UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Analýza kondenzátu dechu pro diagnostiku chorob

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Thuy Duong Nguyenová

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

2022 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Thuy Duong Nguyenová
Název práce:	Analýza kondenzátu dechu pro diagnostiku chorob
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá analýzou kondenzátu dechu metodou kapilární elektroforézy. Teoretická část práce pojednává o teorii kapilární elektroforézy a analýzy EBC se zaměřením na potenciální diagnostiku dýchacích onemocnění. V rámci experimentální části bylo zkonstruováno jednoduché zařízení pro odběr EBC a získané vzorky byly analyzovány pomocí metod CE-UV a CE-MS. Výsledky studie prokázaly, že je možné provést analýzu EBC za použití vyvinutého odběrného zařízení a daných metod.

Klíčová slova:	kapilární elektroforéza, odběr a analýza EBC, CE-UV, CE-MS, biomarkery dýchacích onemocnění
Počet stran:	55
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Thuy Duong Nguyenová
Title:	Analysis of breath condensate for diagnosis of diseases
Type of thesis:	master's
Department:	Department of Analytical Chemistry Faculty of Science Palacký University in Olomouc
Supervisor:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Annotation:

This diploma thesis deals with the analysis of exhaled breath condensate by capillary electrophoresis. The theoretical part of the thesis is focused on theory of capillary electrophoresis and EBC analysis with an emphasis on possible diagnosis of respiratory diseases. In the experimental part, a simple device for EBC collection was developed and obtained samples were analyzed by CE-UV and CE-MS. Results of the study demonstrated that it is possible to analyze EBC using the developed sampler and given methods.

Keywords:	capillary electrophoresis, EBC sampling and analysis, CE-UV, CE-MS, biomarkers of respiratory diseases
Number of pages:	55
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecká fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 22. 4. 2022 …..…….....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas při řešení diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Katedře analytické chemie za poskytnutí příjemného studijního zázemí. V neposlední řadě děkuji své rodině, příteli, nejlepšímu kamarádovi a dalším přátelům za veškerou podporu během studia.

Obsah:

ÚVOD **9**

1. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA **10**

1. 1. Princip kapilární elektroforézy **11**
1. 1. 1. Elektroforetická migrace 11
1. 1. 2. Elektroosmotický tok 12

1. 2. Elektroforetická separace a analýza **14**

1. 3. Instrumentace kapilární elektroforézy **16**
1. 3. 1. Kapiláry 16
1. 3. 2. Jouleovo teplo, termostatování 18
1. 3. 3. Dávkování 19

1. 4. Detekce **20**
1. 4. 1. UV-VIS detektor 20
1. 4. 2. Fluorescenční detektor 22
1. 4. 3. Vodivostní detektor 22
1. 4. 4. Hmotnostní detektor 24

2. ANALÝZA DECHU **26**

2. 1. Analýza kondenzátu dechu **27**

2. 2. Odběr EBC **28**
2. 2. 1. Komerční odběrná zařízení 28
2. 2. 2. Laboratorní odběrná zařízení 28
2. 2. 3. Metodologické aspekty odběru EBC 30
2. 2. 4. Skladování vzorků EBC 31

2. 3. Biomarkery dýchacích onemocnění v EBC **31**

2. 4. Analýza EBC pomocí CE **33**

2. 5. Perspektiva analýzy EBC pomocí CE v diagnostice chorob **34**

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **35**

3. 1. ODBĚR EBC **35**
3. 1. 1. Prvotní návrh odběrného zařízení 35
3. 1. 2. Provedení odběru EBC 36

3. 2. Parametry elektroforetických experimentů **40**

3. 3. Chemikálie **41**

3. 3. 1. Základní elektrolyty a standardy 41

4. VÝSLEDKY A DISKUZE 42

4. 1. CE-UV analýza 42
4.1.1. Analýza standardů iontů 42
4. 1. 2. Analýza vzorků EBC 44

4. 2. CE-MS analýza 49

ZÁVĚR 51

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 52

Seznam použitých zkratek:

ALF	tekutina na povrchu dýchacích cest
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CE	kapilární elektroforéza
CF	cystická fibróza
CTAB	cetrimonium (cetyltrimethylamonium) bromid
C^4D	kapacitně vázaný bezkontaktní vodivostní detektor
DI	deionizovaná
EBC	kondenzát vydechovaného dechu
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
GSH	glutathion
GSSG	glutathionsulfid
HIS	L-histidin
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
PAL	povrchově aktivní látka/y
PEEK	polyetherketon
PTFE	polytetrafluorethylen
SD	směrodatná odchylka
SRM	monitorování vybraných reakcí
UV-VIS	ultrafialová a viditelná (oblast spektra)
8-IP	8-isoprostan

ÚVOD

Kondenzát dechu lze získat ochlazením vydechovaného dechu a jeho kondenzací. Jedná se o atraktivní biologický vzorek díky jednoduchosti a neinvazivnosti jeho odběru a obsahu biomarkerů oxidačního stresu a zánětu dýchacích cest. Obsah těchto biomarkerů se může významně lišit mezi zdravými a nemocnými jedinci. Z tohoto důvodu může být analýza chemického složení kondenzátu dechu velmi cenná v oblasti diagnostiky různých patologických stavů dýchací soustavy a monitorování s ní souvisejících onemocnění. Kapilární elektroforéza je pro analýzu biologických vzorků, jako je kondenzát dechu, vhodná především díky rychlosti analýzy, vysoké účinnosti separace, schopnosti analyzovat velmi malé množství vzorku a přenositelnosti.

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši na téma kapilární elektroforézy a analýzy kondenzátu dechu, a dále vyvinout metodu pro odběr vzorků kondenzátu dechu a následně se pokusit odebrané vzorky analyzovat metodou kapilární elektroforézy ve spojení s UV a MS detekcí. Teoretická část diplomové práce pojednává o obecných principech kapilární elektroforézy, její instrumentaci a způsobech detekce, dále o analýze dechu obecně, a především jeho kondenzátu. Pozornost je věnována metodologickým aspektům odběru kondenzátu dechu a jeho obsahu biomarkerů dýchacích onemocnění. Závěr teoretické části pojednává o analýze kondenzátu dechu pomocí kapilární elektroforézy a jejím potenciálu v oblasti diagnostiky chorob. V praktické části práce je popsán postup odběru kondenzátu dechu prostřednictvím v laboratoři zkonstruovaného odběrného zařízení, a dále analýza kondenzátu dechu metodami CE-UV a CE-MS, její cíle, provedení, výsledky a diskuze.

1. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Kapilární elektroforéza (angl. capillary electrophoresis, CE) je analytická separační technika založena na migraci nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Za zakladatele elektroforézy se považuje švédský chemik A. Tiselius, který roku 1937 jako jeden z prvních použil elektroforézu pro analýzu sérových proteinů. Při aplikování elektrického pole na směsi těchto proteinů spolu s roztoky pufrů ve zkumavce zjistil, že jednotlivé složky směsi migrovaly v určitém směru a určitou rychlostí v závislosti na jejich náboji a pohyblivosti. Za tuto práci byla Tiseliusovi později roku 1948 udělena Nobelova cena za chemii [1,2]. Separace ve volném roztoku, jak ji provedl Tiselius, byla však omezena tepelnou difúzí a konvekcí. Z toho důvodu se separace biomakromolekul začala provádět v antikonvektivních médiích, a to v polyakrylamidových či agarózových gelech v plošném nebo kapilárním uspořádání. Plošná gelová elektroforéza je dnes v této oblasti jednou z nejrozšířenějších separačních technik, avšak má také své stinné stránky, jako jsou dlouhá doba analýzy, nízká účinnost separace a potíže při detekci a automatizaci.

V tomto ohledu představuje vhodnou alternativu elektroforetická separace v úzkých otevřených kapilárách. Kapiláry jsou málo vodivé, generují méně tepla a jsou v principu antikonvektivní, proto v jejich případě není použití gelových médií nutné [2]. První elektroforetickou separaci v kapilárách o vnitřním průměru 1 mm uskutečnil roku 1958 S. Hjertén, který kapiláry otáčel podél jejich podélné osy, aby minimalizoval vlivy konvekce. Později R. Virtanen a poté F. E. P. Mikkers a F. M. Everaerts provedli elektroforetický experiment v kapilárách vyrobených ze skla a teflonu s vnitřním průměrem cca 200 μm. V roce 1981 J. Jorgeson a K. Lukacs poprvé použili k separaci kapiláry z taveného křemene s vnitřním průměrem 75 μm. Na přelomu 60. a 70. let 20. století došlo k velkému rozvoji elektroforézy v kapilárách a komerční přístroj určený pro CE se poprvé objevil na trhu roku 1988 [2,3].

Od té doby se CE ujala v praxi a v dnešní době se s ní lze setkat v mnoha oblastech, jako je farmaceutická, forenzní, klinická, potravinářská, environmentální, chemická a biochemická analýza apod. CE je používána pro řadu obtížných analytických separací, nejčastěji pro separaci anorganických iontů, organických kyselin, aminokyselin, peptidů až proteinů, enzymů, hormonů, sacharidů, léčiv, vitamínů, pesticidů, barviv, povrchově aktivních látek či nukleových kyselin [1,2]. Mezi její význačné přednosti se řadí malá spotřeba analytu a pomocných roztoků, vysoká účinnost separace, robustnost vůči složitým matricím a krátká doba analýzy a optimalizace metody. Naopak k jejím slabým stránkám

patří menší reprodukovatelnost a nižší citlivost. Ve srovnání s chromatografickými technikami nabízí CE větší separační účinnost, avšak menší selektivitu a spolehlivost a také méně možností modifikace separačního děje [3,4]. Jelikož se mechanismy separace v CE značně liší, jeví se CE jako vhodná komplementární metoda k chromatografické analýze [2].

Podobně jako u kapalinové chromatografie, existuje mnoho pracovních režimů kapilární elektroforézy. Rozlišuje se celkem 6 základních technik, které se liší především mechanismem separace a použitým médiem. Jedná se o kapilární zónovou elektroforézu, kapilární gelovou elektroforézu, micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii, kapilární elektrochromatografii, kapilární izoelektrické fokusování a kapilární izotachoforézu [3]. Dále v rámci této diplomové práce je detailněji popsána pouze kapilární zónová elektroforéza (stručně jen kapilární elektroforéza), která byla použita v praktické části práce.

1. 1. Princip kapilární elektroforézy

1. 1. 1. Elektroforetická migrace

Princip kapilární elektroforézy je založen na dvou transportních jevech, elektroforetické migraci nabitých částic v elektrickém poli a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou. K separaci dochází po nadávkování malé zóny vzorku do elektricky vodivého separačního roztoku (pufru) v kapiláře. Na koncích kapiláry je pomocí dvojice elektrod, ponořených v nádobkách s roztokem elektrolytu, aplikováno vysoké vnější napětí až několika desítek kV. V prostředí vzniklého homogenního elektrického pole pak dochází k tzv. elektroforetické migraci, která představuje pohyb iontů vlivem elektrostatického přitahování náboje k opačně nabité elektrodě. K této elektrodě putují *i*-té ionty konstantní elektroforetickou rychlostí $v_{\mathrm{ef},i}$ (cm s^{-1}), která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E (V cm^{-1}) a elektroforetické pohyblivosti daného iontu $\mu_{\mathrm{ef},i}$ (cm^2 V^{-1} s^{-1}):

$$v_{\mathrm{ef},i} = \mu_{\mathrm{ef},i} \cdot E \tag{1}$$

Intenzita elektrického pole E odpovídá podílu napětí U (V) aplikovaného na dvojici elektrod a celkové délky separační kapiláry L_c (cm):

$$E = \frac{U}{L_c} \tag{2}$$

Elektroforetická pohyblivost $\mu_{ef,i}$ (cm^2 V^{-1} s^{-1}) *i*-tého iontu, závisí na celkovém náboji iontu Q_i, poloměru iontu r_i a dynamické viskozitě prostředí η (kg m^{-1} s^{-1}) [3]:

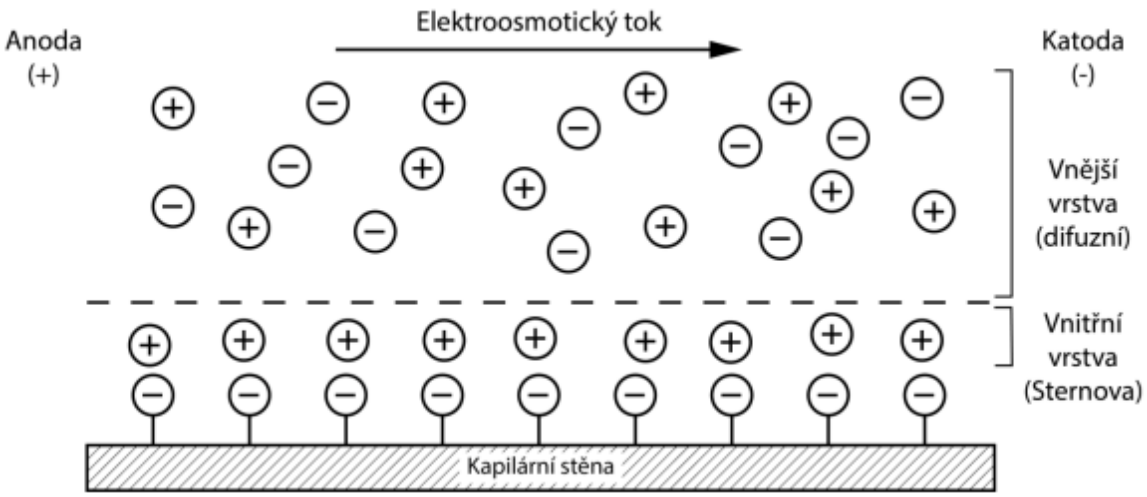
$$\mu_{ef,i} = \frac{Q_i}{6\,\pi\,\eta\,r_i} \tag{3}$$

Z výše uvedené rovnice vyplývá, že čím má iont větší náboj a menší poloměr, tím rychleji migruje v elektrickém poli. Jednotlivé analyty se následně liší svými elektroforetickými pohyblivostmi a dochází tím k jejich separaci, přičemž elektroforetické pohyblivosti jsou v případě kationtů kladné a aniontů záporné [1].

1. 1. 2. Elektroosmotický tok

Křemenná kapilára má na svém povrchu silanolové skupiny (≡Si–OH), které v kontaktu s roztokem elektrolytu při nepříliš nízké hodnotě pH (zhruba pH = 4 a výše) disociují, v důsledku čehož získá vnitřní povrch kapiláry negativní náboj křemičitanových skupin (≡Si–O$^-$). Uvolněné vodíkové ionty pak při rozhraní stěny kapiláry a roztoku elektrolytu vytvářejí na základě elektrostatických zákonů elektrickou dvojvrstvu [1-3]. Elektrostatická orientace iontů těsně u rozhraní s kapilárou je konstantní (Sternova či Helmholtzova vrstva), zatímco směrem dál od rozhraní orientace částic klesá vlivem difúze, konvekce a klesající intenzity elektrického pole dvojvrstvy (difúzní vrstva). Ve chvíli, kdy je na kapiláru vloženo vnější elektrické napětí, jsou solvatované kationty v difúzní vrstvě přitahovány k opačně nabité elektrodě (katodě) a s sebou strhávají veškerý roztok v kapiláře, čímž dochází k tzv. elektroosmotickému toku (angl. electroosmotic flow, EOF) (Obr. 1). Směrem, který je dán polaritou nábojů ve dvojvrstvě, unáší EOF všechny solvatované analyty, díky čemuž lze během jedné separace detekovat a stanovit kationty, anionty i neutrální látky [1,3]. Rychlost EOF v_{EOF} (m s^{-1}) je přímo úměrná intenzitě elektrického pole *E* a elektroosmotické mobilitě μ_{EOF} (m^2 V^{-1} s^{-1}), která závisí na velikosti záporného náboje vnitřního povrchu kapiláry:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \tag{4}$$



Obr. 1: Elektrická dvojvrstva na rozhraní křemenné kapiláry a roztoku elektrolytu, elektroosmotický tok [5]

EOF je jedním z významných parametrů, skrze který můžeme upravovat podmínky separace. Modifikací povrchu kapiláry můžeme změnit velikost EOF či dokonce obrátit jeho směr [1]. Můžeme také EOF zcela vyloučit, zneutralizuje-li se náboj na vnitřní stěně kapiláry. Rychlost EOF (a tudíž i dobu analýzy) můžeme determinovat změnou složení, viskozity (resp. teploty), pH a koncentrace elektrolytu. Čím vyšší je pH elektrolytu v kapiláře, tím větší je disociace silanolových skupin a záporný náboj na jejím vnitřním povrchu, a tím rychlejší je EOF. Zatímco tedy v kyselém separačním prostředí je EOF pomalý, v neutrálních a bazických tlumivých roztocích migrují analyty s pomocí EOF velkou rychlostí. Při velmi vysoké hodnotě pH však může být EOF již příliš rychlý, což by mohlo vést k eluci analytů ještě před jejich separací. Na hodnotě pH významně závisí také disociace slabě kyselých a zásaditých analytů, a tudíž jejich elektroforetické pohyblivosti a selektivita separace [2,3].

