaci 2-HG kyseliny v 50 mM acetátu amonném při pH 4,5.



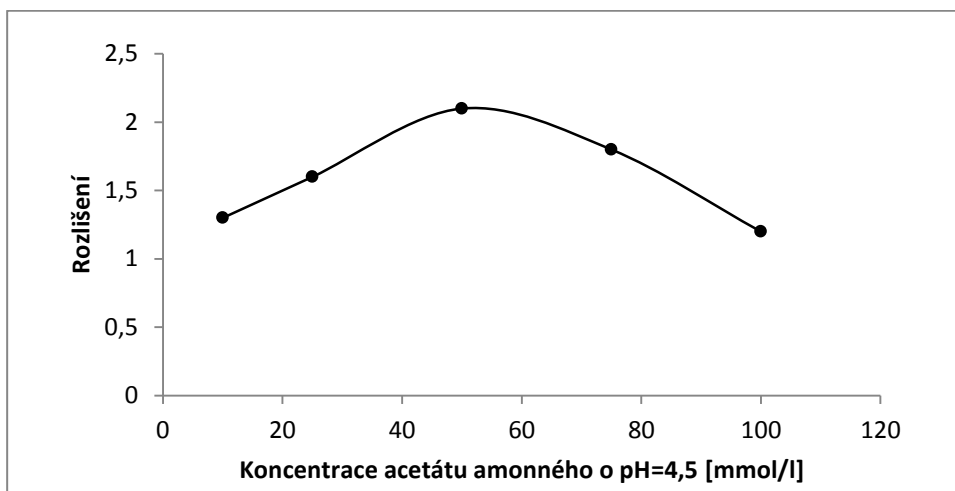
Obr. 36 – Závislost rozlišení na pH 50 mM acetátu amonného o koncentraci vankomycin chloridu 20 mmol/l. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem 4 μ l/min, $T=200$ °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM $m/z = 147$.

Dále bylo potřeba nalézt optimální koncentraci vankomycin chloridu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo právě při použití metody CFT. Byly proměřeny roztoky separačního pufru s koncentrací vankomycin chloridu 5 - 35 mmol/l. Každá koncentrace byla proměřena třikrát a z průměrných hodnot rozlišení byl sestaven graf závislost rozlišení na koncentraci vankomycin chloridu, který ukazuje obrázek 37. V grafu je vidět vzrůstající tendence rozlišení až do koncentrace 25 mmol/l, ve které dosahuje rozlišení maximum ($R = 2,1$). S dalším růstem koncentrace chirálního selektoru v separačním pufru dochází ke zhoršení rozlišení.



Obr. 37 – Závislost rozlišení na koncentraci vankomycin chloridu v 50 mM acetátu amonném o pH 4,5. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem 4 μ l/min, $T=200$ °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM $m/z = 147$.

Nakonec byl zjišťován vliv koncentrace separačního pufru na chirální separaci D-, L-2-HG kyseliny. Byla studována koncentrace acetátu amonného v rozsahu 10 – 100 mmol/l. Výsledky jsou zaznamenány v obrázku 38. Nejlepší výsledky poskytoval 50 mM acetát amonný.

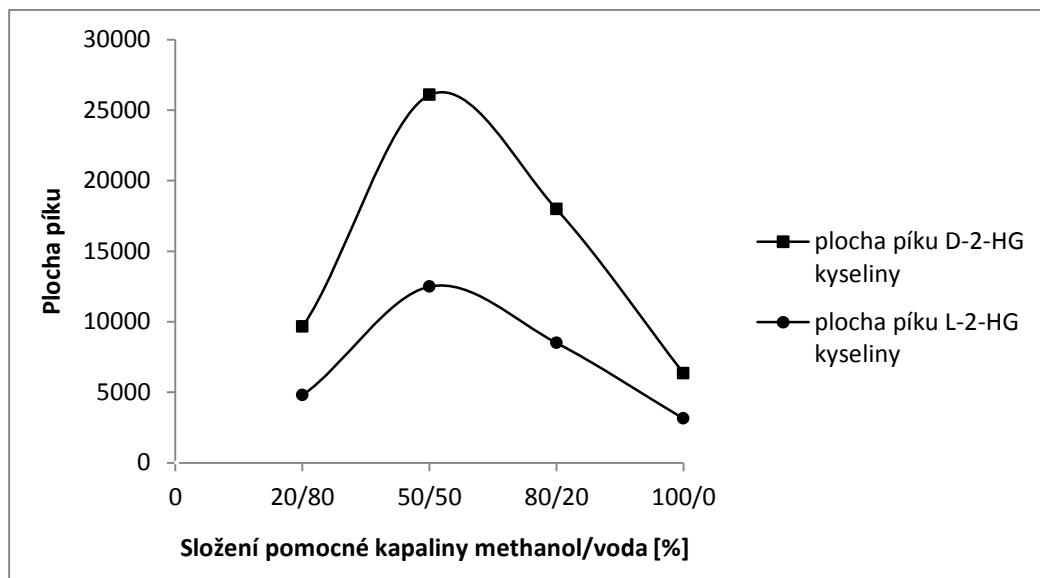


Obr. 38 – Závislost rozlišení na koncentraci acetátu amonného o pH = 4,5. Podmínky měření: X mM acetát amonný pH 4.5 + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem 4 μ l/min, T=200 °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM m/z = 147.

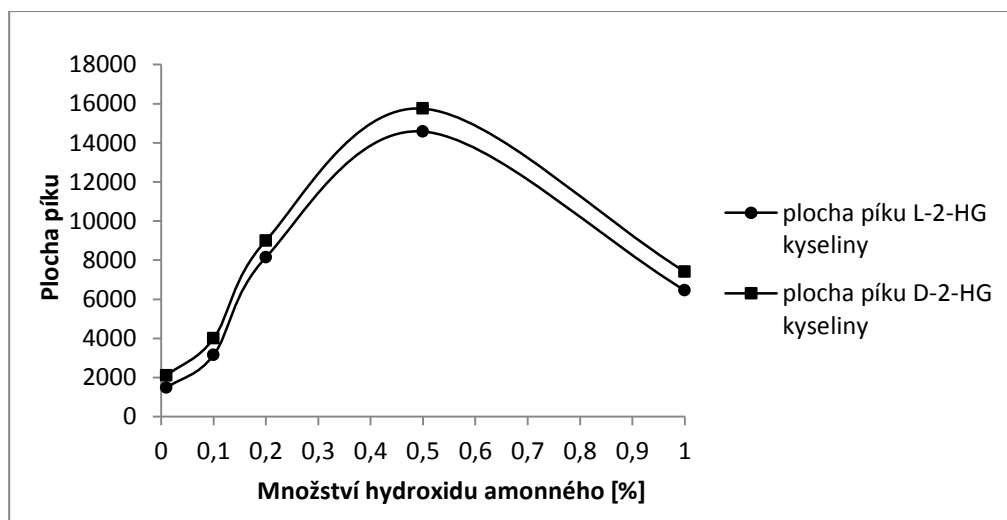
4.2 Optimalizace hmotnostní detekce

Po optimalizaci separace následuje optimalizace podmínek pro detekci hmotnostním spektrometrem, což v tomto případě znamenalo optimalizovat složení pomocné kapaliny a její průtok, teplotu a průtok sušícího plynu, tlak zmlžovacího plynu a sprejovací napětí. Všechna měření byla provedena třikrát a do grafů byly zaneseny průměrné hodnoty těchto tří měření pro každý enantiomer.

Složení pomocné kapaliny ovlivňuje citlivost a stabilitu elektrospreje. Pomocná kapalina se skládá z organické složky, kterou je methanol nebo propan-2-ol (methanol však poskytuje lepší výsledky), z deionizované vody a z přídavku hydroxidu amonného. Nejprve byl studován různý obsah methanolu v pomocné kapalině (25, 50 a 75 %). Nejlepší výsledky byly dosaženy pro 50 % methanolu, jak ukazuje obrázek 39; jiné složení pomocné kapaliny snižovalo signál pravděpodobně kvůli zhoršení desolvatačního procesu. Dále byla studována koncentrace hydroxidu amonného (0,1, 0,5 a 1,0 %, v/v) v pomocné kapalině. Nejlepší citlivost byla dosažena při 0,5 % hydroxidu amonného v roztoku 50/50 (v/v) methanolu a vody (obrázek 40).

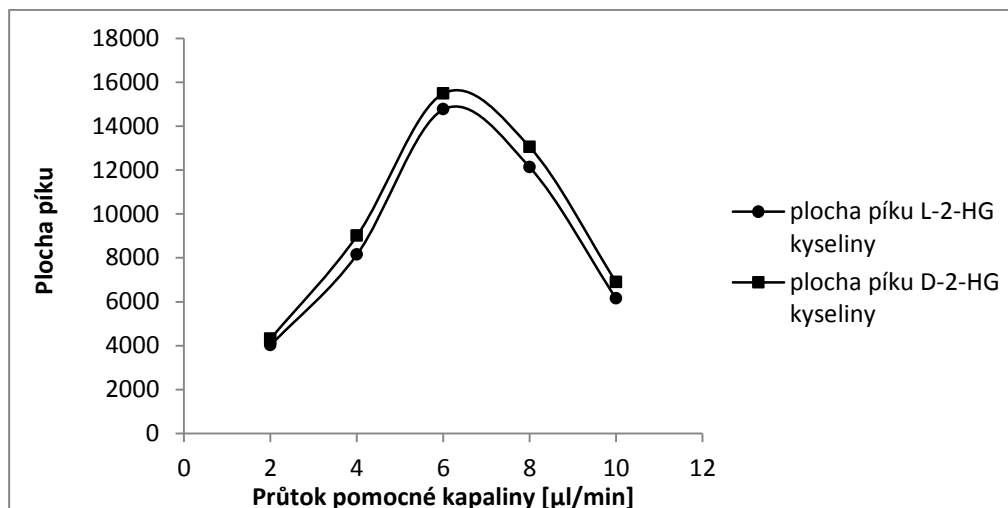


Obr. 39 – Závislost velikosti plochy píku na obsahu methanolu v pomocné kapalině. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina s průtokem 4 μ l/min, T=200 °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM m/z = 147.