Koncentrace (resp. iontová síla) tlumivého roztoku má na EOF vliv takový, že v méně koncentrovaných pufrech je pozorován rychlejší EOF než v koncentrovanějších. Rychlejší EOF, a tím i nižší elektrický proud, je pro elektroforetickou separaci žádoucí z toho důvodu, že se generuje méně tepla. Koncentrace pufru by však měla být optimální pro dostatečnou tlumivou kapacitu a udržení konstantního pH po celé délce kapiláry. Standardně se využívají tlumivé roztoky o koncentraci desítek mmol/l [2,3].

1. 2. Elektroforetická separace a analýza

Dávkovaný vzorek je obvykle zředěný (rozpuštěný ve vodě či ve zředěném separačním elektrolytu), a je tedy méně elektricky vodivý než samotný separační elektrolyt. Z toho důvodu dochází po připojení napětí k jeho zakoncentrování. Méně vodivý vzorek si vynutí větší intenzitu elektrického pole, než která je v separačním elektrolytu, a ionty uvnitř zóny analytu se následně pohybují větší elektroforetickou rychlostí až k rozhraní mezi vzorkem a elektrolytem. Zde na rozhraní se vzorek vlivem nižší intenzity elektrického pole v elektrolytu zpomalí a nahromadí se do úzké zóny. Takto zakoncentrovaná zóna vzorku se pak vmigruje do separačního elektrolytu a pohybuje se spolu s EOF směrem ke katodě. Analyty, které v prostředí elektrolytu nabydou náboje, se navíc pohybují svými elektroforetickými rychlostmi, a dělí se tím na své vlastní zóny. Je-li ve vzorku obsaženo více druhů kationtů či aniontů, dojde k jejich vzájemné separaci pouze v případě, budou-li se lišit svými elektroforetickými mobilitami. Analyty bez náboje jsou unášeny čistě jen prostřednictvím EOF a setrvávají v původní nadávkované zóně vzorku [3].

Vzniklé zóny kladně nabitých analytů se budou pohybovat rychleji než EOF o hodnotu jejich elektroforetické rychlosti $v_{ef,+}$, která je kladná ($v_{ef,+} > 0$). Výslednou rychlost migrace určitého kationtu vzhledem ke kapiláře a detektoru lze vyjádřit součtem elektroosmotické rychlosti elektrolytu a elektroforetické rychlosti daného kladně nabitého analytu uvnitř elektrolytu a tato rychlost se nazývá jako rychlost pozorovaná neboli také zdánlivá $v_{poz,+}$:

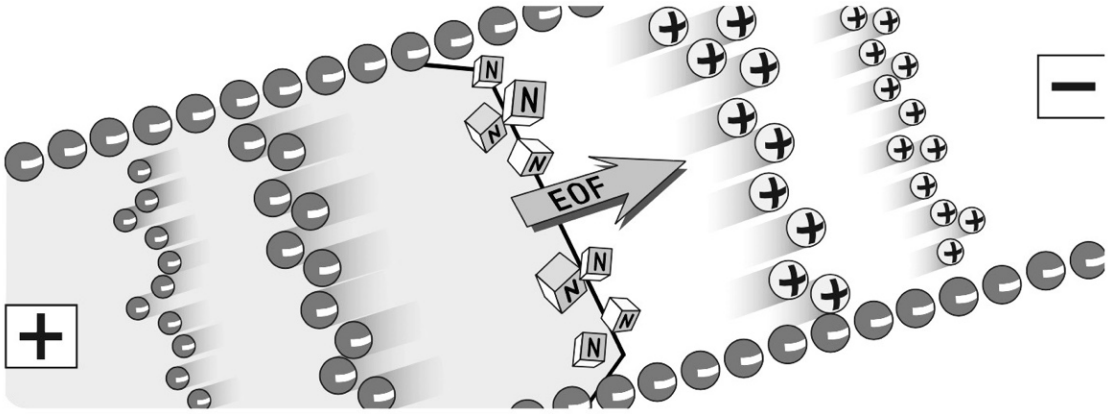
$$v_{\mathrm{poz},+} = v_{\mathrm{eof}} + v_{\mathrm{ef},+} \tag{5}$$

Naproti tomu zóny záporně nabitých analytů budou migrovat pomaleji než elektroosmotický tok, jelikož jejich elektroforetické rychlosti $v_{ef,-}$ jsou záporné ($v_{ef,-} < 0$), a jejich pozorované (zdánlivé) rychlosti $v_{poz,-}$ lze analogicky vyjádřit jako:

$$v_{\mathrm{poz},-} = v_{\mathrm{eof}} + v_{\mathrm{ef},-} \tag{6}$$

V závěru separace domigrují zóny různých analytů k detektoru v různých migračních časech v závislosti na náboji a charakteru analytu. Na základě výše uvedených předpokladů projdou detektorem nejdříve zóny všech kationtů, poté zóna neutrálních látek a jako poslední zóny všech aniontů (Obr. 2). V případě přítomnosti vícera neutrálních analytů k jejich vzájemné separaci nedochází, jelikož se všechny pohybují stejnou rychlostí EOF, z čehož vyplývá,

že metodu kapilární zónové elektroforézy nelze použít k analýze směsi neutrálních látek. Z migračního času jakékoliv neutrální látky lze však vypočítat rychlost EOF a elektroosmotickou mobilitu. K tomuto účelu se používají dobře rozpustné a detekovatelné neutrální látky, které se označují jako tzv. značkovače EOF (angl. EOF markers). U těchto markerů je potřeba navíc věnovat pozornost tomu, aby byly neutrální v širokém intervalu pH a aby neinteragovaly s povrchem kapiláry [3,6].



Obr. 2: Elektroforetická separace kationtů, aniontů a neutrálních látek [2]

Výslednou elektroforetickou pohyblivost $\mu_{ef,i}$ daného analytu i lze vypočítat odečtením migračního času značkovače EOF t_{eof} od migračního času i-tého nabitého analytu $t_{mig,i}$, je-li známá celková délka separační kapiláry L_c, efektivní délka kapiláry od vstupního konce kapiláry k detektoru L_d a vložené separační napětí U [3]:

$$\mu_{ef,i} = \left(\frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}}\right)\frac{L_d\, L_c}{U} \qquad (7)$$

Při např. UV-VIS detekci, ke které dochází přímo na kapiláře, je efektivní délka kapiláry obvykle o 5-15 cm kratší než její celková délka. Pro detekci mimo kapiláru, např. u MS detekce, jsou tyto dvě délky totožné [2]. Elektroforetická pohyblivost je specifickou vlastností nabitých analytů a její experimentálně zjištěné hodnoty je možné využít k částečné identifikaci analyzovaných látek. Takovou identifikaci však nelze považovat za jednoznačnou, jelikož získané výsledky významně závisí na experimentálních podmínkách, jako je viskozita (resp. teplota), pH a iontová síla separačního elektrolytu [3].

1. 3. Instrumentace kapilární elektroforézy

Instrumentace komerčního přístroje pro kapilární elektroforézu je poměrně jednoduchá, standardně obsahuje autosampler s vialkami zásobních roztoků, separační kapiláru chlazenou v termostatu, zdroj vysokého napětí, dávkovací systém a detektor [6].

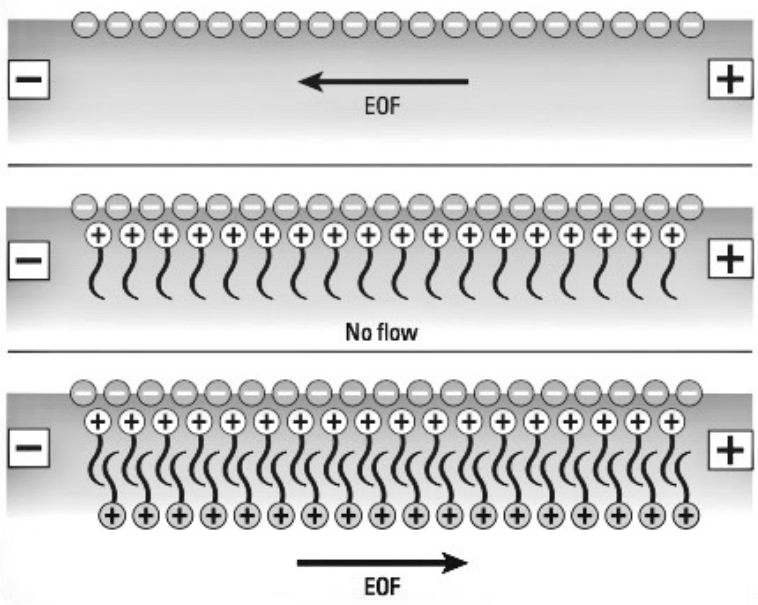
1. 3. 1. Kapiláry

Kapiláry jsou zpravidla vyrobené z taveného křemene či polymeru (např. PTFE či PEEK). Od materiálu kapilár je v ideálním případě vyžadováno, aby byl chemicky inertní, elektricky nevodivý, pružný, odolný, levný a transparentní pro UV-VIS záření. Primárně používané, křemenné kapiláry se standardně vyrábějí dlouhé 10-100 cm s vnitřním průměrem 25-100 μm a vnějším průměrem 350-400 μm. Jejich vnější povrch je pokryt vrstvou žlutého až hnědého polyimidu, který zvyšuje odolnost a pružnost kapiláry, a umožňuje tak její ohyb bez rizika jejího zlomení [1-3].

Vnitřní povrch kapilár může být různě modifikován za účelem potlačení adsorpce rozpuštěných látek na povrch kapiláry či determinace směru a rychlosti EOF. Využívají se dva základní přístupy modifikace, a to trvalá či dynamická modifikace. Trvalá modifikace spočívá v kovalentním navázání různých funkčních skupin (např. aminů, thiolů, oktadecylů, perfluorovaných alkylů apod.) či polymerizaci s vhodným polymerem. Pokrytím vnitřní stěny kapiláry dochází k její deaktivaci, přičemž deaktivace neutrálními látkami eliminuje EOF, deaktivace kationtovými látkami obrací směr EOF a deaktivace amfoterními látkami poskytuje reverzibilní EOF v závislosti na hodnotě pI látky použité k deaktivaci a pH pufru. Permanentní modifikace by měla být stabilní vůči promývání a hydrodynamickému proudění v kapiláře. Trvale modifikované kapiláry jsou komerčně dostupné od výrobců v oblasti CE, avšak kvůli přídatným nákladům na pokrývání jejich stěny jsou značně dražší než kapiláry nemodifikované [1,2].

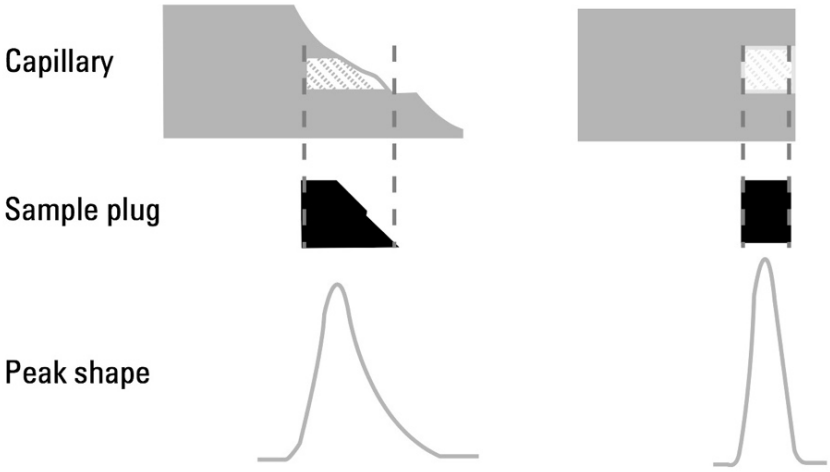
Dynamické pokrytí kapiláry se provádí pomocí činidel přítomných v základním elektrolytu. Na rozdíl od trvalého pokrytí ho lze snadno obměnit změnou složení promývacího pufru a je v současné době preferovanějším přístupem pro modifikaci kapiláry. Řada činidel interaguje se stěnou kapiláry a mění její povrchový náboj, čímž se různě modifikuje EOF a snižuje se adsorpce solutů. Používají se především různé povrchově aktivní látky (PAL), polymery či diaminy. V závislosti na náboji použité PAL lze dosáhnout rychlejšího, pomalejšího či obráceného EOF. K obrácení směru EOF se např. typicky používá kladně nabitý cetrimonium bromid (cetyltrimethylamonium bromid, CTAB), který

se naadsorbuje na vnitřní povrch kapiláry a udělí mu kladný náboj (Obr. 3). Obrácení standardního směru EOF se často využívá k urychlení separace aniontů [1,2].



Obr. 3: Eliminace a obrácení EOF pomocí kationtové PAL (např. CTAB) [2]

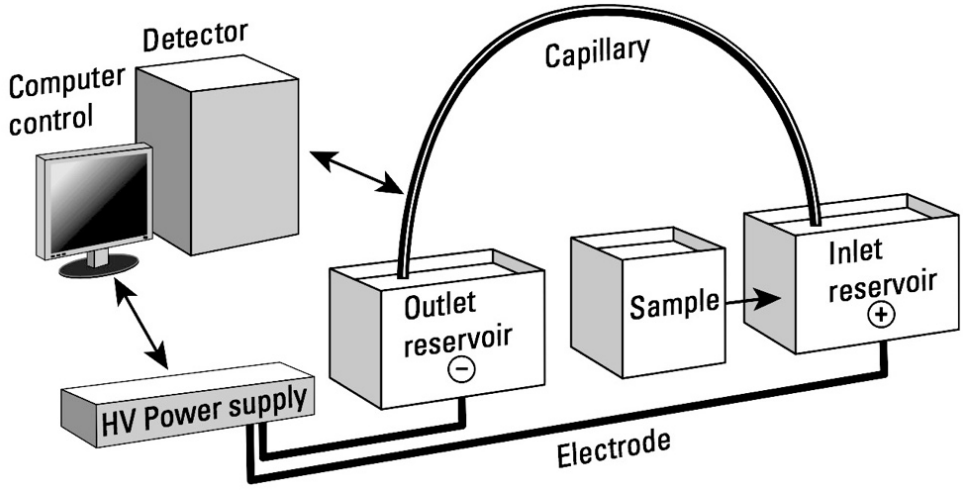
Při přípravě kapiláry před analýzou je třeba zkontrolovat, že konce kapiláry končí nepoškozeným, rovným řezem, v opačném případě může docházet k nerovnoměrnému nadávkování vzorku a chvostování píků (Obr. 4). Dále je před analýzou nutno kapiláru důkladně promýt (standardně hydroxidem sodným, vodou a separačním pufrem v tomto pořadí) a připravit do dobře definovaného, reprodukovatelného stavu hydroxylace jejího vnitřního povrchu [2].



Obr 4.: Vliv poškozeného konce kapiláry na zónu vzorku a tvar píku [2]

1. 3. 2. Jouleovo teplo, termostatování

Oba konce kapiláry jsou spolu s platinovými elektrodami ponořeny do vialek s roztokem elektrolytu, přičemž elektrody představují elektrický kontakt mezi zdrojem vysokého napětí a kapilárou (Obr. 5). Ze zdroje lze sice díky vysokému elektrickému odporu kapilár aplikovat velmi silná elektrická pole, avšak průchodem elektrického proudu separačním elektrolytem se generuje nežádoucí Jouleovo teplo, které je nutno odvést přes stěnu kapiláry do okolního prostředí. Kvůli možného přehřívání kapiláry by tedy proud neměl přesahovat 100 μA. Platí že, čím vyšší je použité napětí a vodivost (resp. iontová síla) elektrolytu a čím větší je vnitřní průměr kapiláry, tím je generováno více tepla. Zatímco absolutní nárůst teploty obecně nežádoucí není, teplotní gradient již je. Nerovnoměrné rozdělení tepla v kapiláře může způsobit rozdíly ve viskozitě separačního pufru, a tím deformaci zón analytů. V komerčních přístrojích je odvod Jouleova tepla a udržování konstantní teploty řešeno pomocí rychlého proudění vzduchu či chladicí kapaliny okolo separační kapiláry [2,3,6]. Systém rovněž izoluje kapiláru od teplotních změn okolí. Termostatování pomocí kapaliny je teoreticky účinnější, avšak pro množství tepla generované u CE je dostatečné chlazení proudem vzduchu, jehož výhodou je jednoduchost instrumentace a snadnější manipulace s kapilárou. Regulace teploty kapiláry je velmi důležitá pro reprodukovatelnost měření a optimalizaci separace, jelikož na teplotě silně závisí viskozita roztoku uvnitř kapiláry, elektroosmotický tok, a tím i migrační časy analytů a doba analýzy [2].



Obr. 5: Základní instrumentace kapilární elektroforézy [2]

1. 3. 3. Dávkování

Pro CE analýzu jsou potřeba velmi malá množství vzorku v jednotkách až desítkách nanolitrů. V praxi se běžně využívají dva způsoby dávkování vzorku do kapiláry, a to dávkování elektrokinetické a hydrodynamické. U obou způsobů se místo objemu nadávkovaného vzorku kvantifikují parametry napětí a čas u elektrokinetického dávkování a tlak a čas u hydrodynamického dávkování [2]. Elektrokinetické dávkování spočívá v působení krátkého dávkovacího napětí v jednotkách kilovoltů a po dobu několika sekund. Během tohoto elektrického pulzu se pomocí vzniklého EOF nasaje z nádobky se vzorkem do vstupního konce kapiláry (inletu) malé množství vzorku ve formě úzké zóny, dlouhé několik milimetrů. Hydrodynamické dávkování probíhá v pneumaticky uzavřené nádobce se vzorkem, kdy se nad hladinu vzorku, ve kterém je ponořen inlet, přivede stlačený vzduch o tlaku desítek milibar po dobu několika sekund. Vzniklý přetlak nadávkuje do inletu nanolitrové množství vzorku. Přetlaku lze dosáhnout také působením vakua na druhém konci kapiláry (outletu) či mechanickým pozvednutím vstupní nádobky se vzorkem o definovanou vzdálenost (cca 5-10 cm) výše než výstupní nádobka [1-3].

Při hydrodynamickém způsobu dávkování je složení natlačeného vzorku do kapiláry stejné jako složení vzorku v nádobce. Oproti tomu se na elektrokinetickém dávkování podílí také elektroforetická migrace a vlivem odlišných elektroforetických pohyblivostí kationtů a aniontů dochází z hlediska nadávkovaného množství k jejich preferenci či diskriminaci. Složení elektrokineticky dávkovaného vzorku do kapiláry se tudíž značně liší od složení vzorku v nádobce [1-3].

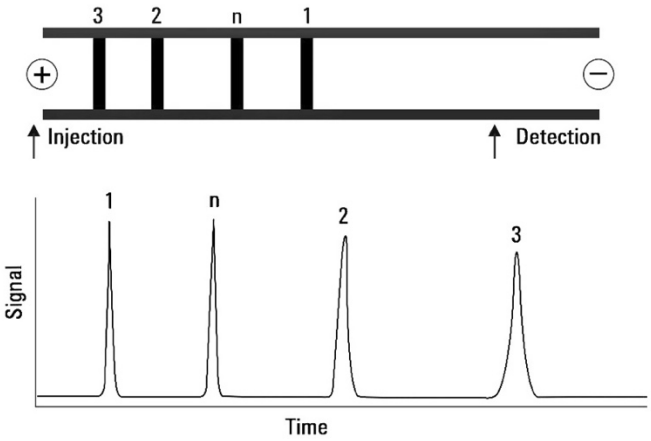
Před samotným nadávkováním vzorku je obvykle potřeba promýt kapiláru dávkováním separačního pufru po dobu několika min, aby došlo ke stabilizaci vnitřního povrchu kapiláry a EOF. Po nadávkování vzorku se vstupní konec kapiláry ponoří zpátky do nádobky s pufrem a po vložení napětí se zahájí analýza vzorku [1,3].

1. 4. Detekce

1. 4. 1. UV-VIS detektor

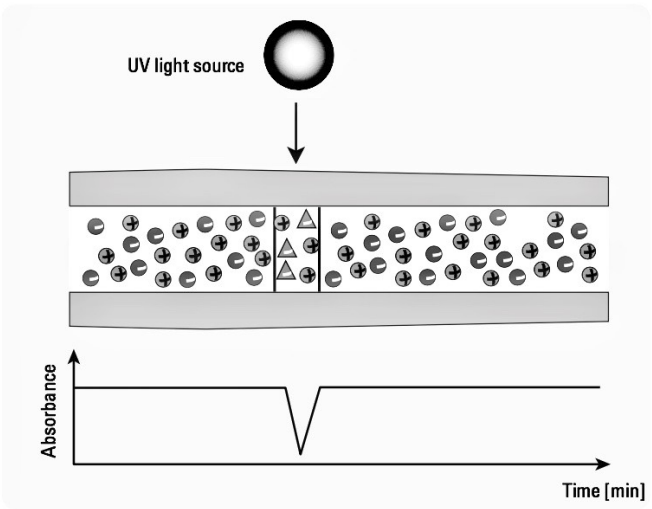
Díky svému téměř všestrannému využití je v CE nejpoužívanější analytickou koncovkou absorpční fotometrický detektor využívající UV-VIS oblasti spektra. Tento detektor je obvykle umístěn přímo na kapiláře, v blízkosti jejího výstupního konce a měří absorbanci roztoku v kapiláře při průchodu záření o určité vlnové délce. Jelikož vrstva polyimidu na vnějším povrchu kapiláry špatně propouští UV-VIS záření, je potřeba v místě průchodu světla polyimid odstranit, např. pomocí plamenu, kapky kyseliny sírové, elektrického oblouku či elektricky vyhřívaného drátu. Vznikne tak několik milimetrů dlouhé, velmi křehké detekční okénko nekryté křemenné kapiláry. V tomto místě (či nejlépe po celé délce) se kapilára opatrně očistí od zbytků zuhelnatěného polyimidu methanolem či isopropylalkoholem [2,3].

Na výsledném záznamu, tzv. elektroferogramu jsou vynášeny píky odpovídající separovaným, absorbujícím zónám analytů procházejícím detektorem v průběhu analýzy (Obr. 6). Na svislé ose elektroferogramu se vynáší absorbance jakožto odezva detektoru a osa vodorovná představuje migrační čas, což je doba od začátku analýzy do chvíle, kdy zóna příslušného analytu doputuje k detektoru. Poloha píku v elektroferogramu udává migrační čas daného analytu, na základě kterého lze vypočítat jeho elektroforetickou pohyblivost, a nese tedy kvalitativní informaci. Plocha píku pak představuje kvantitativní informaci, jelikož je úměrná množství analytu a vztažena na dávkovaný objem vzorku do kapiláry a udává koncentraci daného analytu ve vzorku. Vzhledem k častému kolísaní rychlosti EOF se pro lepší reprodukovatelnost k vyhodnocení využívají korigované plochy píků, což jsou plochy píků dělené migračními časy daných analytů [3].



Obr. 6: Píky v elektroferogramu odpovídající zónám kationtů (1), neutrálních látek (2) a aniontů (2, 3) [2]

UV-VIS detekci lze provést v přímém či nepřímém módu. Přímá detekce se využívá u analytů, které při vhodně zvolené vlnové délce absorbují záření v mnohem větší míře než separační elektrolyt a které jsou ve výsledném elektroferogramu vyobrazeny jako kladné píky. Nepřímá detekce je naopak vhodná pro analyty, které nedostatečně absorbují záření, jako jsou např. malé anorganické či organické ionty. Pro jejich detekci se využívají separační elektrolyty obsahující silně absorbujícími ko-ionty s podobnou elektroforetickou pohyblivostí a nábojem stejné polarity jako analyzované. Neabsorbující analyty následně v rámci zachování elektroneutrality tyto ko-iontové chromofory v elektrolytu vytěsní, způsobí pokles koncentrace ko-iontů, a tím i pokles absorbance, což se v elektroferogramu projeví negativními píky (Obr. 7) [1,3].



Obr. 7: Nepřímá UV detekce, vytěsnění absorbujících ko-iontů (aniontů kulatého tvaru) neabsorbujícími analyty (anionty trojúhelníkového tvaru) [2]

1. 4. 2. Fluorescenční detektor

Kromě výše popsané UV-VIS detekce se v CE využívají také další detekční techniky, které rozšiřují možnosti aplikace a zvyšují selektivitu a citlivost pro určité analyty [1]. Kupříkladu fluorescenční detektor slouží k velmi citlivé detekci fluoreskujících látek, před samotnou analýzou však obvykle vyžaduje derivatizaci vzorku. Vzhledem k tomu, že fluorescence je poměrně vzácný jevem, je využitelnost detekce na základě přirozené fluorescence analytů značně omezená. Existuje tedy řada komerčně dostupných derivatizačních činidel, pomocí kterých lze určité skupiny látek učinit fluorescenčními. Většina těchto derivatizací je založena na kovalentní adici fluoreskující skupiny na specifické funkční skupiny (např. aminové, hydroxylové, karbonylové, karboxylové, thiolové skupiny apod.) molekul analytů. Nefluoreskující analyty mohou být také detekovány nepřímo podobně jako u absorpční fotometrické detekce [2].

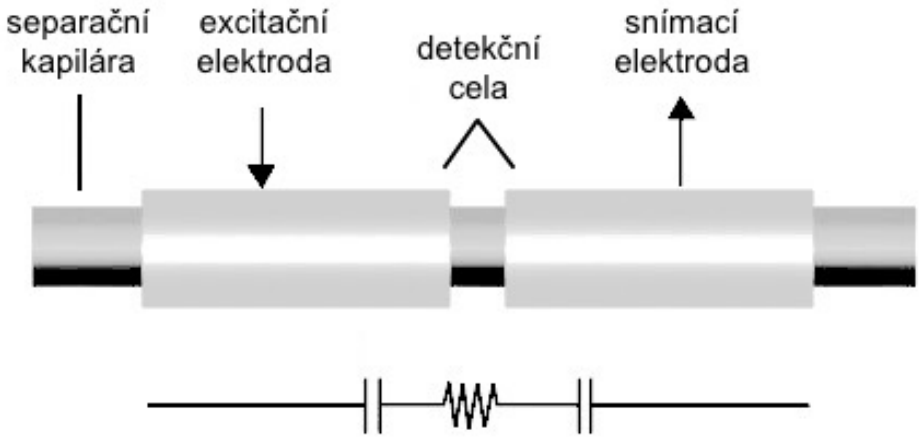
Citlivost fluorescenční detekce je přímo úměrná intenzitě emitovaného světla. Čím více daný analyt emituje světlo, tím vyšší je jeho výsledný pík, a tím vyšší je poměr signálu k šumu. Intenzita emitovaného světla závisí na intenzitě excitačního záření. K velmi citlivé, tzv. laserem indukované fluorescenční (LIF) detekci se používají lasery, které poskytují excitační záření o vysoké intenzitě a mohou být zaostřeny do detekčního okénka na kapiláře [7].

1. 4. 3. Vodivostní detektor

K detekci málo absorbujících analytů v UV/VIS oblasti, jako jsou malé anorganické ionty, sacharidy či aminokyseliny, se využívá univerzální vodivostní detektor měřící elektrickou vodivost roztoku v kapiláře [3]. V praxi se využívají dva druhy vodivostních detektorů, a to kontaktní a bezkontaktní. U kontaktního vodivostního detektoru se na dvě elektrody, které jsou v přímém kontaktu s měřeným roztokem, aplikuje střídavé napětí. Roztok v kapiláře protéká mezi těmito elektrodami a při přítomnosti elektricky vodivého analytu se sníží elektrický odpor roztoku, čímž se zvýší jeho elektrická vodivost [7].

Vývoj bezkontaktní vodivostní detekce odstranil problémy, které způsoboval kontakt elektrod se separačním elektrolytem [8]. Bezkontaktní detektor využívá dvě válcové elektrody, umístěné zvnějšku separační kapiláry v definované vzdálenosti od sebe (Obr. 8). Na první z elektrod (excitační elektrodu) se aplikuje vysokofrekvenční elektrické pole, které prochází i nevodivým materiálem křemenné kapiláry, čímž dochází ke kapacitnímu

přechodu mezi touto elektrodou a elektrolytem uvnitř kapiláry. Po průchodu elektrolytu detekční mezerou (celou) mezi válcovými elektrodami dojde k dalšímu kapacitnímu přechodu mezi elektrolytem a druhou elektrodou (snímací elektrodou). Na základě tohoto principu zaznamenává snímací elektroda při průchodu analytů mezi dvěma elektrodami změnu odporu (resp. vodivosti) roztoku v separační kapiláře. Tento typ detektoru se označuje jako kapacitně vázaný bezkontaktní detektor (angl. capacitively coupled contactless conductivity detector, C^4D). Výhodami C^4D je jednoduchá konstrukce, nízké pořizovací náklady, absence kontaminace elektrod a možnosti detekce dalšími detekčními systémy v sérii [2]. Díky své kompaktní velikosti a nízké spotřebě energie (kterou lze dobíjet i z baterií) se navíc může C^4D používat také v přenosných přístrojích [4].



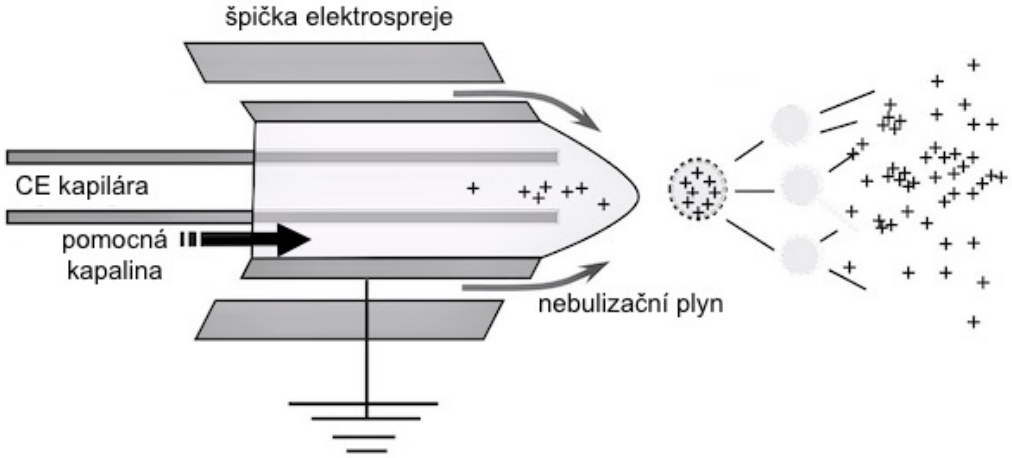
Obr. 8: Konstrukce bezkontaktního vodivostního detektoru [2]

Citlivost vodivostní detekce významně závisí na koncentraci použitého separačního tlumivého roztoku. Je-li signál pozadí (pufru) vyšší než změny vodivosti způsobené přítomností separovaných analytů, bude citlivost vodivostní detekce nízká a je možno ji zvýšit zředěním pufru. Pro dosažení optimální citlivosti by měl být rozdíl vodivosti mezi zónou analytu a pufrem co nejvyšší. Zředění se však doporučuje provádět pouze do koncentrace 1 mmol/l, jelikož při nižší koncentraci již nedochází k dostatečné pufrační kapacitě tlumivého roztoku [2,6].

1. 4. 4. Hmotnostní detektor

Pro separaci a následnou kvantifikaci a identifikaci látek se nabízí spojení CE s hmotnostní spektrometrií (angl. mass spectrometry, MS), která poskytuje rozsáhlé strukturní informace o analytu [2,6]. Velmi malé objemové průtoky (zhruba 1 μl/min) ze separačních kapilár umožňují napojení jejich outletů přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde se k ionizaci nejběžněji využívá elektrosprej (angl. electrospray ionization, ESI). ESI je vhodná pro ionizaci polárních a nabitých látek, kterými se CE většinou zabývá [1,2].