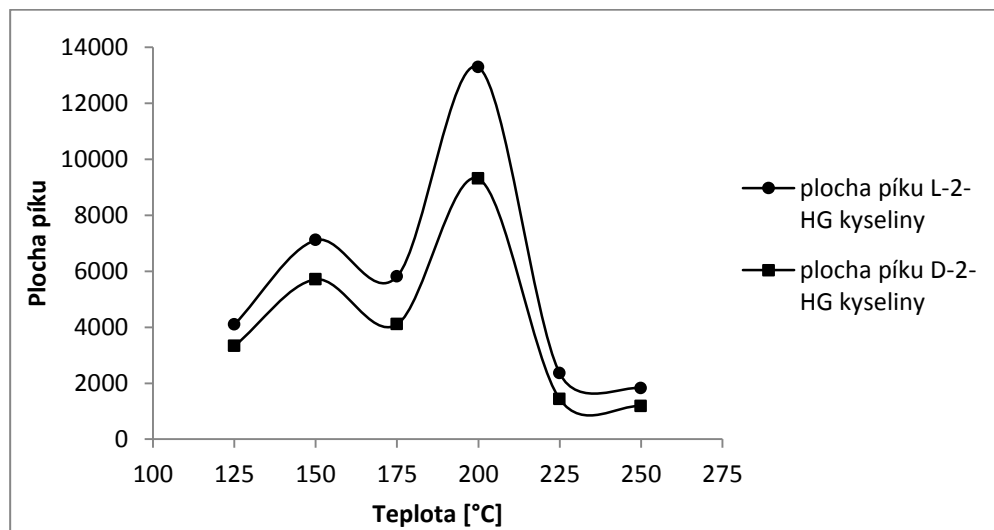
Obr. 40 – Závislost velikosti plochy píku na obsahu hydroxidu amonného v pomocné kapalině. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina s průtokem 4 μ l/min, T=200 °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM m/z = 147.

Průtok pomocné kapaliny byl testován v rozmezí 2 – 10 μ l/min. Jako nejlepší se ukázal průtok 6 μ l/min. Nižší průtok snižoval citlivost detekce pro oba enantiomery a zhoršoval stabilitu elektrospreje, vyšší průtoky také snižovaly citlivost detekce pravděpodobně kvůli přílišnému zředění zóny vzorku.

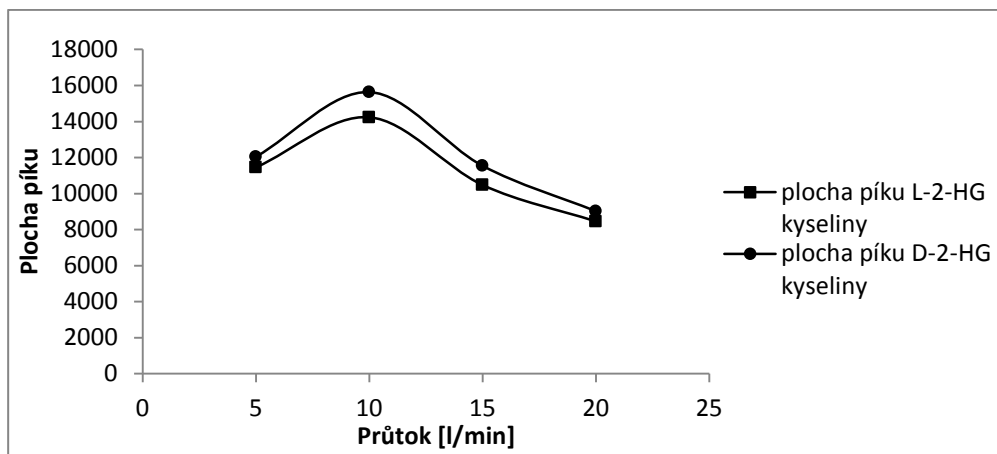


Obr. 41 - Závislost velikosti plochy píku na průtoku pomocné kapaliny. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem X μ l/min, $T=200$ °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM $m/z = 147$.

Teplota sušícího plynu, kterým byl dusík, byla optimalizována v rozmezí teplot 125 – 250 °C. Jeho průtok byl zkoumán v rozmezí 5 – 20 l/min. Největší plochy píků obou enantiomerů byly získány při teplotě sušícího plynu 200 °C a průtoku 10 l/min.



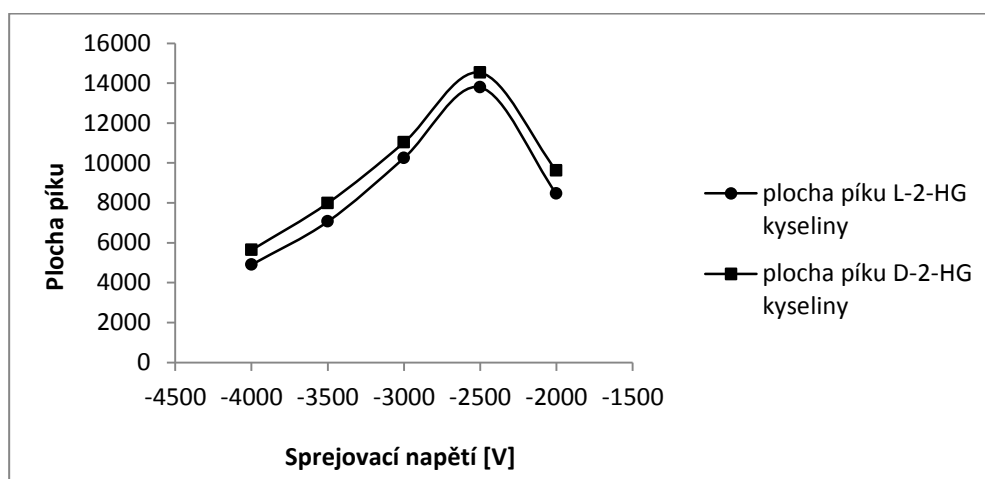
Obr. 42 – Závislost plochy píku na teplotě sušícího plynu. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 20 mM vankomycin, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem 4 μ l/min, $T=X$ °C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM $m/z = 147$.



Obr. 43 – Závislost plochy píku na průtoku sušícího plynu. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem 4 μ l/min, T=200 $^{\circ}$ C, 10 psi, X l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM m/z = 147.

Dalším parametrem důležitým pro optimalizaci je tlak zmlžovacího plynu, který byl proměřen v rozmezí od 5 do 20 psi. Migrační čas a rozlišení obou enantiomerů klesalo s rostoucím tlakem zmlžovacího plynu. Snížení tlaku zmlžovacího plynu však vedlo ke snížení citlivosti detekce. Proto byl zvolen kompromis 10 psi.

Posledním parametrem optimalizace byla velikost negativního sprejovacího napětí. Testována byla citlivost detekce a stabilita elektrospreje při hodnotách napětí -2,0 až -4,0 kV. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při sprejovacím napětí -2,5 kV.

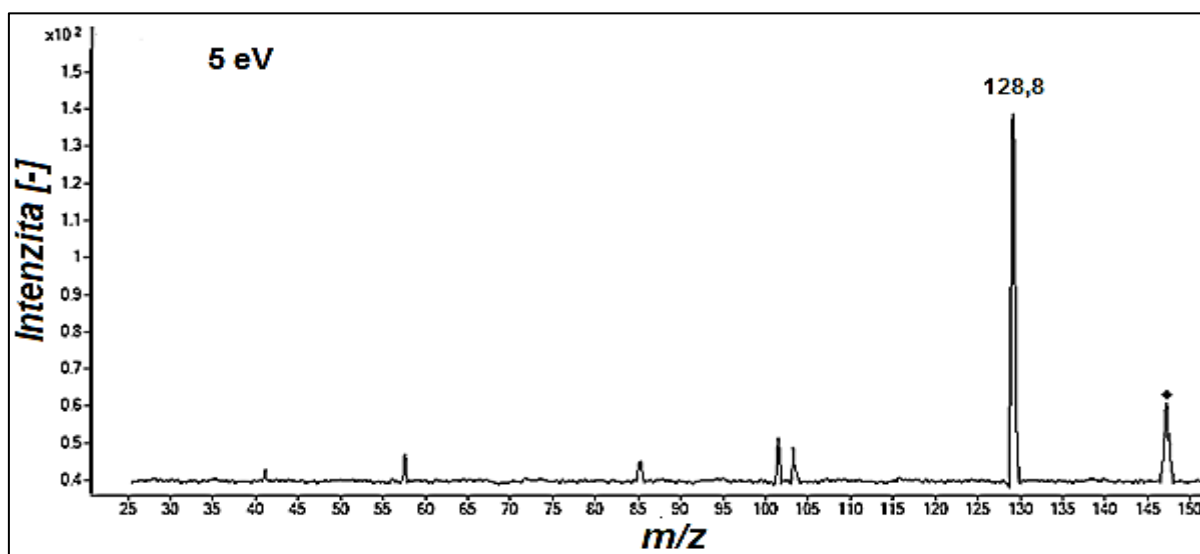


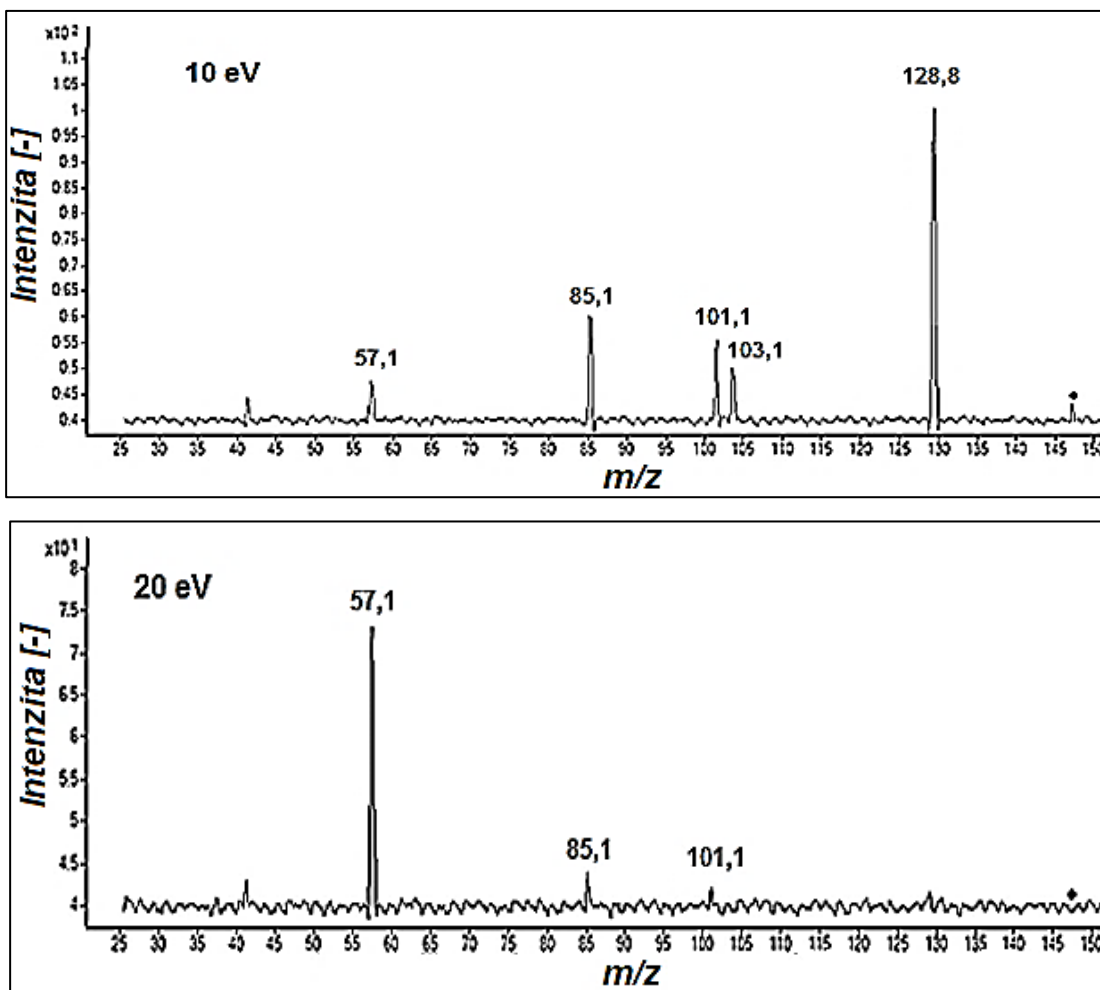
Obr. 44 – Závislost velikosti plochy píku na zvolené hodnotě sprejovacího napětí. Podmínky měření: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 20 mM vankomycin chlorid, separační napětí -20 kV, sprejovací napětí -X V, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2) s průtokem 4 μ l/min, T=200 $^{\circ}$ C, 10 psi, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar/10s, SIM m/z = 147.