Přestože je interface mezi CE a MS značně složitou a problematickou záležitostí, toto spojení je dnes jedním z hlavních trendů v oblasti CE. Pro rozhraní CE-ESI-MS přišli Smith a kol. s konceptem tříosého kapilárního spreje [9] (Obr. 9), který byl následně komercializován společností Agilent Technologies. Středem tohoto kapilárního spreje prochází separační kapilára, jejíž konec (cca 0,5 mm) vyčnívá ze špičky spreje. Do prostoru pláště spreje kolem separační kapiláry proudí pomocná kapalina (většinou vodná směs methanolu, acetonitrilu či isopropanolu s kyselinou octovou, mravenčí či amoniakem) a nebulizační plyn (např. dusík). Díky ředění eluátu z CE pomocnou kapalinou je možné použít koncentrovanější separační pufry a je dosaženo dostatečné průtokové rychlosti (typicky 5-10 μl/min) potřebné pro stabilní ESI. V praxi je potřeba u tohoto CE-ESI-MS rozhraní optimalizovat mnoho parametrů, jako je průtok a složení pomocné kapaliny, nebulizační plyn, napětí elektrospreje, teplota atd. [2,7].



Obr. 9: Rozhraní CE-ESI-MS ve formě tříosého kapilárního elektrospreje [2]

U ESI se jako vhodné elektrolytické systémy pro dostačující separaci látek a uspokojivou kvalitu získaných hmotnostních spekter používají se těkavé elektrolyty s co nejmenší možnou koncentrací (resp. iontovou silou) a minimálním obsahem netěkavých ionizovaných složek. Mezi takové elektrolyty se řadí např. octan či mravenčan amonný a uhličitan amonný [6]. Komerční přístroje s ESI jsou nejběžněji dostupné ve spojení s kvadrupólem či iontovou pastí [1]. Kromě ESI se pro spojení s CE nabízí také jiné techniky ionizace, jako je chemická ionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric pressure chemical ionization, APCI) či fotoionizace za atmosférického tlaku (angl. atmospheric pressure photo ionization, APPI). Tyto techniky jsou však v praxi pro CE-MS omezeny pouze na dostatečně těkavé látky s nízkou molekulovou hmotností (menší než 1000 Da) [2]. V případě potřeby komplexnější analýzy se nabízí možnost využití spojení CE s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní detektor může sloužit jako univerzální i selektivní detektor. V režimu celkového iontového proudu (angl. total ion current, TIC) snímá MS spektra veškerých analytů (iontů) ve stanoveném měřícím rozsahu, zatímco v režimu selektivního záznamu iontu (angl. selected ion monitoring, SIM) je možné selektivně detekovat pouze analyty s určitou molekulovou hmotností.

2. ANALÝZA DECHU

Počátky analýzy dechu se datují od doby Hippokrata, jenž se zabýval souvislostí zápachu dechu s lidskými chorobami [10]. Dech byl používaným biologickým vzorkem již ve středověku, avšak jeho diagnostický potenciál byl plně odhalen až s rozmachem moderní chemie. V roce 1784 A.-L. Lavoisier dokázal, že lidské tělo spotřebovává kyslík a produkuje oxid uhličitý, a jako jeden z prvních uskutečnil analýzu dechu na přístroji, který používal ke studiu dýchání [11]. O necelých 100 let později, roku 1874 F. E. Anstie zjistil, že mohou být dechem vylučovaná malá množství alkoholu [12] a roku 1897 Nebethau dokázal, že diabetici vydechují aceton [13]. Při dalších systematičtějších studiích vyvinuli kolem roku 1927 E. Bogen [14] a W. D. McNally [15] dechové zkoušky na přítomnost alkoholu, přičemž první zařízení k tomuto účelu, používané v praxi při testování řidičů bylo zkonstruováno Hargerem v roce 1931 a posléze patentované v roce 1936 [16]. Moderní éru analýzy dechu zahájil roku 1971 L. Pauling, kdy objevil více než 250 těkavých organických sloučenin v dechu zachyceném v chlazené trubici z nerezové oceli [17].

Od té doby přitahuje oblast analýzy dechu širokou pozornost vědců i lékařů. V rámci velkého množství publikací se zkoumalo, zda lze chemické složení dechu využít k diagnostice a monitorování dýchacích onemocnění. Doposud bylo schváleno jen několik diagnostických metod založených na chemické analýze dechu [18]. V současné době se analýza dechu dělí na dvě hlavní oblasti výzkumu. První z nich se zabývá detekcí těkavých organických látek pomocí spektrometrie iontové pohyblivosti [19,20], hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty [21,22] či spojení plynové chromatografie s (tandemovou) hmotnostní spektrometrií [23,24]. Druhá oblast výzkumu se zabývá dechem v kapalné fázi – jeho kondenzátem, který obsahuje především netěkavé látky a těkavé látky rozpustné ve vodě [25]. Následující kapitoly této práce se budou týkat zejména druhé jmenované oblasti výzkumu zabývající se analýzou kondenzátu dechu.

2. 1. Analýza kondenzátu dechu

Kondenzát vydechovaného dechu (angl. exhaled breath condensate, EBC) je biologický vzorek, který lze získat odběrem vydechovaného vzduchu, jeho ochlazením a výslednou kondenzací. Jako jedna z lidských tělních tekutin byl EBC popsán roku 1980 Sidorenkem a kol. [26] a od té doby je intenzivně studován zejména v oblasti respirační medicíny. Povrch dýchacích cest je pokryt tenkou vrstvou tekutiny (angl. airway lining fluid, ALF), ze které se do dechu ve formě aerosolových částic může uvolnit řada netěkavých látek [25]. Spolu s vodou a oxidem uhličitým byly v EBC nalezeny tyto látky odrážející složení ALF o různých koncentracích. Jedná se o malé anorganické ionty, organické molekuly, aminokyseliny, peptidy, proteiny, lipidy, povrchově aktivní látky a makromolekuly. Kromě netěkavých látek může EBC obsahovat také ve vodě rozpustné těkavé látky, jako je amoniak, peroxid vodíku či ethanol. Matrice EBC je velmi jednoduchá a vzorek EBC je vhodný pro přímou analýzu pomocí CE [27-29]. Avšak protože je z hlediska procentuálního složení z 99,9 % tvořen vodou, ostatní látky, které jsou v něm obsažené, jsou velmi zředěné. Z toho důvodu může být v některých případech potřeba prekoncentrace vzorku [25].

Mezi nevýhody EBC se tudíž řadí nízká koncentrace analytů a nekontrolovatelné ředění aerosolových částic. Kvůli neznámé, proměnlivé míře zředění je analýza EBC v současné chvíli užitečná spíše z hlediska kvalitativní informace a relativního měření obsahu analytů nežli pro jejich kvantitativní vyhodnocení. Dalším problémem analýzy EBC je absence standardizovaných postupů (jak pro odběr EBC, tak i jeho následnou analýzu) a referenčních hodnot pro interpretaci získaných dat. Obsah nalezených analytů v EBC se zpravidla vztahuje na objem odebraného EBC (tj. μg/ml, μmol/l apod.), avšak ten je významně ovlivněn způsobem odběru, typem odběrného zařízení a jeho účinností a samotným procesem dýchání [25]. Se záměrem standardizace intepretace dat a zvýšení jejich reprodukovatelnosti přišli Reinhold a kol. [30,31] a Rosias [32] s návrhem, že výsledné koncentrace analytů by se měly vyjadřovat v závislosti na množství vydechovaného vzduchu při odběru EBC. Bez standardizace postupů a validace použitých analytických technik rovněž není možné porovnávat výsledky z různých laboratoří. Kvůli výše uvedeným důvodům nelze v současné době EBC považovat jako zcela spolehlivý biologický vzorek a analýza EBC je omezena pouze na výzkumné účely. Přes všechna tato úskalí je však EBC stále velice atraktivním biologickým vzorkem především díky neinvazivnosti jeho odběru a obsahu biomarkerů, které mohou odrážet různé fyziologické a patologické stavy plic [33].

2. 2. Odběr EBC

2. 2. 1. Komerční odběrná zařízení

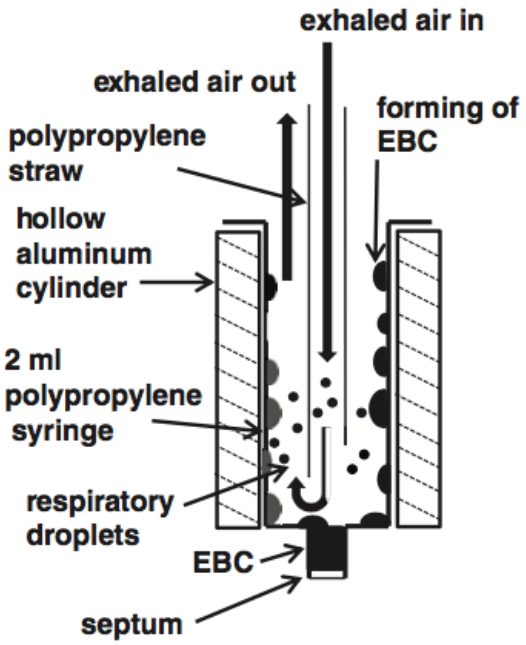
Odběr kondenzátu dechu spočívá ve vydechování vzduchu do speciálně navrženého zařízení. K tomuto účelu dnes existují komerční přístroje jako je např. EcoScreen, EcoScreen2, Turbodeccs či RTube. EcoScreen a jeho novější typ EcoScreen2 jsou stolní zařízení skládající se z jednocestného trubicového systému, sběračem slin za náustkem, elektricky chlazené komory z hliníku a jednorázovým sběrným kelímkem/sáčkem. Přístroj také obsahuje vestavěný spirometr, který měří objem vydechovaného dechu v závislosti na čase, a standardizuje tak samotný odběr. Ecoscreen zařízení nejsou přenosná, váží přibližně 20 kg, vyžadují elektrické připojení a používají se především ve výzkumných laboratořích. Turbodeccs je odběrné zařízení složené z jednocestného ventilu a jednorázové sběrné cely vložené do elektricky chladicího systému. Váží zhruba 5 kg a také vyžaduje elektrické připojení. U zařízení EcoScreen a Turbodeccs je prostřednictvím elektronického ovládání volně nastavitelná teplota sběrné nádobky. Nejjednodušší komerčně dostupný RTube (Respiratory Research, Inc, Charlottesville, USA) se skládá z jednocestného ventilu, sběrače slin, sběrné zkumavky, chladicího hliníkové manžety, která se před odběrem skladuje v mrazáku či lednici. Na rozdíl od předešlých dvou zařízení je RTube zcela přenosný a může ho používat i nevyškolený personál. Jeho značnou nevýhodou je však možné zvyšování jeho teploty při časově delších odběrech, čímž klesá účinnost odběru [25].

2. 2. 2. Laboratorní odběrná zařízení

Jelikož je odběr EBC poměrně snadno proveditelný a bezpečný, jsou často v laboratořích k tomuto účelu konstruována vlastní zařízení za použití různých chladicích technik, materiálů a tvarů. Nejdůležitější částí zařízení je sběrná nádobka (resp. zkumavka, trubice apod.), na jejíž vnitřní stěně dech kondenzuje a na jejíž ploše a teplotě závisí množství získaného EBC. Při konstrukci těchto zařízení hrají významnou roli aspekty, jako jsou reprodukovatelnost a rychlost odběru či přenosnost zařízení. Po domácku vyráběná zařízení jsou oproti komerčním přístrojům finančně výrazně dostupnější, avšak jejich sestrojení může být časově náročné [25,33].

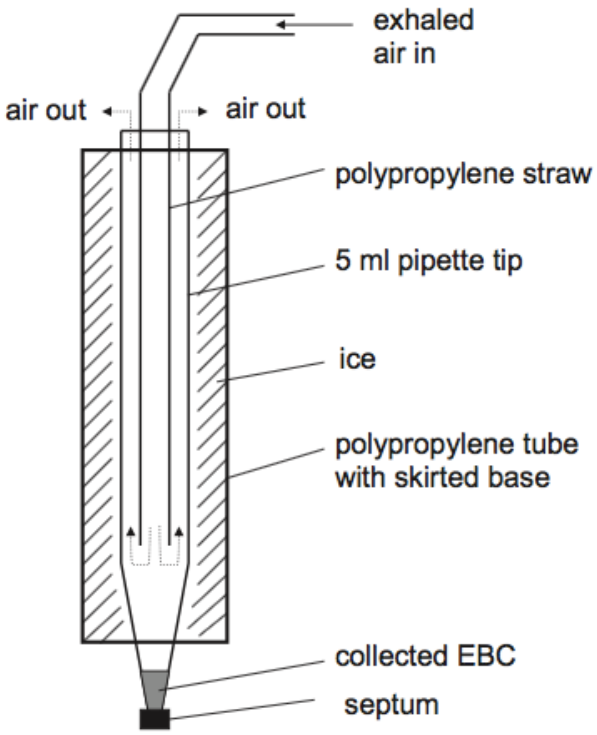
Gregušovi a kol. se podařilo za pomocí plastového brčka, 2 ml injekční stříkačky a dutého válce z hliníku uskutečnit rychlý odběr EBC do 1 min (Obr. 10). Stříkačka byla vložena do předem vychlazeného hliníkového válce (v mrazáku při -15 °C). Dech byl

vydechován brčkem dovnitř stříkačky, jejíž koncová špička byla obalena parafilmem proti úniku vzorku. V průběhu odběru byl válec navíc obalen izolační manžetou pro udržení jeho nízké teploty po delší dobu. Pro reprodukovatelnost odběru Greguš a kol. použili také specifický postup nadechování a vydechování dle Almstranda a kol. [34], který se skládal ze tří kroků: úplný výdech do vyprázdnění plic, rychlý nádech po dobu 1-2 s a opět úplný výdech, tentokrát již do sampleru po dobu 8-10 s. Opakováním tohoto postupu dýchání 3krát stačilo na shromáždění průměrně 70 µl EBC. Zkondenzovaný dech byl ze stěn injekční stříkačky pístem setřen a vytlačen do vialky pro následnou analýzu. V případě pozdější analýzy byly vzorky skladovány při -20 °C [4].



Obr. 10: Konstrukce EBC sampleru Greguše a kol. [4]

Kubáňovi a kol. své vlastní odběrné zařízení (Obr. 11) sestavili z 50 ml polypropylenové nádobky, do jejíhož dna byl vyvrtán otvor s 5 mm průměrem tak, aby ze shora do tohoto otvoru mohla být zatlačena 5 ml propylenová špička pipety. Dolní část špičky byla utěsněna septem a horní část pokryta parafilmem, aby se zabránilo možné kontaminaci. Nádobka pak byla naplněna deionizovanou (DI) vodou a ve svislé poloze umístěna po dobu několika hodin do mrazáku při -20 °C. Po vyjmutí z mrazáku byl dech vydechován přes plastového brčko dovnitř špičky chlazené vzniklým ledem, čímž došlo ke kondenzaci dechu a jeho nahromadění na dně špičky. Pomocí takto sestaveného zařízení se Kubáňovi a kol. podařilo odebrat 100-200 µl EBC za dobu 1-2 min [27].



Obr. 11: Konstrukce EBC sampleru Kubáně a kol. [27]

2. 2. 3. Metodologické aspekty odběru EBC

Všechna výše popsaná zařízení mají otevřený konec, kterým vydechovaný dech proudí volně ven do okolního prostředí bez recirkulace v odběrném systému. Tzn. že značná část vydechovaného dechu v závislosti na délce chladicí trubice, teplotě kondenzace a rychlosti dechu opouští odběrné zařízení a nezkondenzuje se, čímž se účinnost odběru pohybuje okolo 50-70 %. Proto Rosias a kol. vyvinuli odběrné zařízení s termostatovaným vakem pro zachycení nezkondenzovaného dechu, který může následně opakovaně cirkulovat chladicí trubicí. Takové zařízení má již téměř 100% účinnost a je užitečné při potřebě velkých objemů EBC či při odběru EBC od pacientů, kteří nedokážou vytrvale dýchat po dlouhou dobu (např. děti či pacienti se závažnou CHOPN) [25].

Experimentální podmínky, za kterých by mělo docházet k odběru a následnému skladování, se mohou lišit v závislosti na biomarkerech, které se plánují dále analyzovat. Pro účely standardizace odběru a složení EBC by měla být dále v budoucnu věnována pozornost aspektům, jako je konstrukce odběrného zařízení, teplota a materiál sběrné nádobky, proudění vzduchu, proces dýchání (dechový objem, frekvence dýchání atd.), doba trvání odběru, ředění vzorku, možná kontaminace, způsob skladování apod. [33].

2. 2. 4. Skladování vzorků EBC

Vzorky EBC se obecně doporučuje analyzovat co nejdříve po jejich odběru. Není-li to možné, měly být vzorky ihned po odběru zmraženy při teplotě alespoň -20 °C a nižší (nejlépe při teplotách -70 °C či -80 °C). Avšak ani skladování při těchto velmi nízkých teplotách nezaručuje stabilitu některých analytů. Opakované rozmrazování a zmrazování vzorků může způsobit ztráty některých nestabilních látek. Z výše uvedených důvodů by se v ideálním případě mělo k odběru EBC používat přenosné zařízení, které by bezprostředně po odběru na stejném místě EBC i zanalyzovalo [25].

2. 3. Biomarkery dýchacích onemocnění v EBC

EBC obsahuje širokou škálu látek, které se v řadě provedených studií projevily jako klinicky relevantní. Souvisejí s oxidačním stresem a s akutním či chronickým zánětem, který se objevuje u mnoha onemocnění dýchacích cest [35]. Jedním z nich je oxid dusnatý (NO), který je enzymaticky produkován v dýchacích cestách lidského organismu [36] a který je v současnosti nejstudovanějším plynem ve vydechovaném dechu. Při zánětu dochází skrze indukci syntáz NO ke zvýšené koncentraci NO, díky čemuž se používá jako marker oxidačního stresu. Od NO jsou odvozené další markery oxidačního stresu, které jsou produkty jeho přeměny a které se nacházejí v EBC, a to především dusitany, dusičnany a různé nitrosylované sloučeniny. Tyto biomarkery se následně uvolňují do ALF, a tím i do EBC a indikují rozsah zánětu, jenž hraje důležitou roli v patofyziologii některých dýchacích onemocnění. Jedná se např. o astma [37], chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN) či cystickou fibrózu (CF), u kterých dochází k opakovanému chronickému zánětu dýchacích cest a u kterých lze najít zvýšené koncentrace markerů oxidačního stresu [38-41]. Měření vydechovaného NO je dnes standardizovanou a široce používanou metodou pro hodnocení zánětu dýchacích cest v diagnostice astmatu [37,42]. Klinické využití měření NO je však v současnosti omezené pouze na pacienty s astmatem, jelikož jeho role u jiných respiračních onemocnění zatím není zcela známa [43].

Mezi další markery oxidačního stresu se řadí metabolity kyseliny arachidonové, a to především isoprostany, leukotrieny a prostanoidy. 8-isoprostan (8-IP) je považován za jeden z nejspolehlivějších markerů peroxidace lipidů, a tudíž oxidačního stresu *in vivo* [44]. Předpokládá se, že se isoprostany podílejí na různých patologických stavech plic, a proto je jejich monitorování považováno za klinicky významné [25]. Koncentrace 8-IP v EBC

zdravých jedinců se pohybuje v řádech ng/l, avšak vlivem oxidačního stresu mohou být tyto koncentrace mnohonásobně zvýšeny [45]. Leukotrieny se uvolňují (často po kontaktu organismu s alergenem) ze zánětlivých buněk dýchacích cest, stahují jejich hladké svalstvo a zvyšují produkci hlenu. Tyto příznaky jsou relevantní zejména u patofyziologie astmatu [46] a jiných zánětlivých stavů plic [47,48]. Leukotrieny byly v EBC detekovány, avšak u zdravých jedinců ve velmi nízkých koncentracích. Problémem při jejich stanovení je nízká citlivost použitých metod a relativně vysoká variabilita dat. Prostanoidy se podílí na zánětlivých reakcích organismů, přičemž mohou působit zánětlivě či protizánětlivě v závislosti na charakteru zánětlivého podnětu. Význam přítomnosti prostanoidů v EBC doposud není dobře znám, ačkoliv některé druhy prostanoidů jsou bronchokonstriktory a byly detekovány v EBC ve zvýšených koncentracích [25].

Na zánětlivé a protizánětlivé lze v závislosti na jejich roli dělit také cytokiny, což jsou malé proteiny používané k mezibuněčné komunikaci. Jsou významné u akutních a chronických zánětů dýchacích cest, kdy je oxidačním stresem indukována jejich zvýšená produkce. Dalším možným biomarkerem je glutathion (GSH), endogenní antioxidant, který zabraňuje poškození buněk dýchacích cest reaktivními formami kyslíku a radikály. Při tomto procesu se GSH oxiduje na glutathion disulfid (GSSG). Změny v redoxní rovnováze GSH (tj. snížená koncentrace GSH a zvýšená koncentrace GSSG) mohou indikovat přítomnost zánětu. Spolu s pokrokem v proteomice byl zaznamenán také významný pokrok ve screeningu proteinů jakožto potenciálních markerů zánětu plic. Studium proteinových profilů v EBC zdravých a nemocných subjektů trpících onemocněními dýchacích cest se jeví jako klíčový krok pro odhalení možného diagnostického potenciálu. Tento tzv. proteomický fingerprinting by mohl být realizován použitím vysoce účinné separační techniky, jako je např. CE v kombinaci s MS [25].

Zvýšené koncentrace většiny z výše uvedených biomarkerů byly zpozorovány při řadě studií EBC u subjektů trpících astmatem, CHOPN a/nebo CF. Avšak žádný z biomarkerů v EBC nebyl doposud schválen pro diagnostiku chorob a jedná se v současné době pouze o potenciálně klinicky relevantní sloučeniny. K potvrzení jejich možného využití v diagnostice jsou zapotřebí další rozsáhlé studie [25].

2. 4. Analýza EBC pomocí CE

V první práci, ve které byla kapilární elektromigrační metoda použita pro analýzu EBC, Fumagalli a kol. porovnal vzorky EBC zdravých kontrolních subjektů a subjektů trpících rozedmou plic související s deficitem enzymu α1-trypsin. Analýza byla provedena metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie s UV-VIS detekcí při 214 nm. Separace byla realizována v křemenné kapiláře o celkové délce 57 cm, efektivní délce 50 cm a vnitřním průměru 50 μm a základním elektrolytu 20 mM tetraboritanu sodného s 60 mM dodecylsíranem sodným o pH = 6. Výsledky proteomické analýzy odhalily významné rozdíly mezi zdravými a nemocnými subjekty [49].

V článku Kubáně a kol. bylo pomocí CE-C^4D analyzováno EBC z hlediska iontového složení [27]. Pro současnou analýzu kationtů a aniontů byla použita křemenná kapilára o celkové délce 35 cm a vnitřním průměru 50 μm a základní elektrolyt o pH = 6, složený z 20 mM kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES), 20 mM L-histidinu (HIS), 30 μM CTABu a 2 mM dibenzo[18]crown-6 etheru. Byly měřeny koncentrační rozsahy a průměrné koncentrace vybraných kationtů a aniontů. Analýza neodhalila žádnou spojitost iontového složení EBC s věkem, pohlavím či kuřáckými návyky subjektů. U lidí trpících akutním zánětem horních cest dýchacích či mírnou CHOPN byly zaznamenány zvýšené koncentrace dusitanů a v případě CHOPN také zvýšené koncentrace dusičnanů, síranů, chloridů, draslíku a laktátu. Ve studii Greguše a kol. byly za použití stejného CE- C^4D přístupu zjištěny statisticky významné rozdíly v koncentracích několika aniontů (dusičnanů, dusitanů, acetátu a laktátu) mezi zdravými subjekty a pacienty s astmatem, CHOPN, CF a plicní fibrózou [4].

CE pro kvantifikaci GSH v EBC poprvé použila Hodáková a kol., a to ve spojení s citlivým LIF detektorem [50]. Konjugát GSH s fluorescenčním barvivem byl separován v pufru 15 mM 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-1-yl)ethansulfonové kyseliny o pH = 7 a detekován s využitím laseru s excitačním zářením při 515 nm. Metoda se prokázala jako dostatečně citlivá pro stanovení GSH ve vzorku EB ve velmi nízké koncentraci v jednotkách nM. Spojením ostatních detekčních systémů s CE, jako je CE-UV a CE-MS, není v této oblasti doposud věnována velká pozornost, čemuž nasvědčuje absence vědeckých publikací na téma analýzy EBC pomocí těchto metod. V kombinaci s MS detekcí je pro analýzu biomarkerů oxidačního stresu a zánětu dýchacích cest v EBC namísto CE upřednostněno tradiční spojení LC-MS [51].

2. 5. Perspektiva analýzy EBC pomocí CE v diagnostice chorob

Nejatraktivnějším aspektem EBC je možnost jeho opakovaného, rychlého a neinvazivního odběru oproti jiným dnes běžně používaným metodám k získání vzorku ALF, jako je bronchoalveolární laváž [52], bronchoskopie a bronchiální biopsie [53] či indukce sputa [54]. Odběr EBC se jeví jako vhodná alternativa k těmto metodám, které jsou do jisté míry invazivní, nelze je pravidelně opakovat a mohou uměle vyvolat zánět plic. Analýza EBC se nabízí jako jednoduchý způsob screeningování, tj. rozpoznání a monitorování zánětlivých respiračních onemocnění, který může poskytnout vhled do patofyziologie těchto nemocí. Dále může poskytnout cenné komplementární informace k dnes již využívaným diagnostickým metodám, jako je spirometrie, rentgenové vyšetření či počítačová tomografie [25]. Analýza EBC může být potenciálně využita pro monitorování účinků léků, studium jejich mechanismů a hodnocení odezvy organismu na určitou farmakologickou terapii. Různé biomarkery mohou odrážet specifické aspekty zánětu a identifikace selektivních profilů biomarkerů u různých onemocnění může být užitečná pro diferenciální diagnostiku [43]. Analýza EBC se však stále vyvíjí, validuje a hodnotí a doposud nebyly učiněny žádné konečné závěry o jejím využití pro diagnostiku či klasifikaci respiračních onemocnění. Cestou k uplatnění v klinické praxi je potřeba za spolupráce lékařů, klinických výzkumníků a analytických chemiků vyřešit ještě mnoho metodologických problémů, které byly zmíněny v předešlých kapitolách.

Pro analýzu EBC pro diagnostiku chorob pomocí CE lze využít její vysokou rychlost a účinnost separace. Z hlediska potřebného množství vzorku pro analýzu je CE ideální v případě vzorků biologických, které bývají k dispozici v omezeném množství. V rámci diagnostiky chorob nelze přehlédnout další významnou výhodu CE, a to její přenositelnost oproti konkurenční vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Spojení jednoduchého odběrného zařízení EBC s rychlou CE analýzou a miniaturizovaným detektorem (např. C^4D) představuje velmi atraktivní příležitost pro konstrukci přenosného diagnostického přístroje, který by mohl být použit přímo na místě potřeby. Takový elektroforetický přístroj s bezkontaktní vodivostní detekcí pro analýzu malých objemů biologických tekutin včetně EBC byl zkonstruován Gregušem a kol [55]. Jeho využitelnost v praxi byla prokázána na analýze vzorku EBC odebraného prostřednictvím on-line spojeného odběrného zařízení.

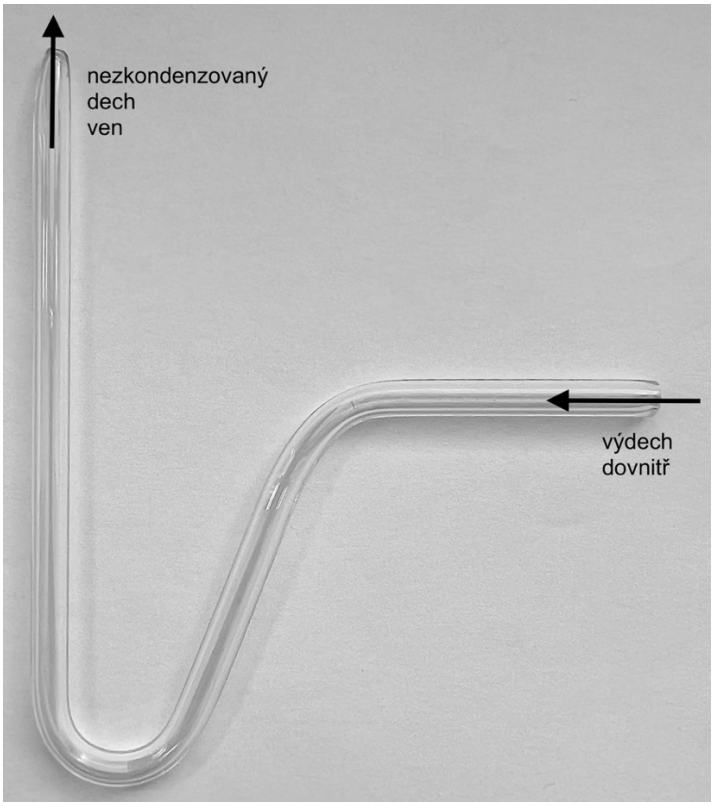
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. 1. Odběr EBC

Před pokusem o sestrojení vlastního odběrného zařízení byla zprvu provedená rešerše o různých řešeních odběru EBC a konstrukcích odběrných zařízení ve vědeckých publikacích.

3. 1. 1. Prvotní návrh odběrného zařízení

Prvotním záměrem bylo zkonstruovat odběrné zařízení ze skleněné trubičky, která byla nahřáta v plamenu a ohnuta do specifického tvaru (Obr. 12). Takto vytvarované skleněné trubičky byly přes noc namočeny do methanolu, vysušeny proudem dusíku a následně uschovány v lednici při teplotě cca 5 °C po dobu několika hodin. Do vychlazené skleněné trubičky byl následně vydechován dech a díky nízké teplotě dech zkondenzoval na jejích stěnách (Obr. 13). Kondenzát však vlivem povrchového napětí ulpíval na stěnách trubičky a z důvodu nedostatečného nashromážděného množství se ho nepodařilo pomocí gravitace ani proudění vzduchu z trubičky získat. Bylo proto zapotřebí vyzkoušet jiný koncept odběrného zařízení.



Obr. 12: Prvotní návrh odběrného zařízení EBC ve formě skleněné trubičky

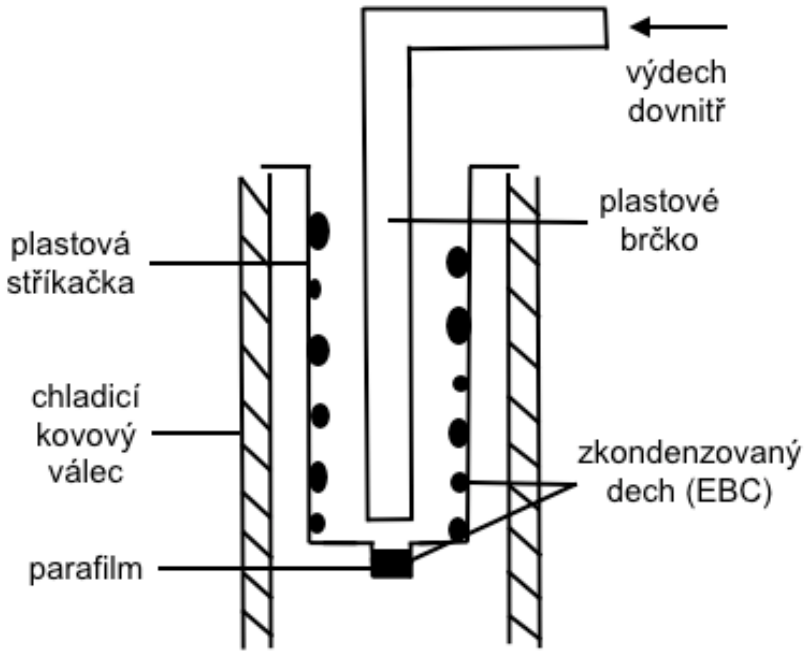
Obr. 13: Zkondenzovaný dech ve skleněné trubičce

3. 1. 2. Provedení odběru EBC

Konstrukce dalšího odběrného zařízení byla inspirována odběrným zařízením Greguše a kol. [4], které bylo popsáno dříve v této práci. Podobné zařízení bylo sestaveno z kovového dutého válce (konkrétně oboustranného šestihranného klíče určeného pro (de)montáž přístroje kapilární elektroforézy; delší strana 14 cm, kratší strana 4,5 cm, vnitřní průměr 1,5 cm), plastové 3 ml injekční stříkačky Omnifix (B. Braun) a plastového brčka o délce 21 cm a vnitřním průměru 5 mm (Wimex) (Obr. 14). Kovový válec a stříkačky byly před odběrem uschovávány v mrazáku při teplotě cca -15 °C. Ze stříkačky byl vytažen píst a její špička byla obalena parafilmem proti úniku vzorku. Do vychlazeného válce pak byla vložena stříkačka, dovnitř stříkačky byl dech vydechován pomocí plastového brčka a na stěnách stříkačky došlo ke kondenzaci dechu a vzniku EBC (Obr. 15-17).