4.3 Optimalizace spojení CE-MS/MS

Protože stanovení enantiomerů kyseliny 2-HG po chirální separaci bylo prováděno pomocí trojitého kvadrupólu, mohly být kromě klasického TIC a SIM módu použity také další módy využívající kolizí indukovanou disociaci vybraného iontu z prvního kvadrupólu. Ve třetím kvadrupólu jsou detekovány buď všechny fragmenty, nebo jen zvolený fragment. Je důležité optimalizovat kolizní energii, a to v rozmezí 2 – 20 eV. Optimální kolizní energie byla 10 eV, protože poskytovala největší signál a pestrost fragmentovaných iontů, jak ukazuje obrázek 45.

Převládající fragment byl vytvořen odštěpením vody z disociované molekuly kyseliny ($m/z = [M-H-H_2O]^- = [148,1-1-18]^- = 129,1$). Tento fragment byl použit pro identifikaci a kvantifikaci D, L-2-HG kyseliny. Dalším hojně zastoupeným fragmentem je dekarboxylovaný fragment ($m/z = [M-H-COO]^- = [148,1-1-44]^- = 103,1$), fragment po odštěpení kyseliny mravenčí ($m/z = [M-H-HCOOH]^- = [148,1-1-46]^- = 101,1$) a další fragmenty: $m/z = [M-H_2O-COO]^- = 85,1$; $m/z = 57 = [CH_3CH_2O]^-$.





Obr. 45 – Fragmentační spektra L-2-HG kyseliny (0,05 mg/ml ve vodě) získaná použitím kolizní energie o 5 eV, 10 eV a 20 eV. Podmínky měření: TIC – m/z = 50-200, sprejovací napětí -2,5 kV, pomocná kapalina methanol:voda: hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 μ L/min, T=200 °C, 10 l/min, dávkování tlakem 100 mbar.

4.4 Výsledky separace a stanovení jednotlivých kyselin

Abychom mohli stanovit obsah enantiomerů jednotlivých kyselin, použili jsme metodu kalibrační křivky. Pro každý enantiomer byla provedena kalibrace, na základě které byly sestaveny kalibrační křivky. K vyhodnocení byl použit statistický program STATISTICA. Limit detekce (LOD) byl vypočítán podle vztahu (25), limit kvantifikace (LOQ) podle vztahu (26), kde k je směrnice kalibrační přímky, σ je signál šumu.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \sigma}{k} \quad (25)$$

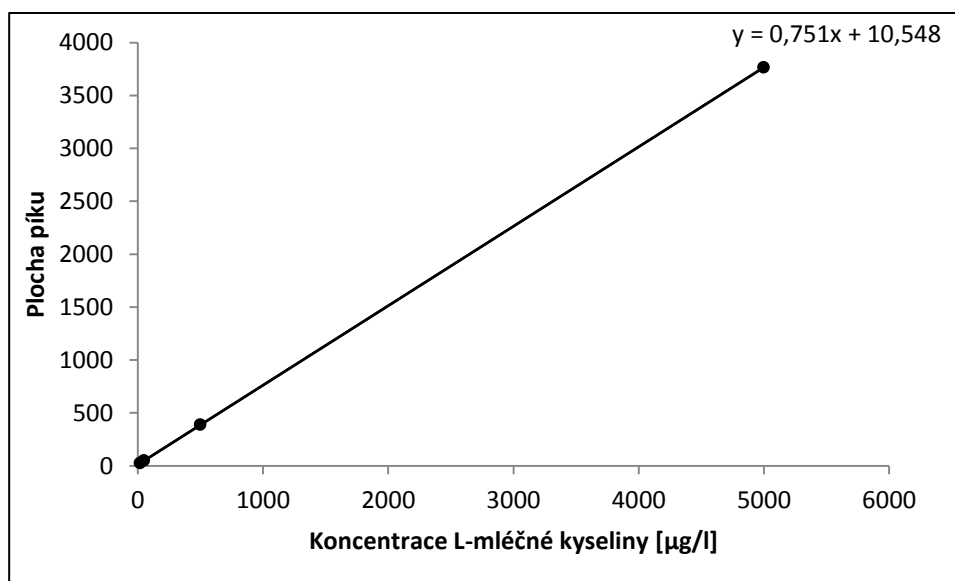
$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{k} \quad (26)$$

4.4.1 D- a L-mléčná kyselina

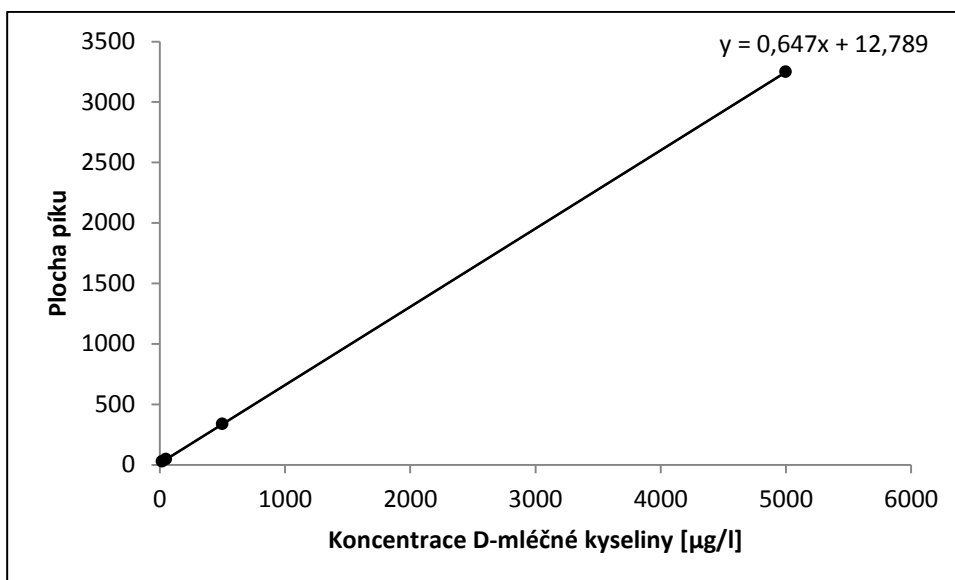
Kalibrační křivky, které jsou na obrázcích 46 a 47, byly sestaveny jako závislost koncentrace standardu enantiomeru na ploše píku enantiomeru. Tyto data jsou zaznamenána v tabulce I. Rovnice kalibračních křivek, lineární dynamické rozsahy a limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce II. Elektroforegram standardu kyseliny mléčné je na obrázku 48.

Tabulka I. – Koncentrace a odezva enantiomerů kyseliny mléčné (průměr 3 měření).

Koncentrace standardů [μg/l]	Plocha píku L-mléčné kyseliny	Plocha píku D-mléčné kyseliny
20	25,57	25,73
50	48,09	45,14
500	386,05	336,29
5000	3765,55	3247,79



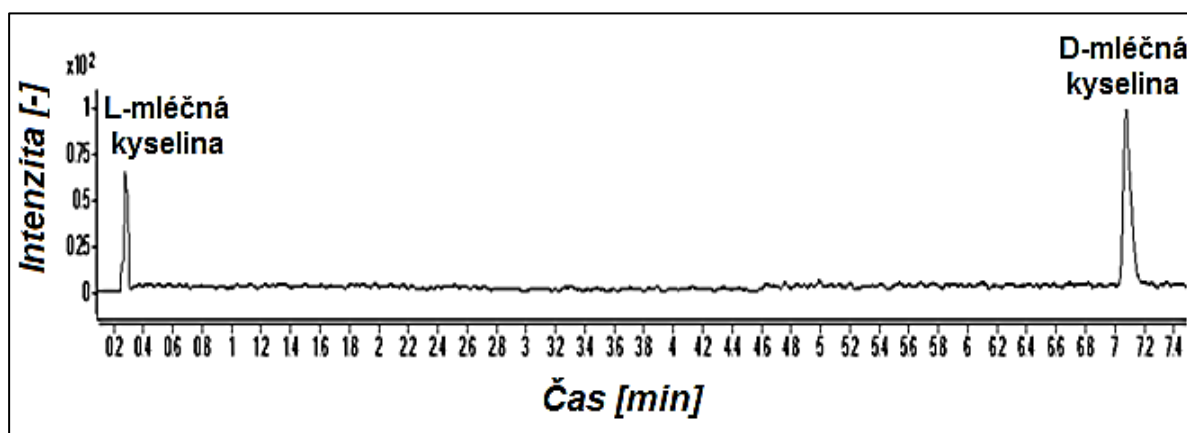
Obr. 46 – Kalibrační závislost pro L-mléčnou kyselinu. Podmínky měření: pufr: 50 mM acétát amonný pH 4,5 + 25 mM vankomycin chlorid, pokrytá kapilára 50 μm i.d., L = 60 cm, U = -25 kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U (ESI) = -2,5 kV, průtok N₂ 10 l/min, tlak 10 psi, T = 200 °C, SIM m/z = 89 [M-H]⁻, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 μL/min.



Obr. 47 – Kalibrační závislost pro D-mléčnou kyselinu. Podmínky měření: viz obrázek 46.

Tabulka II. – Kalibrační data D-, L-mléčné kyseliny.