Svůj vzorek EBC pro účely této diplomové práce poskytlo 8 zdravých dobrovolníků ve věku 20-70 let, čtyři ženy a čtyři muži, nekuřáci. Tito dobrovolníci se měli opakovaně hluboce nadechnout a vydechnout do brčka po co nejdelší dobu až do chvíle, kdy byla teplota chladicího válce již příliš vysoká na to, aby se dech dále kondenzoval. Tímto způsobem se podařilo odebrat vzorky EBC o objemu průměrně 0,15 ml, který byl zcela dostatečný pro následnou opakovanou CE analýzu. Z konce stříkačky byl odstraněn parafilm a veškerý zkondenzovaný dech byl opatrně pomocí pístu setřen ze stěn stříkačky do mikrozkumavky typu Eppendorf s těsnícím uzávěrem (Obr. 18-19). Veškeré úkony od vyjmutí válce z mrazáku až po úspěšné odebrání EBC byly provedeny v co nejkratším čase tak, aby bylo minimalizováno zvýšení teploty chladicího válce vlivem okolního prostředí. Zařízení je sice zcela přenositelné, pro maximální účinnost odběru je však potřeba odběr dechu uskutečnit v blízkosti mrazáku, ve kterém je chladicí válec předem chlazen. Popřípadě by bylo možné tuto část zařízení přenést na jiné místo za pomocí chladicího média. Jednotlivé zkumavky se vzorky EBC byly označeny a bezprostředně po odběru až do analýzy uskladněny v mrazáku při teplotě cca -15 °C. Celý proces odběru EBC trval pouze několik minut.

Obr. 14: Komponenty odběrného zařízení: kovový válec, plastová stříkačka obalena parafilmem a plastové brčko



Obr. 15: Grafické znázornění odběrného zařízení EBC

Obr. 16: Fotodokumentace odběru dechu

Obr. 17: Zkondenzovaný dech na stěnách stříkačky

Obr. 18: Přesun vzorku EBC do mikrozkumavky

Obr. 19: Odebraný vzorek EBC v mikrozkumavce

3. 2. Parametry elektroforetických experimentů

Elektroforetické separace byly provedeny na přístroji kapilární elektroforézy Capillary Electrophoresis 7100 (Agilent Technologies). Pro separaci byla použita křemenná kapilára (Polymicro Technologies) s vnitřním průměrem 50 μm, celkovou délkou 33,5 cm a efektivní délkou 25 cm. Ze zdroje vysokého napětí bylo na kapiláru aplikováno separační napětí ±10-20 kV. Kapilára byla vždy před prvním použitím promyta 0,1 M NaOH po dobu 10 min, DI vodou po dobu 10 min a separačním elektrolytem po dobu 10 min. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývána 0,1 M NaOH po dobu 2 min (u CE-MS po dobu 5 s), DI vodou po dobu 2 min a separačním elektrolytem po dobu 2-3 min. Na konci měření byly kapilára promyta DI vodou po dobu 10 min. Vzorky EBC byly do kapiláry dávkovány hydrodynamicky tlakem o 50-100 mbar po dobu 10 s. Všechny experimenty byly provedeny při laboratorní teplotě 25 °C.

Pro následnou analýzu byly použity dva detekční systémy. Jako první byla pro experimenty použita UV detekce při 210 nm. Druhým detekčním systémem byl hmotnostní spektrometr Triple Quad LC/MS 6460 (Agilent Technologies) s ESI a trojitým kvadrupólovým analyzátorem. Jako pomocná kapalina byl využit roztok methanolu a vody, 1:1 (v/v), který byl do elektrospreje přiváděn vysokotlakým čerpadlem Infinity 1260 (Agilent Technologies) o průtoku 1 ml/min a dělen děličem toku v poměru 1:100. Podmínky

analýzy hmotnostním spektrometrem byly předběžně optimalizovány (k dosažení stabilního elektrospreje) a nastaveny na následující hodnoty: napětí na elektrospreji ±4,0 kV (dle polarity analyzovaných látek), teplota zmlžovacího plynu 300 °C, průtok zmlžovacího plynu 5 l/min, tlak zmlžovacího plynu 15 psi, napětí na fragmentoru 135 V, průtok pomocné kapaliny 1,0 µl/min. Měření probíhalo ve skenovacím módu, kdy byla sbírána spektra od *m/z* 100 po *m/z* 500.

3. 3. Chemikálie

K přípravě roztoků byly použity chemikálie v čistotě p.a., pro CE-MS měření byla navíc použita voda v čistotě LC-MS (Sigma-Aldrich).

3. 3. 1. Základní elektrolyty a standardy

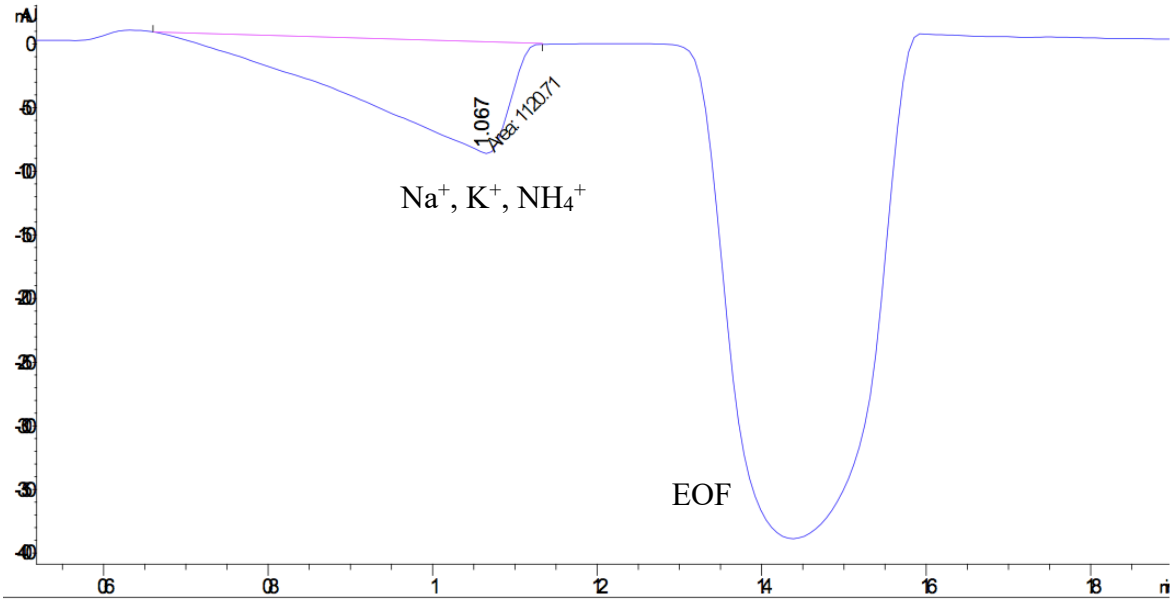
Pro analýzu iontů pomocí CE-UV byl použit pufr 20 mM MES/HIS o pH = 6 s přídavkem 2 mM dibenzo[18]crown-6 etheru a 30 µM CTAB. Byly připraveny standardy kationtů Na^+, K^+ a NH_4^+ jako 0,1 M roztoky NaCl, NH_4Cl a KCl a standardy aniontů Cl^- a NO_3^- jako 0,1 M roztoky NaCl a $NaNO_3$. Tyto standardní roztoky byly dále ředěny pro vlastní analýzu. Pro měření CE-MS byla použita jako základní elektrolyt 50 mM HCOOH o pH = 2,5 a 50 mM CH_3COOH/NH_3 o pH = 9,2.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

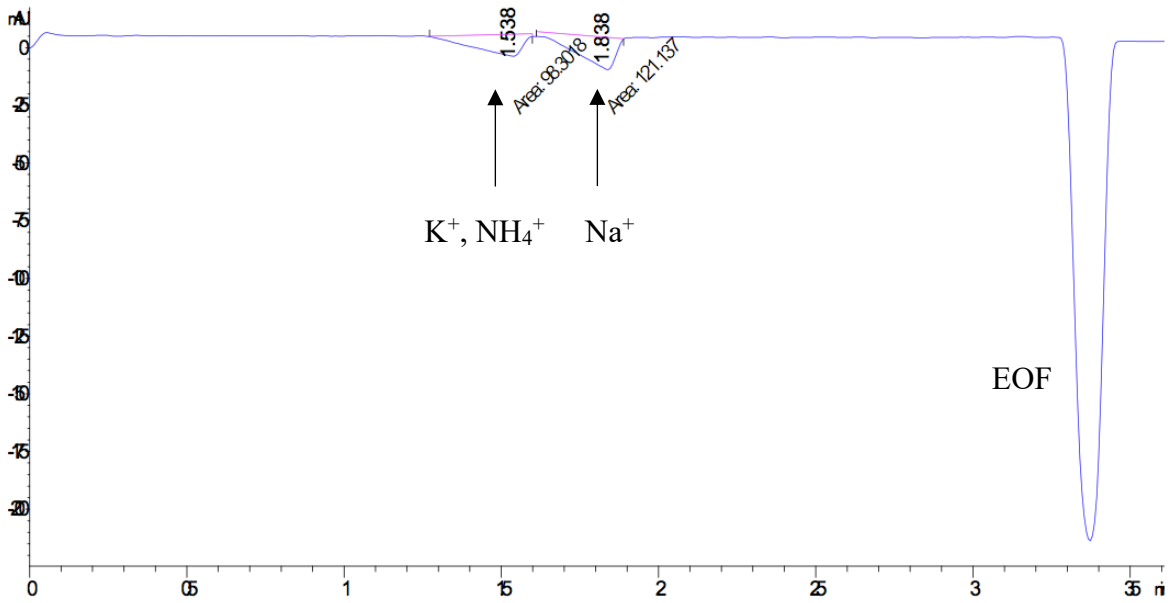
4. 1. CE-UV analýza

4.1.1. Analýza standardů iontů

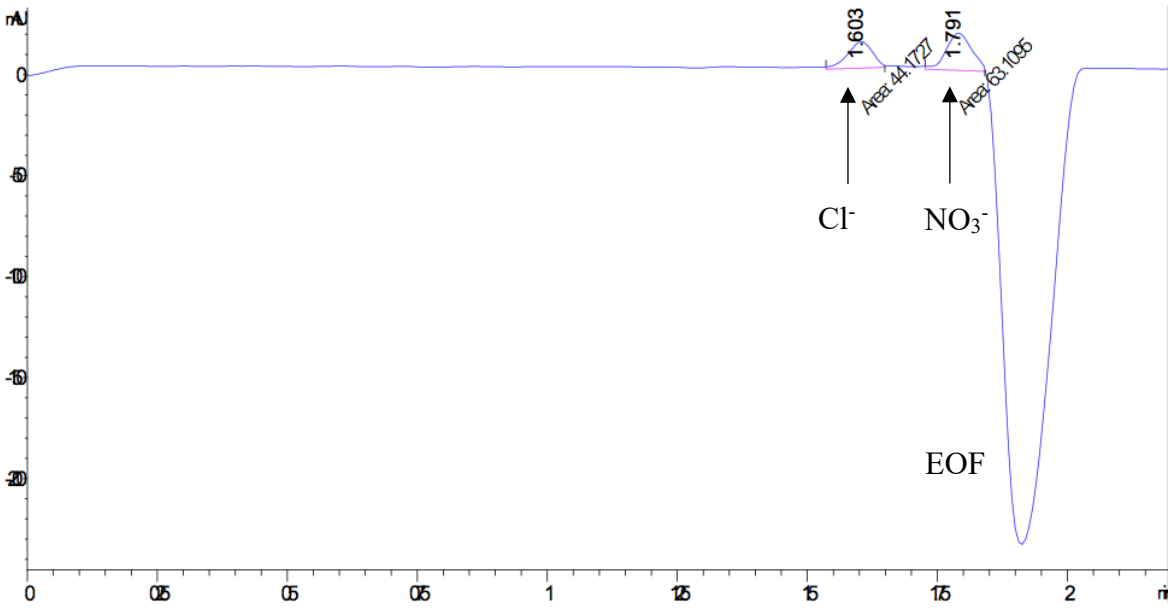
Nejprve byla metodou CE-UV byla proměřena směs standardů kationtů Na^+, K^+ a NH_4^+. Cílem analýzy, která proběhla za použití kladného napětí a pufru 10 mM MES/HIS při pH = 6, byla kvalitativní analýza kationtů. Na elektroferogramu (Obr. 19) z prvního pokusu o separaci lze vidět eluci všech tří kationtů v jednom píku, což mohlo být zapříčiněno jejich příliš vysokou koncentrací. Po zředění kationtů se podařilo oddělit Na^+ ionty od ostatních, což je pro pilotní charakterizaci EBC důležitý faktor. (Obr. 20). Dále byla provedena analýza směsi aniontů Cl^- a NO_3^- v pufru 10 mM MES/HIS při pH = 6 s přídavkem 10 mM CTAB za použití negativního napětí. CTAB byl použit pro obrácení směru EOF a umožnění rychlejší analýzy aniontů. Ve výsledném elektroferogramu lze zpozorovat, že došlo separaci standardů aniontů na dva samostatné píky (Obr. 21).



Obr. 19: Elektroferogram analýzy 0,01 M standardů kationtů Na^+, K^+ a NH_4^+



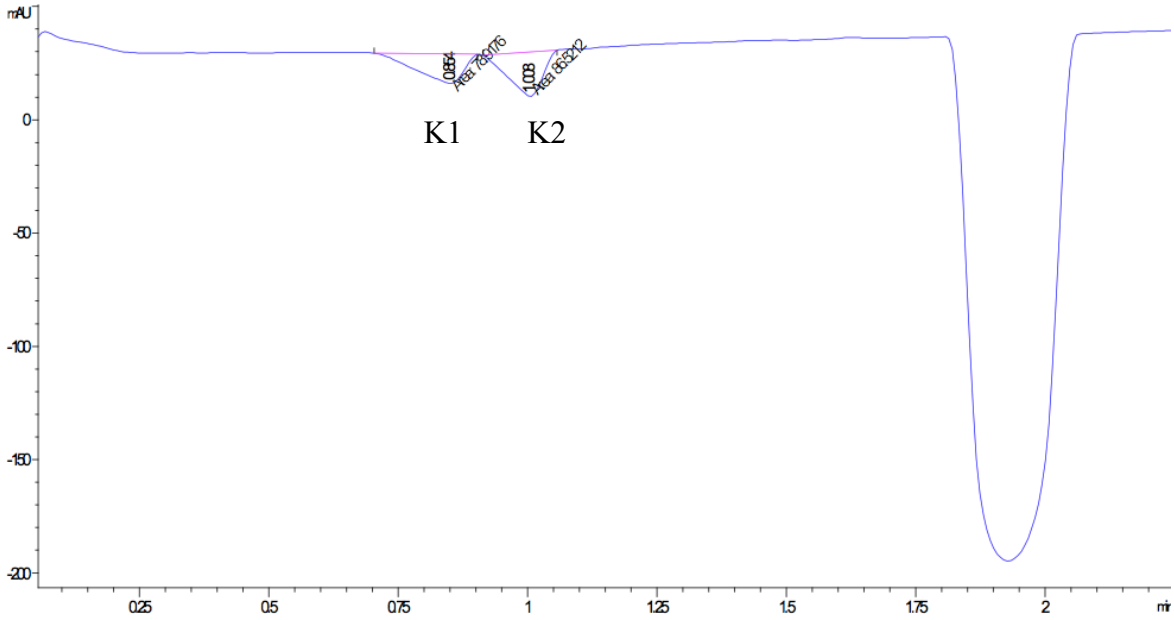
Obr. 20: Elektroferogram analýzy 0,001 M standardů kationtů Na^+, K^+ a NH_4^+



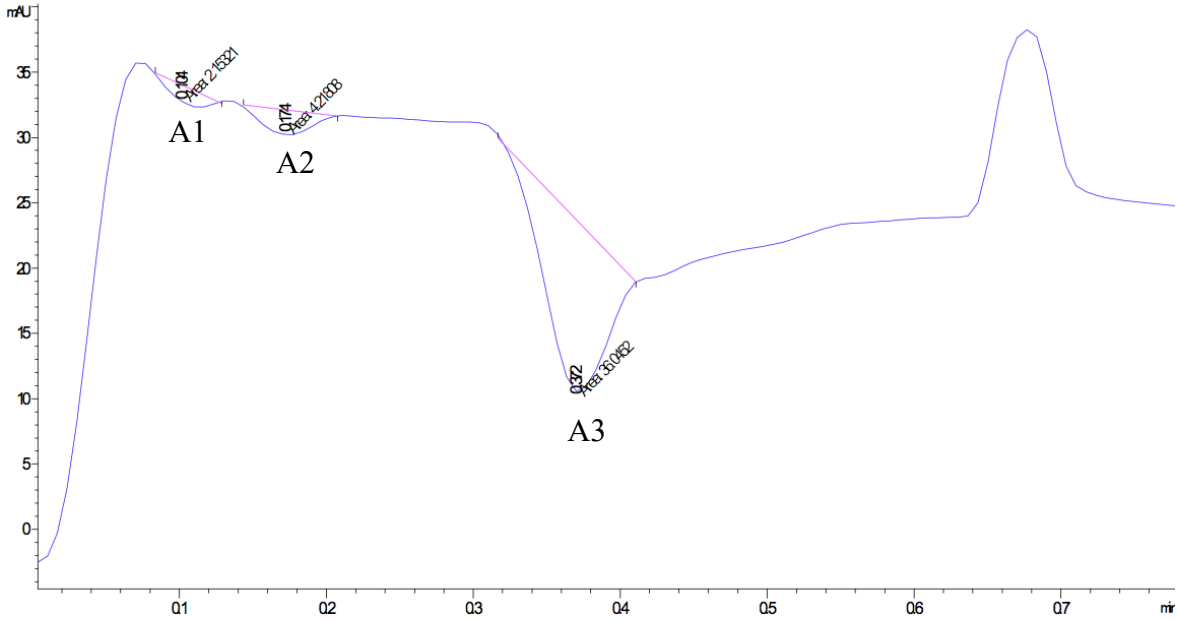
Obr. 21: Elektroferogram analýzy 0,001 M standardů aniontů Cl^- a NO_3^-

4. 1. 2. Analýza vzorků EBC

V dalším bodě této studie byla provedena analýza vzorků EBC. Jako elektrolyt byl použit pufr 20 mM MES/HIS o pH = 6 s přídavkem 2 mM dibenzo[18]crown-6 etheru a 30 μM CTAB, který byl navržen pro podobné analýzy skupinou doc. Kubáně z Brna. Oddělená analýza aniontů a kationtů ve vzorcích EBC byla uskutečněna pouze za změny polarity separačního napětí. Při analýze kationtů za pozitivního napětí byly ve výsledných elektroferogramech všech vzorků EBC zaznamenány dva píky (Obr. 22) a při analýze aniontů za negativního napětí tři píky (Obr. 23). Dle provedených studií iontového obsahu EBC pomocí CE-C^4D [4,27,56] by zaznamenané dva píky kationtů mohly potenciálně představovat dvě skupiny spolu eluujících kationtů, a to o NH_4^+ a K^+ eluující v píku K1 a Ca^{2+}, Na^+ a příp. i Mg^{2+} eluující v píku K2. Tři píky aniontů představují pravděpodobně Cl^- v píku A1, NO_3^- v píku A2 a v posledním píku A3 by mohly společně eluovat anionty organických kyselin, jako je acetát, laktát, propionát a butyrát, a dále také fosfát. Cílem této práce nicméně nebylo zjistit přesné složení EBC, ale pouze prokázat, že je možné v podmínkách laboratoře provést analýzu EBC pomocí vyvinutého zařízení pro odběr vzorku.



Obr. 22: Ukázka elektroferogramu z analýzy kationtů ve vzorku EBC 1



Obr. 23: Ukázka elektroferogramu z analýzy aniontů ve vzorku EBC 1

Dále byly provedeny analýzy vzorků EBC získané od dobrovolníků. Byly porovnávány plochy jednotlivých píků. Migrační časy píků se lišily zanedbatelně, takže nebylo nutné provést korekci plochy píku na migrační čas. Výsledky jsou uvedeny níže v Tab. I, II.

Tab. I: Plochy píků kationtů

Vzorek	**Plocha píku K1**		**Plocha píku K2**	
	průměr	SD	průměr	SD
1	73,45	7,7	109,30	32,2
2	59,30	7,9	93,25	9,3
3	5,65	0,4	95,65	8,1
4	23,25	0,4	68,80	13,3
5	16,30	0,3	212,75	20,6
6	9,30	1,6	119,75	27,1
7	14,85	1,5	150,25	8,8
8	10,20	0,6	133,70	6,4

Tab. II: Plochy píků aniontů

Vzorek	Plocha píku A1		Plocha píku A2		Plocha píku A3	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
1	2,20	0,0	5,05	1,2	38,35	3,3
2	3,20	0,3	4,60	0,1	52,15	21,6
3	5,35	1,6	2,70	0,3	65,95	5,2
4	6,50	0,3	2,85	0,9	66,15	0,5
5	6,95	0,4	2,60	0,6	69,70	11,5
6	1,40	0,0	5,50	0,0	72,50	0,0
7	2,90	0,0	4,10	0,0	97,40	0,0
8	2,60	0,0	3,40	0,0	96,80	0,0

Z výsledků je vidět poměrně značná biologická variabilita dat. Lze se pokusit srovnat poměry ploch píků jak kationtů, tak aniontů, viz Tab. III. I z těchto dat je patrná poměrně značná variabilita, která je zřejmě částečně způsobená tím, že se jedná o vzorky osob různého pohlaví, v rozdílné věkové struktuře s různým klinickým obrazem (Tab. IV).

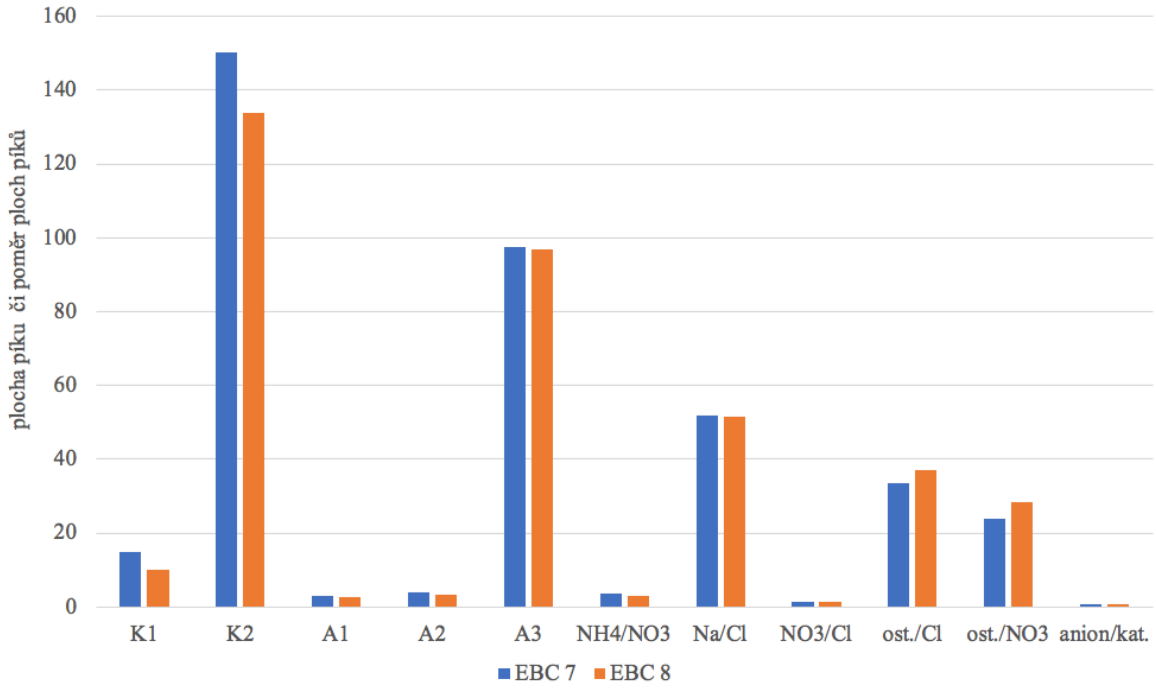
Tab. III: Poměry ploch píků iontů

Vzorek	NH_4^+/NO_3^-	Na^+/Cl^-	NO_3^-/Cl^-	ostatní/Cl^-	ostatní/NO_3^-	aniont/kationt
1	14,54	49,68	2,30	17,43	7,59	0,25
2	12,89	29,14	1,44	16,30	11,34	0,39
3	2,09	17,88	0,50	12,33	24,43	0,73
4	8,16	10,58	0,44	10,18	23,21	0,82
5	6,27	30,61	0,37	10,03	26,81	0,35
6	1,69	85,54	3,93	51,79	13,18	0,62
7	3,62	51,81	1,41	33,59	23,76	0,63
8	3,00	51,42	1,31	37,23	28,47	0,71

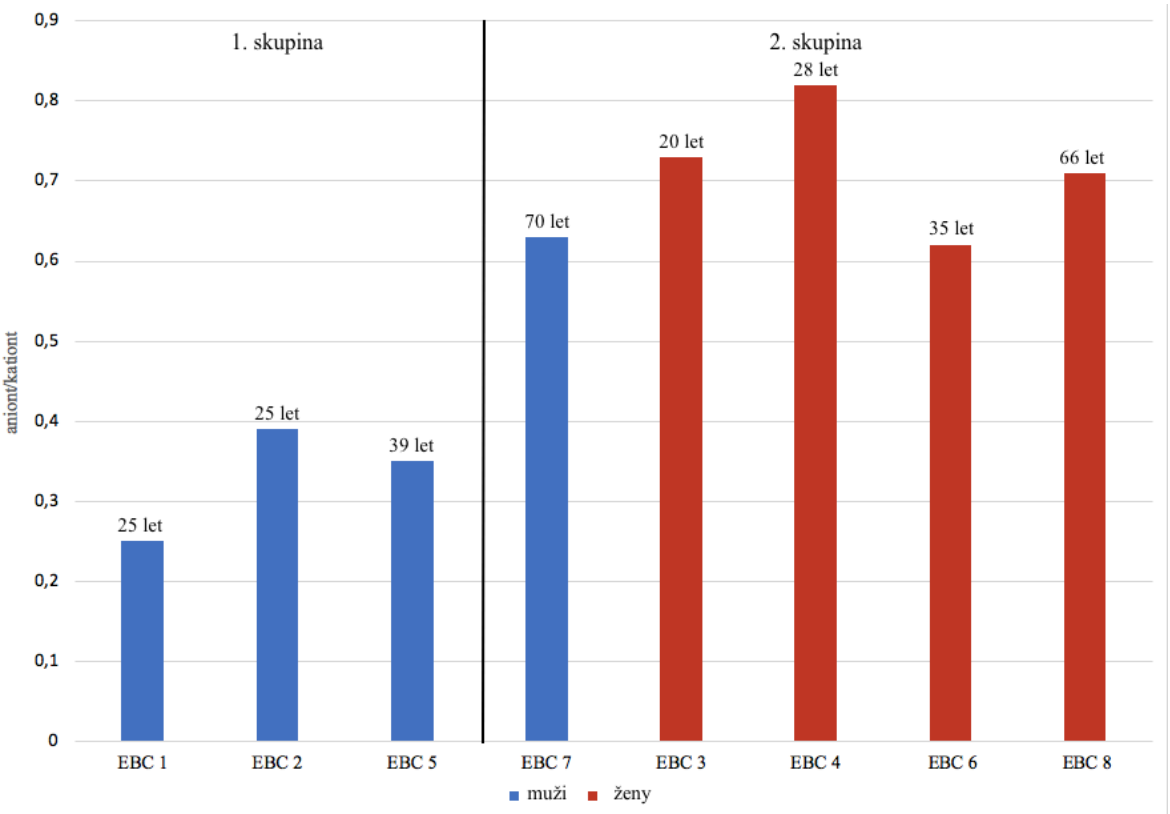
Tab: IV: Pohlaví a věk dobrovolníků

Vzorek	Pohlaví	Věk
1	muž	25
2	muž	25
3	žena	20
4	žena	28
5	muž	39
6	žena	35
7	muž	70
8	žena	66

Zajímavou skutečnost představují velmi podobné výsledky analýzy kationtů, aniontů i porovnání poměrů iontů u subjektů se vzorky 7 a 8 (Obr. 24), kteří se ze všech dobrovolníků vyjímají svým vyšším věkem. Dále lze pozorovat podobný poměr NH_4^+/NO_3^- u vzorků 1 a 2, které poskytli dva muži stejného věku. Na základě blízkosti hodnot celkového poměru aniontů/kationtů lze až na jednu výjimku rozdělit subjekty dle pohlaví. Do první skupiny spadají vzorky (1, 2 a 5) mužů a do druhé skupiny vzorky (3, 4, 6, 7, 8) žen a jednoho muže (Obr. 25), jehož odlišení od ostatních mužů by mohlo být odůvodněno velkým věkovým rozdílem. Téměř ve všech poměrech iontů se od ostatních značně lišil vzorek 6, což by potenciálně mohlo poukazovat na odlišný fyziologický stav dané osoby. Ke všem výše popisovaným skutečnostem je třeba dodat, že se jedná pouze o dohady, které nelze považovat za kvalifikované závěry pro klinickou praxi. Nicméně obecně lze tvrdit, že kapilární elektroforéza umožňuje analýzu EBC a výsledky mohou být zajímavé pro klinickou praxi.