	Rovnice kalibrační přímky	R^2	Lineární dynamický rozsah [$\mu\text{g/l}$]	Limit detekce [$\mu\text{g/l}$]	Limit kvantifikace [$\mu\text{g/l}$]
L-mléčná kyselina	$y = 0,751x + 10,548$	0,9986	20-5000	6,9	23,0
D-mléčná kyselina	$y = 0,647x + 12,789$	0,9985	20-5000	7,1	23,7



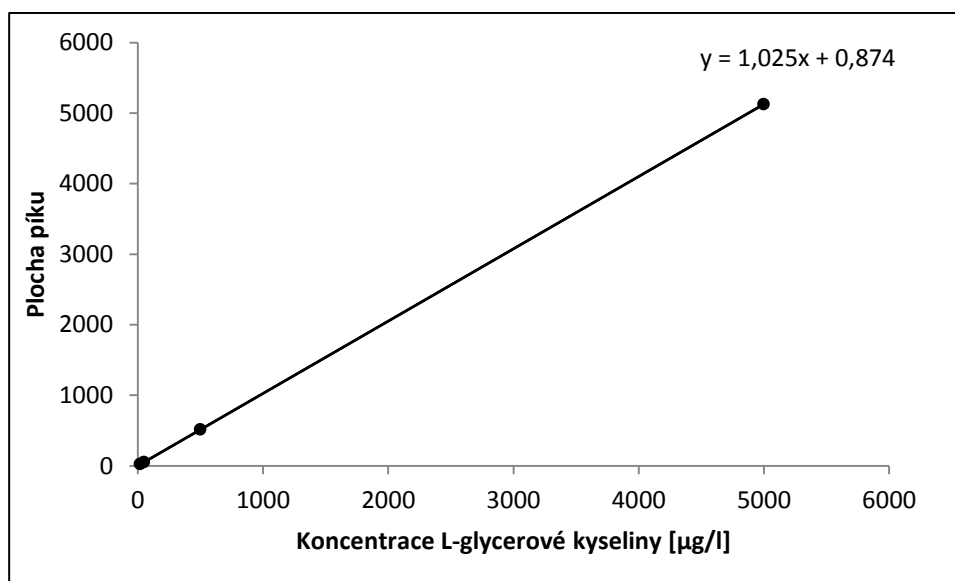
Obr. 48 – Elektroforegram standardu mléčné kyseliny (10 mg/l). Podmínky separace: viz obrázek 46.

4.4.2 D- a L-glycerová kyselina

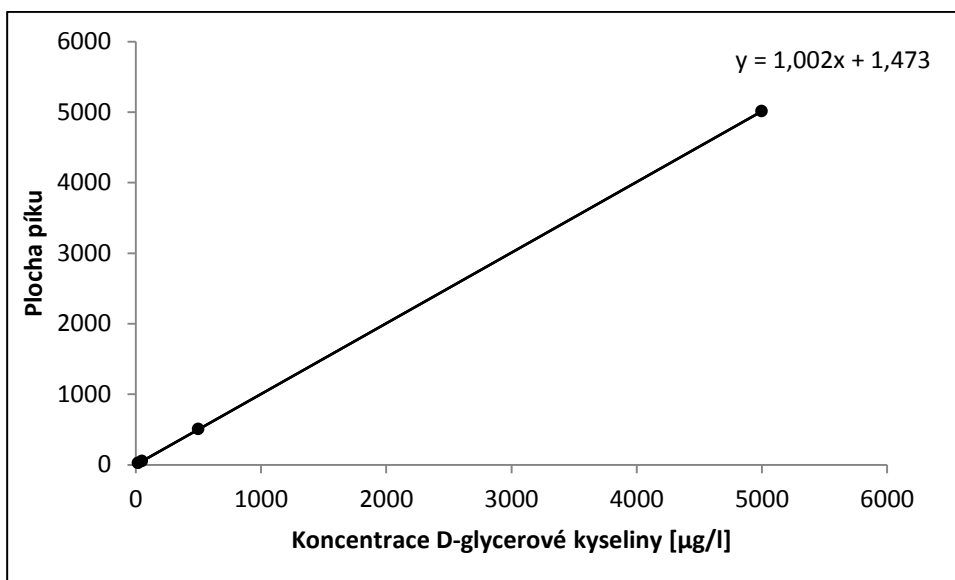
Kalibrační křivky, které jsou na obrázcích 49 a 50, byly sestaveny jako závislost koncentrace standardu enantiomeru na ploše píku enantiomeru. Tyto data jsou zaznamenána v tabulce III. Rovnice kalibračních křivek, lineární dynamické rozsahy a limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce IV. Elektroforegram standardu kyseliny glycerové je na obrázku 51.

Tabulka III. – Koncentrace a odezva enantiomerů kyseliny glycerové (průměr 3 měření).

Koncentrace standardů [μg/l]	Plocha píku L-glycerové kyseliny	Plocha píku D-glycerové kyseliny
20	21,37	21,51
50	52,12	51,57
500	513,37	502,47
5000	5125,87	5011,47



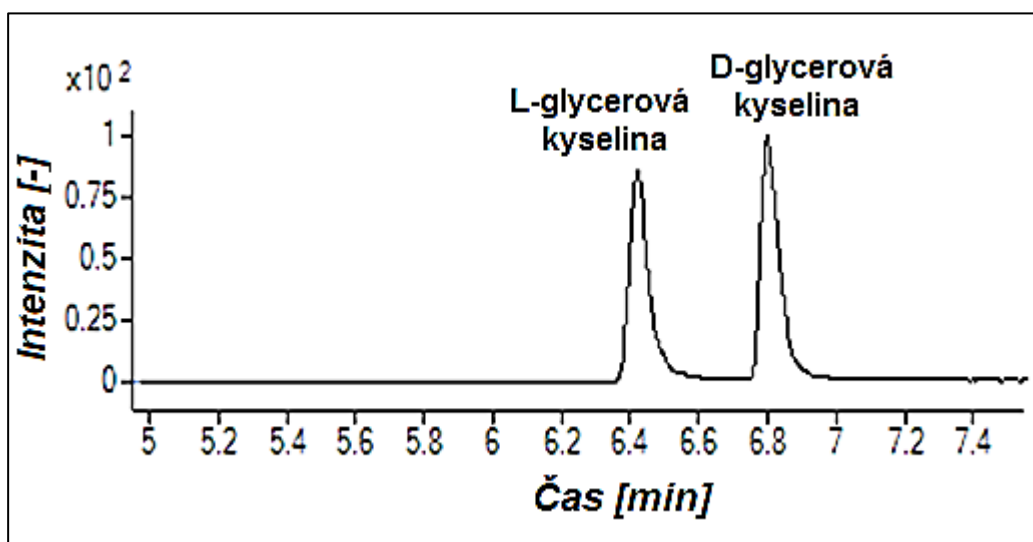
Obr. 49 – Kalibrační závislost pro L-glycerovou kyselinu. Podmínky měření: pufr: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 25 mM vankomycin chlorid, pokrytá kapilára 50 μm i.d., L = 60 cm, U = -25 kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U (ESI) = -2,5 kV, průtok N₂ 10 l/min, tlak 10 psi, T = 200 °C, SIM m/z = 105 [M-H]⁺, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 μL/min.



Obr. 50 – Kalibrační závislost pro D-glycerovou kyselinu. Podmínky měření: viz obrázek 49.

Tabulka IV. – Kalibrační data D-, L-glycerové kyseliny.

	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Lineární dynamický rozsah [μg/l]	Limit detekce [μg/l]	Limit kvantifikace [μg/l]
L-glycerová kyselina	$y = 1,025x + 0,874$	0,9998	20-5000	6,6	22,0
D-glycerová kyselina	$y = 1,002x + 1,473$	0,9998	20-5000	8,4	28,0



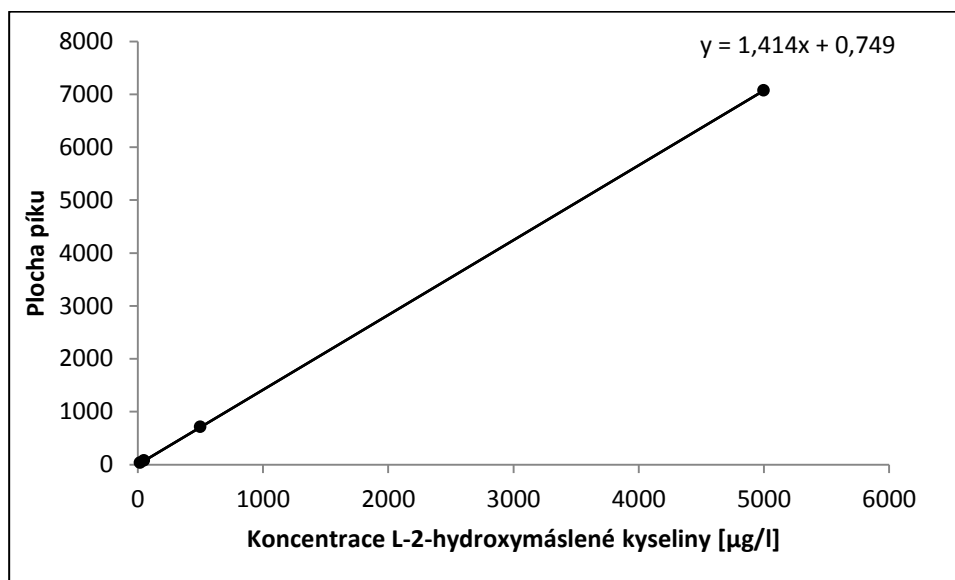
Obr. 51 – Elektroforegram standardu glycerové kyseliny (10 mg/l). Podmínky měření: viz obrázek 49.

4.4.3 D- a L-2-hydroxymáselná kyselina

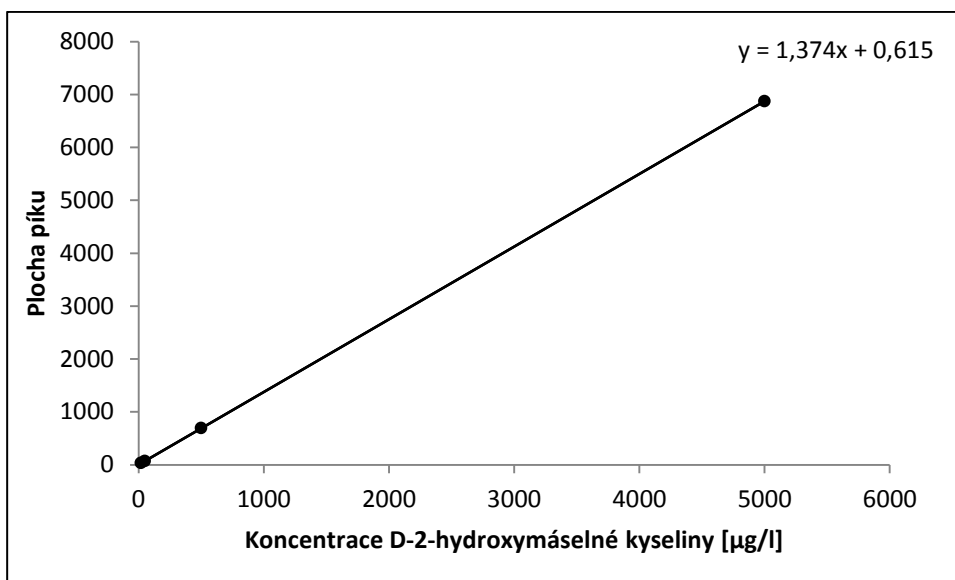
Kalibrační křivky, které jsou na obrázcích 52 a 53, byly sestaveny jako závislost koncentrace standardu enantiomeru na ploše píku enantiomeru. Tyto data jsou zaznamenána v tabulce V. Rovnice kalibračních křivek, lineární dynamické rozsahy a limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce VI. Elektroforegram standardu kyseliny 2-hydroxymáselné je na obrázku 54.

Tabulka V. – Koncentrace a odezva enantiomerů kyseliny 2-hydroxymáselné (průměr 3 měření každého vzorku).

Koncentrace standardů [µg/l]	Plocha píku L-2-hydroxymáselné kyseliny	Plocha píku D-2-hydroxymáselné kyseliny
20	29,03	28,10
50	71,45	69,32
500	707,75	687,62
5000	7070,75	6870,62



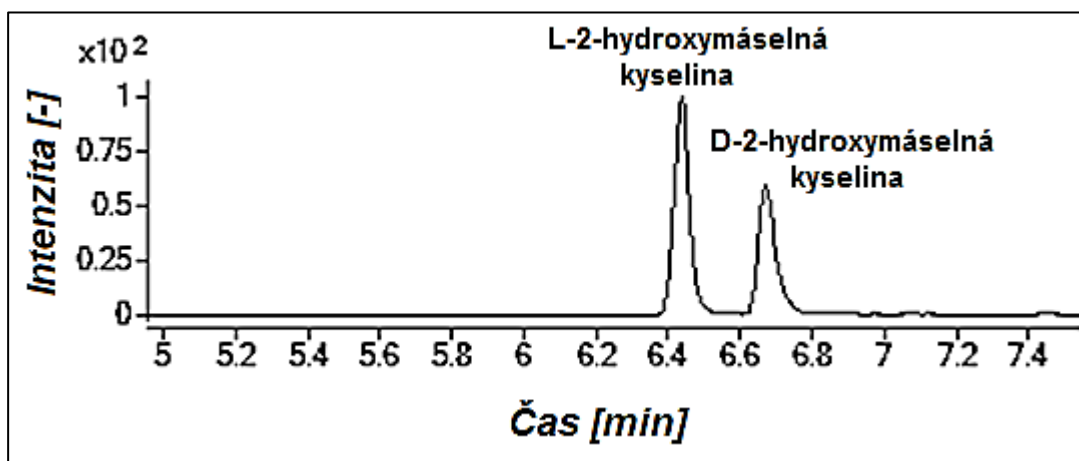
Obr. 52 – Kalibrační závislost pro L-2-hydroxymáselnou kyselinu. Podmínky měření: pufr: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 25 mM vankomycin chlorid, pokrytá kapilára 50 µm i.d., L = 60 cm, U = -25 kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U (ESI) = -2,5 kV, průtok N₂ 10 l/min, tlak 10 psi, T = 200 °C, SIM m/z = 103 [M-H], pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 µL/min.



Obr. 53 – Kalibrační závislost pro D-2-hydroxymáselnou kyselinu. Podmínky měření: viz obrázek 52.

Tabulka VI. – Kalibrační data D-, L-2-hydroxymáselné kyseliny.

	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Lineární dynamický rozsah [µg/l]	Limit detekce [µg/l]	Limit kvantifikace [µg/l]
L-2-hydroxymáselná kyselina	$y = 1,414x + 0,749$	0,9998	20-5000	4,1	13,7
D-2-hydroxymáselná kyselina	$y = 1,374x + 0,615$	0,9996	20-5000	4,6	15,3



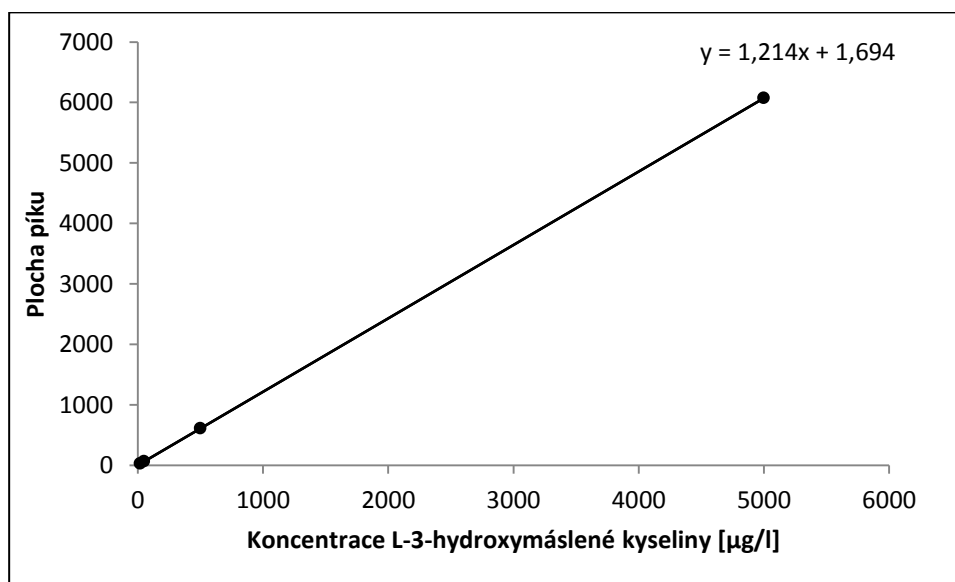
Obr. 54 – Elektroforegram standardu 2-hydroxymáselné kyseliny (10 mg/l). Podmínky měření: viz obrázek 52.

4.4.4 D- a L-3-hydroxymáselná kyselina

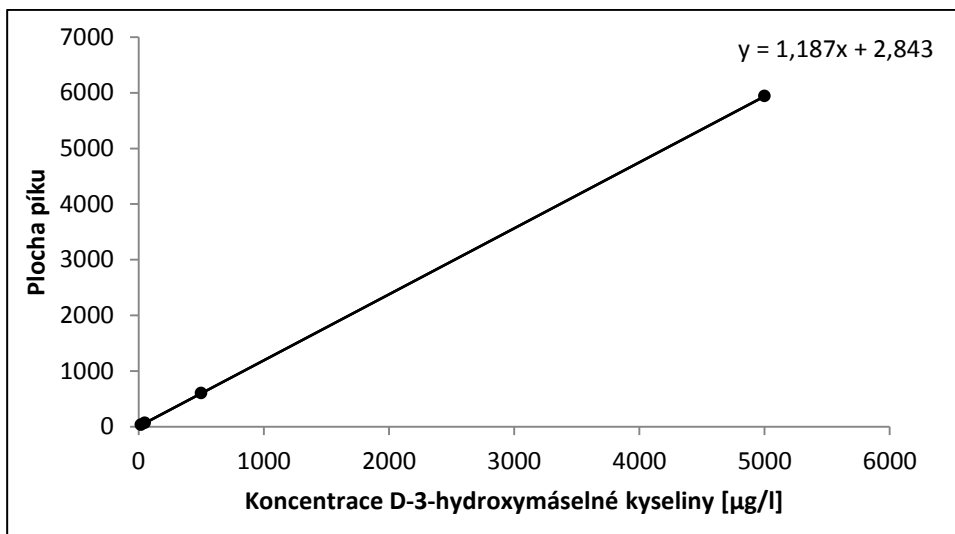
Kalibrační křivky, které jsou na obrázcích 55 a 56, byly sestaveny jako závislost koncentrace standardu enantiomeru na ploše píku enantiomeru. Tyto data jsou zaznamenána v tabulce VII. Rovnice kalibračních křivek, lineární dynamické rozsahy a limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce VIII. Elektroforegram standardu kyseliny 3-hydroxymáselné je na obrázku 57.

Tabulka VII. – Koncentrace a odezva enantiomerů kyseliny 3-hydroxymáselné (průměr 3 měření každého vzorku).

Koncentrace standardů [µg/l]	Plocha píku L-3-hydroxymáselné kyseliny	Plocha píku D-3-hydroxymáselné kyseliny
20	25,97	26,58
50	62,39	62,19
500	608,69	596,34
5000	6071,69	5937,84



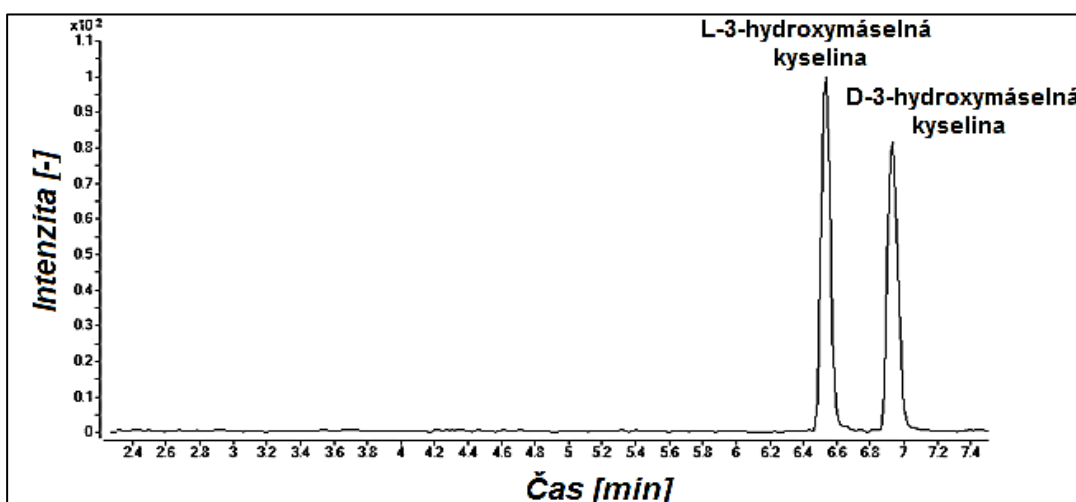
Obr. 55 – Kalibrační závislost pro L-3-hydroxymáselnou kyselinu. Podmínky měření: pufr: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 25 mM vankomycin chlorid, pokrytá kapilára 50 µm i.d., L = 60 cm, U = -25 kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U (ESI) = -2,5 kV, průtok N₂ 10 l/min, tlak 10 psi, T = 200 °C, SIM m/z = 103 [M-H], pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 µL/min.