Obr. 24: Podobnost hodnot ploch či poměrů ploch píků iontů u vzorků EBC 7 a 8

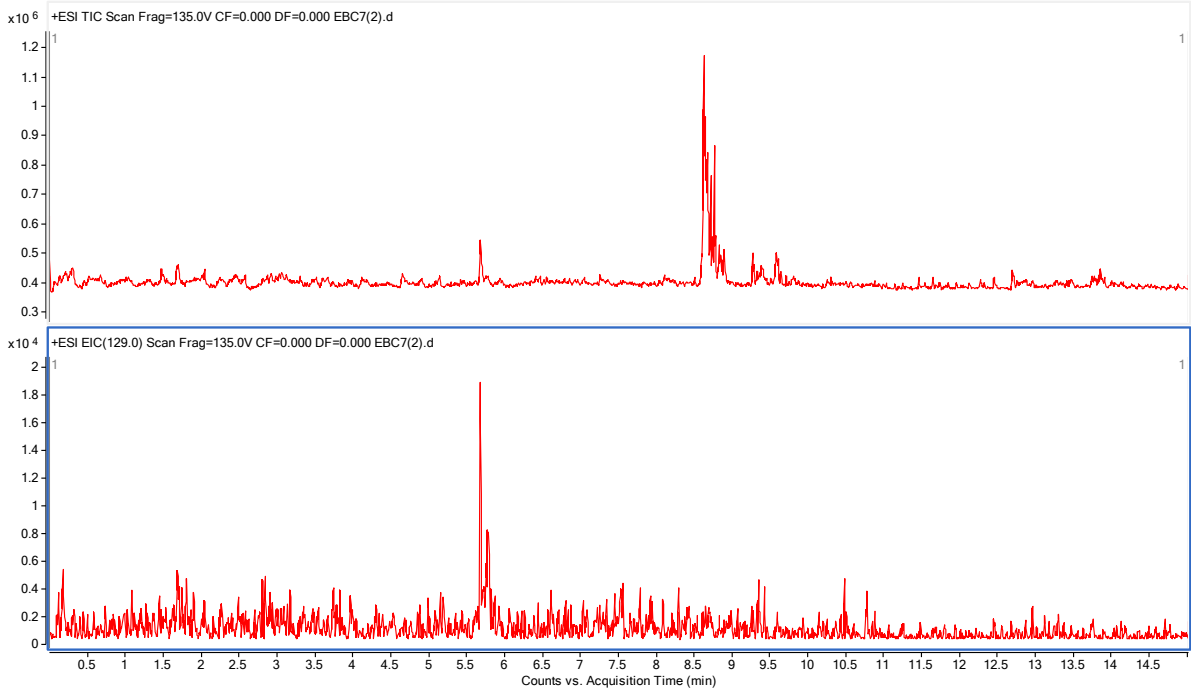


Obr. 25: Grafické znázornění poměrů kationtů/aniontů u všech vzorků EBC

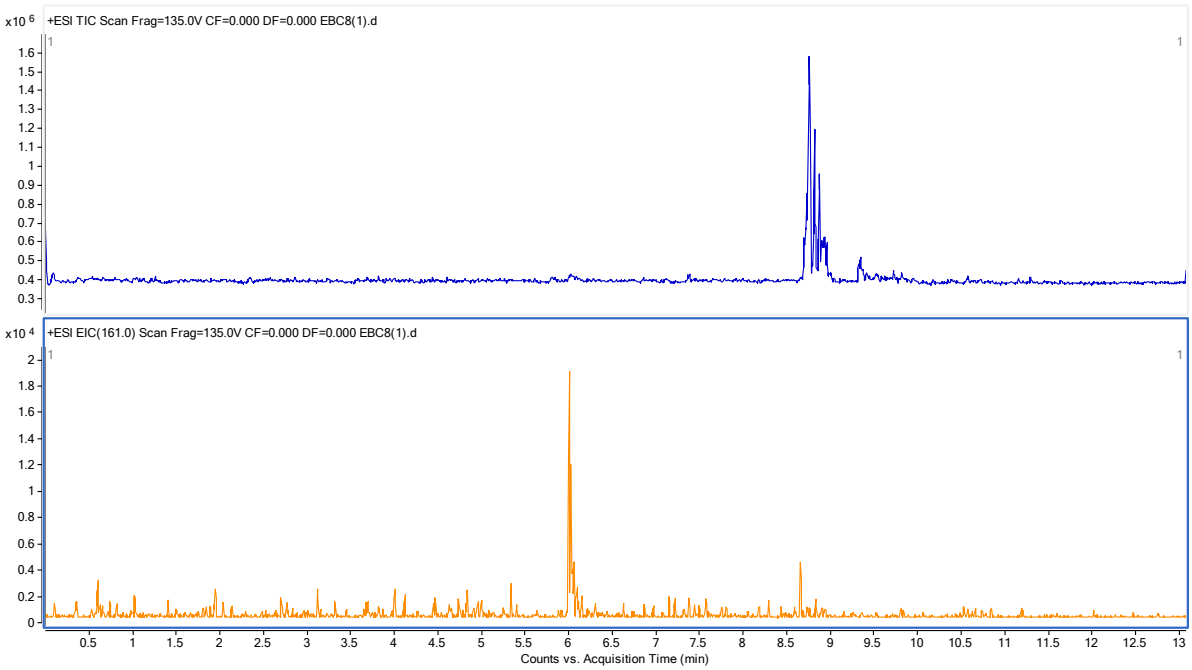
4. 2. CE-MS analýza

Jako další v pořadí byly provedeny analýzy pomocí CE-MS. Pro separaci kationtů byl vybrán elektrolyt 50 mM HCOOH o pH = 2,5, pro separaci aniontů pak 50 mM CH_3COOH/NH_3 o pH = 9,2. Měření probíhalo ve skenovacím módu, aby byla sbírána MS spektra v každém čase. Cílem tohoto měření bylo zjistit, zdali je možné provést CE-MS analýzu EBC odebranou výše uvedeným způsobem a zdali bude v budoucnu možné přistoupit k hledání konkrétních látek pomocí specifických SRM přechodů.

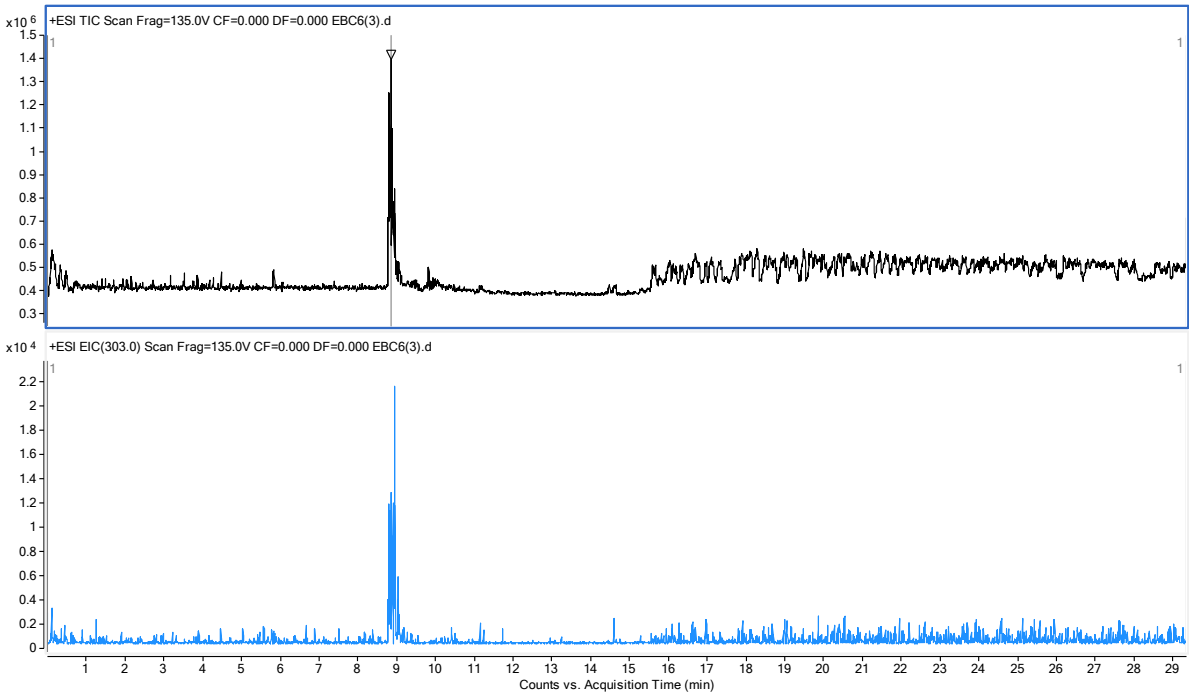
V rámci provedených měření byly nalezeny opakovaně hodnoty *m/z* 110, 129, 156, 161, 178, 196, 227, 229, 255, 257, 282, 303 a 390. Jejich interpretace je nicméně velmi složitá, protože nebyl použit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením. Z pohledu potenciálně obsažených látek by bylo možné usuzovat, že v EBC vzorcích se vyskytovaly aminokyseliny a derivatizované aminokyseliny, např. nitrotyrosin (*m/z* 227), steroly a steroidní látky (*m/z* 129), terpenoidní látky (*m/z* 161), alkylestery, případně flavonoidy a sfingomyeliny (*m/z* 303). Na Obr. 26-28 jsou uvedeny ukázky analýz vzorků EBC s extrahovanými iontovými chromatogramy (EIC) pro *m/z* 129, *m/z* 161 a *m/z* 303. Obecně lze tedy tvrdit, že CE-MS umožňuje analýzu EBC a lze ji takto využít pro analýzu různých iontových látek (po další optimalizaci podmínek ionizace a separace již vztažené přímo k molekulám, které budou analyzovány).



Obr. 26: Ukázka analýzy vzorku EBC 7, EIC pro *m/z* 129



Obr. 27: Ukázka analýzy vzorku EBC 8, EIC pro *m/z* 161



Obr. 28: Ukázka analýzy vzorku EBC 6, EIC pro *m/z* 303

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se obecně zabývá analýzou kondenzátu dechu metodou kapilární elektroforézy. V rámci teoretické části byla vypracována stručná literární rešerše o historii a základních principech kapilární elektroforézy, její instrumentaci a způsobech detekce. Dále teoretická část pojednává o historii a současnosti analýzy dechu obecně, a především o kondenzátu dechu, jeho složení, metodologických aspektech analýzy a odběru, obsahu biomarkerů dýchacích onemocnění, analýze EBC pomocí kapilární elektroforézy a jejím potenciálu v oblasti diagnostiky chorob.

Praktická část práce byla zaměřena na odběr vzorku EBC prostřednictvím vlastního odběrného zařízení a následnou analýzu EBC metodami CE-UV a CE-MS. Bylo vyvinuto jednoduché, finančně nenáročné a přenositelné odběrné zařízení složené z běžně dostupných komponent (kovového válce, plastové stříkačky a brčka), pomocí kterého bylo možno uskutečnit odběr EBC nejen v podmínkách laboratoře, ale i domova. Za použití tohoto zařízení byly pro účely diplomové práce odebrány vzorky EBC osmi dobrovolníků ve věkovém rozsahu 20-70 let. Průměrný objem odebraného vzorku činil 0,15 ml. Celý proces odběru byl snadno proveditelný a trval pouze několik minut.

Následně byla provedena analýza všech získaných vzorků EBC. Při CE-UV analýze EBC byly zaznamenány dva píky kationtů a tři píky aniontů, přičemž byly učiněny odhady, o jaké ionty by se mohlo konkrétně jednat. Dále byly z hlediska iontového složení mezi sebou porovnány vzorky EBC na základě ploch jednotlivých píků iontů a jejich poměrů. V závěru CE-UV analýzy byly vyzdvihnuty některé možné souvislosti mezi zjištěným iontovým obsahem EBC a věkem a/nebo pohlavím subjektů.

Poslední částí experimentální studie byla analýza vzorků EBC pomocí CE-MS. Ve výsledných spektrech byly opakovaně nalezeny určité hodnoty *m/z* a k některým z nich se autorka pokusila přiřadit skupiny látek, které by bylo možné v EBC detekovat. Cílem této práce však nebylo determinovat přesné složení EBC, nýbrž prokázat, že je možné provést jeho analýzu za použití vyvinutého odběrného zařízení a daných metod. O analýze EBC pomocí metod CE-UV a CE-MS, alespoň pokud je autorce známo, doposud neexistuje žádná vědecká publikace, a proto skutečnost, zdali opravdu lze těmito metodami EBC analyzovat, lze považovat za přínosnou informaci v dané oblasti výzkumu.

Seznam použité literatury

[1] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, seventh ed., Cengage Learning, 2017.

[2] H. H. Lauer, G. P. Rozing (ed.), High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer, second ed., Agilent Technologies, Germany 2014.

[3] K. Štulík a kol., Analytické separační metody, první vyd., Karolinum, Praha 2004.

[4] M. Greguš *et al.*, Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, J. Breath Res. 9 (2015) 1-10.

[5] P. Musil, Vývoj metody pro derivatizaci aminokyselin v online uspořádání s využitím kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí, bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Brno 2015.

[6] J. Lehotay, Separačné metódy v analytickej chémii, první vyd., Slovenská technická univerzita, Bratislava 2009.

[7] D. R. Baker, Capillary Electrophoresis, Wiley-Interscience, New York 1995.

[8] A. J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, G. K. Bonn, Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis, Anal. Chem. 70 (1998) 563-567.

[9] R. D. Smith, J. A. Olivares, N. T. Nguyen, H. R. Udseth, Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface, Anal. Chem. 60 (1988) 436-441.

[10] Hippocrates, The Corpus: The Hippocratic Writings (Kaplan Classics of Medicine), Kaplan Publishing, New York 2008.

[11] A.-L. Lavoisier, Ouvres de Lavoisier, vol. II, Imprimerie impériale, Paris 1862.

[12] F. E. Anstie, Final experiments on the elimination of alcohol from the body, Practitioner 13 (1874) 15-28.

[13] A. Nebethau, Zentr. inn. Med. 18 (1897) 977.

[14] E. Bogen, The diagnosis of drunkenness – a quantitative study of acute alcoholic intoxication, Cal. West. Med. 26 (1927) 778-783.

[15] W. D. McNally, Popular Science (1927) 56.

[16] R. N. Harger, US Patent no. 2,062,785 (1936).

[17] L. Pauling, A. B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68 (1971) 2374-2376.

[18] P. E. Silkoff *et al.*, The Aerocrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by the US Food and Drug Administration for monitoring therapy in asthma, J. Allergy Clin. Immunol. 114 (2004) 1241-1256.

[19] M. Westhoff *et al.*, Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: results of a pilot study, Thorax 64 (2009) 744-748.

[20] W. Vautz, J. Nolte, R. Fobbe, J. I. Baumbach, Breath analysis-performance and potential of ion mobility spectrometry, J. Breath Res. 3 (2009) 1-8.

[21] M. Storer, J. Dummer, S. Sturney, M. Epton, Validating SIFT-MS Analysis of Volatiles in Breath, Curr. Anal. Chem. 9 (2013) 576-583.

[22] P. Španěl, D. Smith, Quantification of volatile metabolites in exhaled breath by selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS, Clin. Mass Spectrom. 16 (2020) 18-24.

[23] M. Phillips *et al.*, Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath, Tuberculosis 87 (2007) 44-52.

[24] F. Monedeiro *et al.*, Needle Trap Device-GC-MS for Characterization of Lung Diseases Based on Breath VOC Profiles, Molecules 26 (2021) 1-19.

[25] P. Kubáň, F. Foret, Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review, Anal. Chim. Acta 805 (2013) 1-18.

[26] G. I. Sidorenko, E. I. Zborovskii, D. I. Levina, Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function), Ter. Arkh., 52 (1980) 65-68.

[27] P. Kubáň, E.-G. Kobrin, M. Kaljurand, Capillary electrophoresis – A new tool for ionic analysis of exhaled breath condensate, J. Chromatogr. A, 1267 (2012) 239-245.

[28] P. Kubáň, M. Dvořák, P. Kubáň, Capillary electrophoresis of small ions and molecules in less conventional human body fluid samples: A review, Anal. Chim. Acta 1075 (2019) 1-26.

[29] J. Hunt, Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease, J. Allergy Clin. Immunol. 110 (2002) 28-34.

[30] P. Reinhold, J. Jaeger, C. Schroeder, Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate, Biomarkers, 11 (2006) 118-142.

[31] P. Reinhold, H. Knobloch, Exhaled breath condensate: lessons learned from veterinary medicine, J. Breath Res. 4 (2009) 1-15.

[32] P. Rosias, Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis, J. Breath Res. 6 (2012) 1-13.

[33] J. Hunt, Exhaled breath condensate: an overview, Immunol. Allergy Clin. North Am. 27 (2007) 587-596.

[34] A.-C. Almstrand *et al.*, Effect of airway opening on production of exhaled particles., J. Appl. Physiol. 108 (2010) 584-588.

[35] P. Montuschi, P. J. Barnes, Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation, Trends Pharmacol. Sci. 23 (2002) 232-237.

[36] L. E. Gustafsson *et al.*, Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1991) 852-857.

[37] L. M. van den Toorn *et al.*, Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164 (2001) 2107-2113.

[38] J. Hunt, R. E. Byrns, L. J. Ignarro, B. Gaston, Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma, Lancet 346 (1995) 1235-1236.

[39] K. Ganas *et al.*, Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma, Respir. Med. 95 (2001) 649-654.

[40] M. Corradi *et al.*, Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163 (2001) 854-858.

[41] S. Cunningham *et al.*, Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis, Eur. Respir. J. 15 (2000) 955-957.

[42] R. A. Dweik *et al.*, An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 184 (2011) 602-615.

[43] P. Montuschi, Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications, Ther. Adv. Respir. Dis., 1 (2007) 5-23.

[44] G. L. Milne, E. S. Musiek, J. D. Morrow, F_2-Isoprostanes as markers of oxidative stress *in vivo*: An overview, Biomarkers 10 (2005) 10-23.

[45] I. Horváth *et al.*, Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions, Eur. Respir. J. 26 (2005) 523-548.

[46] P. Montuschi, Leukotrienes, antileukotrienes and asthma, Mini Rev. Med. Chem. 8 (2008) 647-656.

[47] B. R. O'Driscoll, A. B. Kay, Leukotrienes and lung disease, Thorax 37 (1982) 241-245.

[48] R. M. McMillan, Leukotrienes in respiratory disease, Paediatr. Respir. Rev. 2 (2001) 238-244.

[49] M. Fumagalli *et al.*, Proteomic analysis of exhaled breath condensate from single patients with pulmonary emphysema associated to alpha1-antitrypsin deficiency, J. Proteomics 71 (2008) 211-221.

[50] J. Hodáková, J. Preisler, F. Foret, P. Kubáň, Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515 nm) laser-induced fluorescence detection, J. Chromatogr. A 1391 (2015) 102-108.

[51] P. Iadarola *et al.*, Recent applications of CE- and HPLC-MS in the analysis of human fluids, Electrophoresis 37 (2016) 212-230.

[52] H. Y. Reynolds, Bronchoalveolar lavage, Am. Rev. Respir. Dis. 135 (1987) 250-263.

[53] P. K. Jeffery, A. Laitinen, P. Venge, Biopsy markers of airway inflammation and remodelling, Respir. Med. 94 (2000) 9-15.

[54] P. L. Paggiaro *et al.*, Sputum induction, Eur. Respir. J. Suppl. 37 (2002) 3s-8s.

[55] M. Greguš, F. Foret, P. Kubáň, Portable capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection for on-site analysis of small volumes of biological fluids, J. Chromatogr. A, 1427 (2016) 177-185.

[56] M. Greguš, F. Foret, P. Kubáň, Single-breath analysis using a novel simple sampler and capillary electrophoresis with contactless conductometric detection, Electrophoresis 36 (2015) 526-533.