Obr. 56 – Kalibrační závislost pro D-3-hydroxymásebnou kyselinu. Podmínky měření: viz obrázek 55.

Tabulka VIII. – Kalibrační data D-, L-3-hydroxymásebné kyseliny.

	Rovnice kalibrační přímky	R^2	Lineární dynamický rozsah [µg/l]	Limit detekce [µg/l]	Limit kvantifikace [µg/l]
L-3-hydroxymásebná kyselina	$y = 1,214x + 1,694$	0,9999	20-5000	4,0	13,3
D-3-hydroxymásebná kyselina	$y = 1,187x + 2,843$	0,9998	20-5000	4,3	14,3



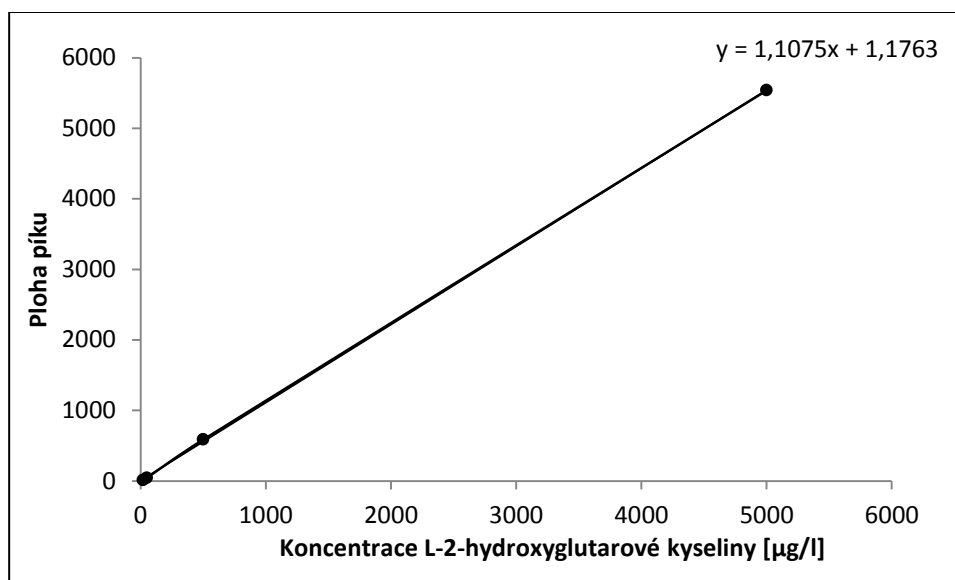
Obr. 57 – Elektroforegram standardu 3-hydroxymásebné kyseliny (10 mg/l). Podmínky měření: viz obrázek 55.

4.4.5 D- a L-2-hydroxyglutarová kyselina

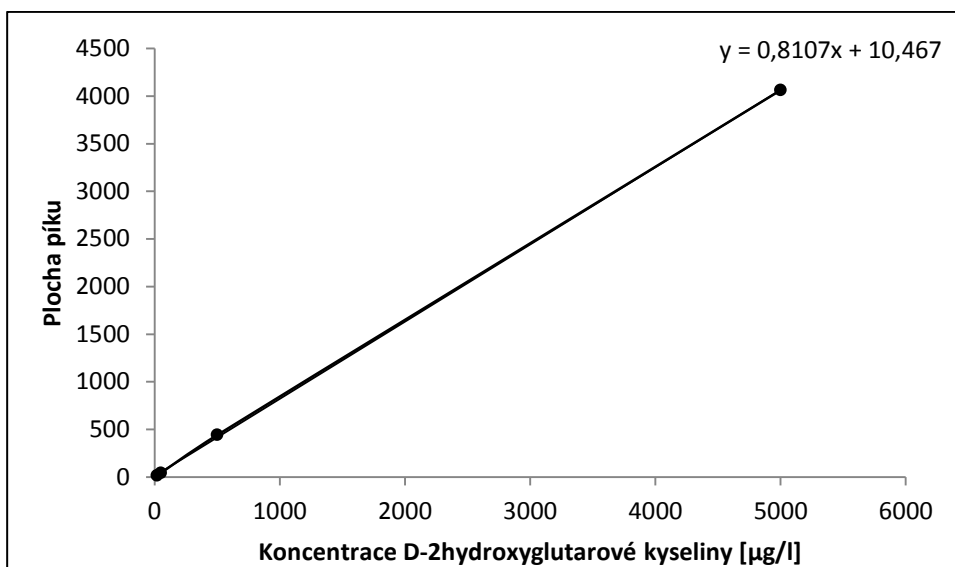
Kalibrační křivky, které jsou na obrázcích 58 a 59, byly sestaveny jako závislost koncentrace standardu enantiomeru na ploše píku enantiomeru. Tyto data jsou zaznamenána v tabulce IX. Rovnice kalibračních křivek, lineární dynamické rozsahy a limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce X. Elektroforegram standardu kyseliny 2-hydroxyglutarové je na obrázku 60.

Tabulka IX. – Koncentrace a odezva 2-hydroxyglutarové kyseliny (průměr 3 měření každého vzorku).

Koncentrace standardů [μg/l]	Plocha píku L-2-hydroxyglutarové kyseliny	Plocha píku D-2-hydroxyglutarové kyseliny
20	11,10	15,2
50	41,38	40,48
500	585,14	440,12
5000	5535,81	4061,88



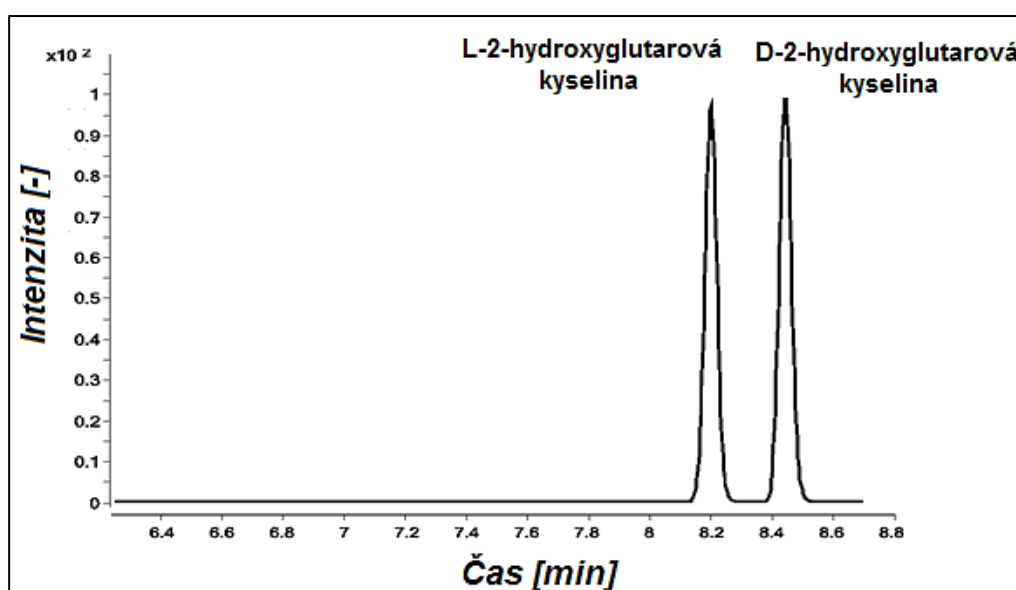
Obr. 58 – Kalibrační závislost pro L-2-hydroxyglutarovou kyselinu. Podmínky měření: pufr: 50 mM acetát amonný pH 4,5 + 25 mM vankomycin chlorid, pokrytá kapilára 50 μm i.d., L = 60 cm, U = -25 kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U (ESI) = -2,5 kV, průtok N₂ 10 l/min, tlak 10 psi, T = 200 °C, SIM m/z = 147 [M-H]⁻, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 μL/min.



Obr. 59 – Kalibrační závislost pro D-2-hydroxyglutarovou kyselinu. Podmínky měření: viz obrázek 58.

Tabulka X. – Kalibrační data D-, L-2-hydroxyglutarové kyseliny.

	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Lineární dynamický rozsah [µg/l]	Limit detekce [µg/l]	Limit kvantifikace [µg/l]
L-2-hydroxyglutarová kyselina	$y = 1,1075x + 1,1763$	0,9999	20-5000	5,5	18,3
D-2-hydroxyglutarová kyselina	$y = 0,8107x + 10,467$	0,9999	20-5000	6,0	19,8



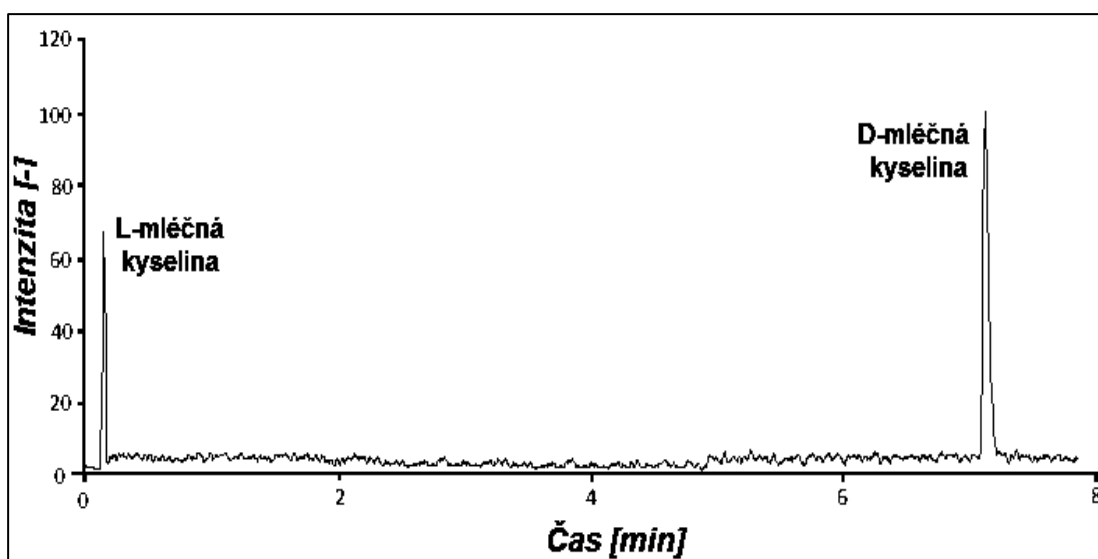
Obr. 60 – Elektroforegram racemického standardu 2-hydroxyglutarové kyseliny (10 mg/l). Podmínky měření: viz obrázek 58.

4.5 Analýza reálných vzorků

Obdržené vzorky moči pacientů, u kterých bylo podezření na zvýšenou koncentraci některé z pěti zkoumaných hydroxykyselin v moči, jsme upravili podle postupu v kapitole 3.6. Protože jsme neměli k dispozici reálné vzorky moči od pacientů trpících všemi výše popsány mi nemocemi, museli jsme některé vzorky zdravých lidí spikovat, tedy uměle přidat enantiomery dané látky do moči zdravého pacienta. Poté jsme mohli ověřit, zda je zvolená metoda opravdu vhodná pro separaci enantiomerů v moči a jejich detekci. Pořadí separovaných enantiomerů jsme určili spikováním.

D- a L-mléčná kyselina

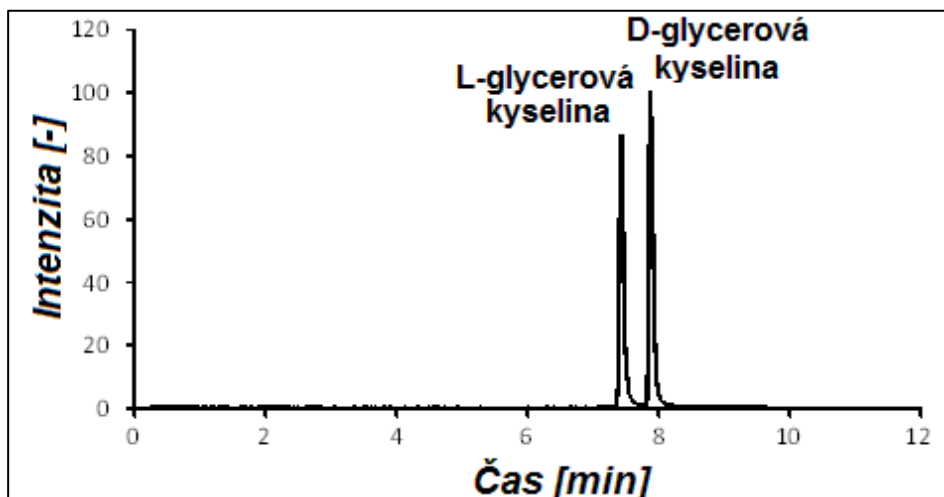
Elektroforegram, který je na obrázku 61, ukazuje dostačující separaci enantiomerů kyseliny mléčné o koncentraci 0,1 mg/l ve spikovaném vzorku moči. Metoda je tedy vhodná pro separaci, identifikaci i stanovení enantiomerů L- a D-mléčné kyseliny v moči.



Obr. 61 – Elektroforegram chirální separace kyseliny mléčné o koncentraci 0,1 mg/l v moči. SIM $m/z = 89 [M-H]^-$; podmínky měření: pufr: 50 mM acetát amonný + 25 mM vankomycin chlorid pH 4,5, pokrytá kapilára 50 μm i.d., $L = 60$ cm, $U = -25$ kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U (ESI) = -2,5 kV, průtok N_2 10 l/min, tlak 10 psi, $T = 200$ °C, pomocná kapalina methanol:voda:hydroxid amonný (50:48:2, v:v:v), průtok 6 $\mu\text{L}/\text{min}$.

D- a L-glycerová kyselina

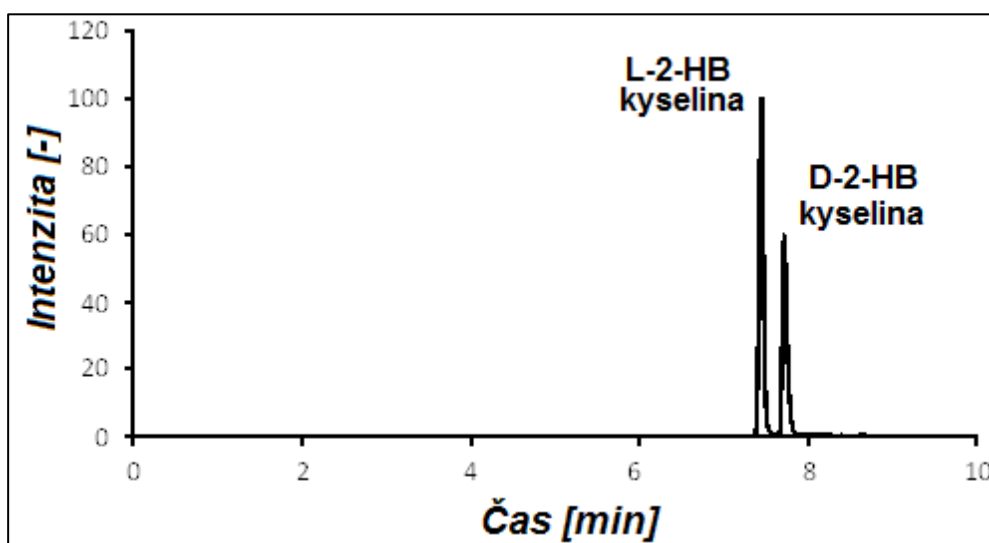
Elektroforegram, který je na obrázku 62, ukazuje dostačující separaci enantiomerů kyseliny glycerové o koncentraci 0,1 mg/l ve spikovaném vzorku moči. Metoda je tedy vhodná pro separaci, identifikaci i stanovení enantiomerů L- a D-glycerové kyseliny v moči.



Obr. 62 – Elektroforegram chirální separace kyseliny glycerové o koncentraci 0,1 mg/l v moči. SIM $m/z = 105 [M-H]$; podmínky měření viz obr. 61.

D- a L-2-hydroxymáselná kyselina

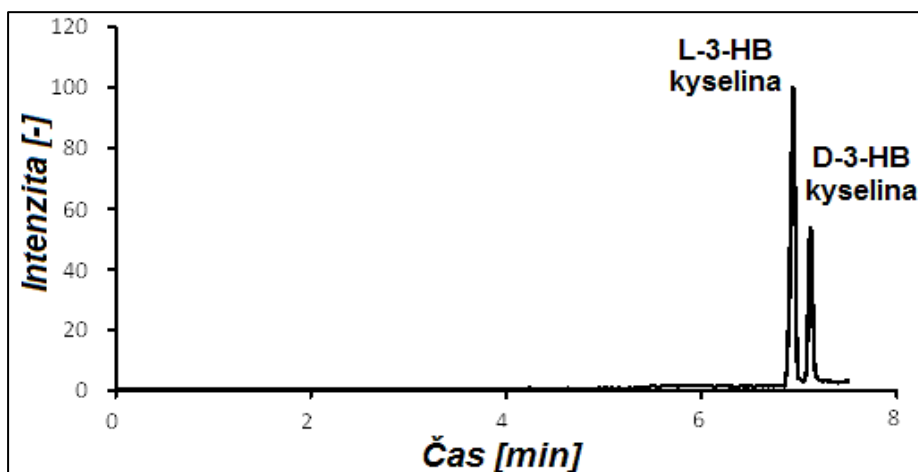
Elektroforegram, který je na obrázku 63, ukazuje dostatečnou separaci enantiomerů kyseliny 2-hydroxymáselné o koncentraci 0,1 mg/l ve spikovaném vzorku moči. Metoda je tedy vhodná pro separaci, identifikaci i stanovení enantiomerů L- a D-2-hydroxymáselné kyseliny v moči.



Obr. 63 – Elektroforegram chirální separace kyseliny 2-hydroxymáselné o koncentraci 0,1 mg/l v moči. SIM $m/z = 103 [M-H]$; podmínky měření viz obr. 61.

D- a L-3-hydroxymáselná kyselina

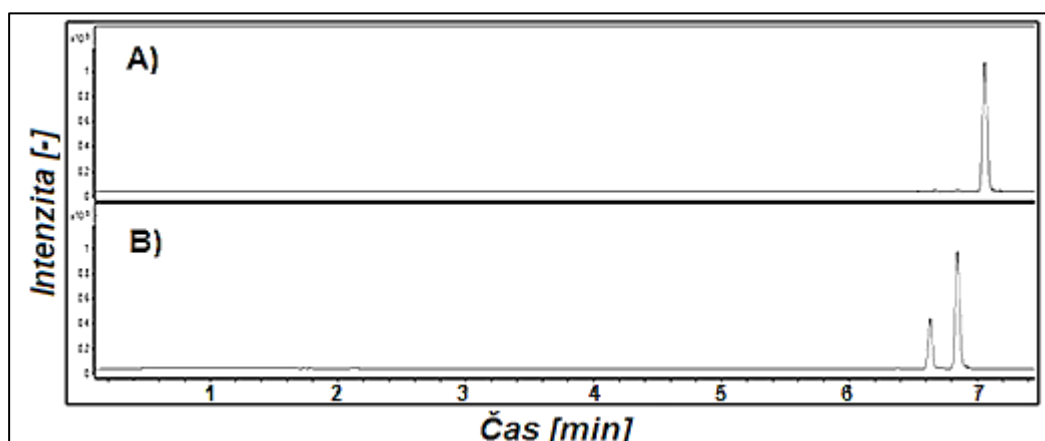
Elektroforegram, který je na obrázku 64, ukazuje dostatečnou separaci enantiomerů kyseliny 3-hydroxymáselné o koncentraci 0,1 mg/l ve spikovaném vzorku moči. Metoda je tedy vhodná pro separaci, identifikaci i stanovení enantiomerů L- a D-3-hydroxymáselné kyseliny v moči.



Obr. 64 – Elektroforegram chirální separace kyseliny 3-hydroxymáselné o koncentraci 0,1 mg/l v moči. SIM $m/z = 103 [M-H]^-$; podmínky měření viz obr. 61.

D- a L-2-hydroxyglutarová kyselina

Abnormální koncentrace enantiomeru 2-hydroxyglutarové kyseliny ve vzorku moči pacienta byla zjištěna pomocí dvou analýz: analýza naředěného vzorku moči (A), analýza stejného vzorku moči po spikování kyselinou L-2-HG (B). Pokud by pacient trpěl L-2-HGA, pík z první analýzy by se zvětšil. V druhé analýze však přibyl nový pík přidání L-2-HG kyseliny, proto bylo zjištěno, že pacient trpí D-2-HGA.



Obr. 65 – Elektroforegram vzorku moči pacienta 1 (A), elektroforegram vzorku moči pacienta 1 spikovaného standardem L-2-HG kyseliny o koncentraci 50 mg/l (B). SIM $m/z = 147 [M-H]^-$; podmínky měření viz obr. 61.

5. ZÁVĚR

Spojení CE-MS je velmi vhodné pro chirální separace jednak díky rychlosti stanovení, jednak díky malé spotřebě chirálního selektoru. Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu pro separaci a stanovení enantiomerů pěti hydroxykarboxylových kyselin – mléčné, glycerové, 2-hydroxymáselné, 3-hydroxymáselné a 2-hydroxyglutarové. Byly studovány experimentální podmínky (především pH separačního pufru, složení a koncentrace separačního pufru, koncentrace chirálního selektoru, teplota separace i sprejovací kapiláry, sprejovací napětí, kolizní energie) a na základě výsledků byly vybrány ty nejvhodnější podmínky pro separaci i detekci. Vyvinutá metoda chirální separace s chirálním selektorem vankomycin chloridem v kovalentně pokryté kapiláře pomocí CE-MS metodou CFT byla použita při analýze standardů kyselin i při analýze reálných a spikovaných vzorků moči. V reálných a spikovaných vzorcích moči se podařilo separovat a identifikovat jednotlivé enantiomery.

Vyvinutá metoda má tyto podmínky separace: pufr: 50 mM acetát amonný + 25 mM vankomycin chlorid pH 4,5, pokrytá kapilára dlouhá 60 cm s vnitřním průměrem 50 μm , separační napětí -25 kV, dávkování vzorku 100 mbar/150s. MS podmínky: U(ESI) = -2.5 kV, průtok N_2 byl 10 l/min, tlak 10 psi, T = 200 °C, pomocná kapalina $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:25\% \text{NH}_4\text{OH}$ (50:48:2, v:v:v), průtok 6 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Výsledky práce poukazují na přednosti této metody, kterými jsou jednoduchost díky absenci složité předúpravy vzorku, rychlost celé analýzy od přijetí vzorku až po obdržení výsledků a citlivost metody (viz LOD a LOQ jednotlivých enantiomerů), která je dostatečná pro stanovení všech enantiomerů pěti zkoumaných kyselin pro klinické účely.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-HB kyselina	2-hydroxybutanová (2-hydroxymáselná) kyselina
2-HG kyselina	2-hydroxyglutarová kyselina
2-HGA	2-hydroxyglutarová acidurie
2-KG	2-ketoglutarát
3-HB kyselina	3-hydroxymáselná (3-hydroxybutanová) kyselina
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CFT	Technika úplného plnění
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CID	Kolizí indukovaná disociace
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CITP	Kapilární izotachoforéza
CS	Chirální selektor
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
D-2-HG kyselina	D-2-hydroxyglutarová kyselina
D-2-HGA	D-2-hydroxyglutarová acidurie
D-3-HB kyseliny	D-3-hydroxybutanová kyselina
D-GA	D-glycerová acidurie
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Elektrosprej
GSH	Glutathion
HOT	Enzym hydroxy-oxokyselina transhydrogenáza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L-2-HG kyselina	L-2-hydroxyglutarová kyselina
L-2-HGA	L-2-hydroxyglutarová acidurie
L-3-HB kyseliny	L-3-hydroxybutanová kyselina
L-GA	L-glycerová acidurie
LL	Extrakce kapalina-kapalina
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie

MRM	Monitorování několika fragmentačních reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
NLS	Skenování neutrálních ztrát
PFT	Technika částečného plnění
Q	Kvadrupólový analyzátor
QqQ	Trojité kvadrupólový analyzátor
SBS	Syndrom krátkého střeva
SIM	Monitorování vybraného iontu
SPE	Extrakce tuhou fází
SRM	Monitorování vybrané fragmentační reakce
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TIC	Celkový iontový proud
UV-detekce	Detekce v ultrafialové oblasti
UV-VIS absorpce	Absorbce ve viditelné a ultrafialové oblasti
UV-VIS spektrometrie	Spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Štulík K.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.
- [2] Kranendijk M., Struys E. A., Salomons G. S., Van der Knaap M. S., Jakobs C., J. *Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 571–587.
- [3] http://en.wikiversity.org/wiki/File:Chirality_with_hands.jpg (staženo dne 31. 10. 2013).
- [4] Simó C., García-Cañas V., Cifuentes A., *Electrophoresis* 31 (2010) 1442-1456.
- [5] Shamsi S. A., *Electrophoresis* 23 (2002) 4036-4051.
- [6] Vespalec R., Boček P., *Chem. Rev.* 100 (2000) 3715-3753.
- [7] Weintberger R.: *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, New York 1993.
- [8] Settle F. A.: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall 1997.
- [9] Agilent Technologies: *High performance capillary electrophoresis: A Primer*, publikační číslo: 5990-3777EN.
- [10] Chaiyasut Ch., Takatsu Y., Kitagawa S., Tsuda T., *Electrophoresis* 22 (2001) 1251–1442.
- [11] http://alcheme.tamu.edu/?page_id=6823 (staženo dne 22. 10. 2013)
- [12] Agilent Technologies: *CE/MS Analysis: Optimization Guide*, publikační číslo: G7100-90001.
- [13] Dolník V.: *Úvod do kapilární elektroforézy*, ÚACh AV ČR, Brno 1994.
- [14] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [15] Khaledi M. G.: *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, New York 1998.
- [16] Agilent Technologies: *Capillary Electrophoresis: e-Seminar Upgrade from 1600 HP^{3D}CE to 7100 CE*, 2011.
- [17] Shibdas Banerjee S., Mazumdar S., *International Journal of Analytical Chemistry* 2012 (2012) 1-40.
- [18] Agilent Technologies: *Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System: Concepts Guide*, publikační číslo: G3335-90135.
- [19] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.: *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Learning, London 1998.

- [20] Petritis K., Dessans H., Elfakir C., Dreux M., LC-GC Europe 15 (2002) 98-100.
- [21] Shahab A. Shamsi S.A., Electrophoresis 23 (2002) 4036-4051.
- [22] Amini A., Paulsen-Srrman U., Westerlund D., Chromatographia 50 (1999) 497-506.
- [23] Chankvetadze B., Endresz G., Blaschke G.: Electrophoresis 15 (1994) 804-807.
- [24] Eeckhaut A. V., Michotte Y.: *Chiral Separations by Capillary Electrophoresis*, CRC Press Taylor & Francis Group, Danvers 2010.
- [25] Armstrong D. W., Nair U. B., Electrophoresis 18 (1997) 2331-2342.
- [26] Desiderio C., Fanali S., J. Chromatogr. A 807 (1998) 37-56.
- [27] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vancomycin.svg> (staženo dne 23. 10. 2013)
- [28] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Teicoplanin_core_and_major_components.svg (staženo dne 23. 10. 2013)
- [29] Newman M., Gordon G., Suen R. M.: *Urinary Organic Acid Analysis: A Powerful Clinical Tool, Potentially Muddled by Poor Testing Methods*, US BioTek Laboratories, Seattle 2004.
- [30] García A., Barbas C., Aguilar R., Castro M., Clinical Chemistry 44 (1998) 1905–1911.
- [31] Erny G.L., Cifuentes A., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40 (2006) 509–515.
- [32] Narayanan N., Roychoudhury P. K., Srivastava A., Journal of Biotechnology 7 (2004) 167-179.
- [33] <http://philosophicallydisturbed.wordpress.com/2011/01/24/> (staženo dne 27. 11. 2013)
- [34] Scheijen J., Hanssen N., van Waarenburg M., Jonkers D., Stehouwer C., Schalkwijk C., Experimental Diabetes Research 2012 (2012) 1155-1164.
- [35] Ludvigsen C., Thum J., Pierpont G., Eckfeldt J., Clin. Chem. 29 (1983) 1823-1825.
- [36] Martí R., Varela E., Segura R., Alegre J., Suriñach J., Pascual C., Clin. Chem. 43 (1997) 1010–1015.
- [37] Kalapos M. P., Toxicology Letters 110 (1999) 145–175.
- [38] Inoue Y., Maeta K., Nomura W., Seminars in Cell & Developmental Biology 22 (2011) 278–284.

- [39] <http://humancyc.org/HUMAN/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5386> (staženo dne 10. 11. 2013).
- [40] Budavari S., O'Neil M., Smith A., Heckelman P., Obenchain J.: *The Merck Index: 12th Edition*, Whitehouse Station, New Jersey 1996.
- [41] <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do;628C3F535B7AE047961BB927B1FBDDA4?chebiId=CHEBI:74324> (staženo dne 10. 11. 2013).
- [42] Rashed M. S., Aboul-Enein H. Y., AlAmoudi M., Jakob M., Al-Ahaideb L. Y., Abbad A., Shabib S., Al-Jishi E., Biomed. Chromatogr. 16 (2002) 191-198.
- [43] Fontaine M., Porchet N., Largilliere C., Marrakchi S., Lhermitte M., Aubert J. P., Degand P., Clin.Chem. 35 (1989) 2148-2151.
- [44] Kølvrå S., Rasmussen K., Brandt N. J., Pediat. Res. 10 (1976) 825-830.
- [45] Duran M., Beemer F. A., Bruinvis L., Ketting D., Wadman S. K., Pediat. Res. 21 (1987) 502-506.
- [46] Teplan V.: *Praktická nefrologie*, Grada Publishing, Praha 2006.
- [47] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2692/#ph2.Summary> (staženo dne 11. 11. 2013).
- [48] <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/primary-hyperoxaluria#definition> (staženo dne 11. 11. 2013).
- [49] Nagata M., Ichiyama A., Takayama T., Oda T., Mugiya S., Ozono S., Biomedical Research 30 (2009) 295-301.
- [50] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB000008> (staženo dne 26. 2. 2014).
- [51] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.389701.html> (staženo dne 26. 2. 2014).
- [52] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/54917?lang=en®ion=CZ> (staženo dne 26. 2. 2014).
- [53] Walter E. Gall W. E., Beebe K., Lawton K. A., Adam K. P., Mitchell M. W., Nakhle P. J., Ryals J. A., Milburn M. V., Nannipieri M., Camastra S., Natali A., Ferrannini E., PLoS ONE 5 (2010) 1371-1381.
- [54] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00357> (staženo dne 25. 2. 2014).
- [55] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=441> (staženo dne 25. 2. 2014).

- [56] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/54920?lang=en®ion=CZ> (staženo dne 25. 2. 2014).
- [57] http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/DM_verze%202012.pdf (staženo dne 25. 2. 2014).
- [58] Stojanovic V., Ihle S., *Can. Vet. J.* 52 (2011) 426–430.
- [59] Stewart Ch., Brown L., Poirier M., *Pediatric Emergency Medicine Practice* 3 (2006) 1-16.
- [60] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00606> (staženo dne 21. 10. 2013).
- [61] http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/applications/lcms_hydroxyglutarates.html (staženo dne 21. 10. 2013).
- [62] <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/2-hydroxyglutaric-aciduria> (staženo dne 21. 10. 2013).
- [63] Maier V.: *Ovlivnění selektivity v analýze fyziologicky aktivních látek kapilární zónovou elektroforézou*, UP Olomouc, Olomouc 2006.
- [64] Ermakov S. V., Capelli L., Righetti P. G., *J. Chromatogr. A* 774 (1996) 55-61.