

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Chromatografické metody pro stanovení metabolitů značených
stabilními izotopy a jejich aplikace v klinickém výzkumu**

Bakalářská práce

autor: Jana Žabokrtská

vedoucí práce: RNDr. Alena Tichá, PhD.

Datum odevzdání: 7.5.2009

ABSTRAKT

Chromatographic methods for determination of stable isotope-traced metabolites and their application in clinical research

In medical diagnostics substances labelled with radioactive or stable isotope tracers are used. At present stable isotope-traced substrates ^{13}C or ^2H are most commonly used for metabolism evaluation in pathologic situations. A modern approach is a combination of microdialysis method and an application of stable isotopes.

In this study analytic methods for the determination of glucose and lactate in microdialysate are described. Due to used substances, labelled with stable isotope-tracers, these substances were determined by the method of gass chromatography with detection by mass spectrometry (GC-MS). The aim of the study was the development, determination of parameters, validation and optimalization of analytic methods oriented on measuring of isotope enrichment of molecules of chosen analytes.

The isotope enrichment of glucose was determined after its derivatization by hydroxylamine hydrochloride and acetanhydride. A derivate aldonitril pentacetyl-D-glucose was determined. The method described in the study is the result of optimalization of time and temperature of derivatization of samples of microdialysates and chromatographic conditions. The obtained data were evaluated by the software Chemstation and statistics software SigmaStat. The precision was verified by the method of standard addition and was stated as 1,48%, the precision was determined by repeated measuring of a real sample – variation coefficient was 2,51%. Parameters of linear regression for concentrations 0,5 – 15 mmol/l were under given conditions with regression coefficient (R^2) 0,9997 and the regression equation $y = -0,0185 + 0,142x$.

Glucose for determination by gass chromatography is usually derivatized only by acetanhydride that however using capillary column CP-Sil 8 CB-MS (60 m x 0,32 mm) provides for interference in chromatographic recording – a double peak of likely formed anomers of pentacetyl-glucopyranose. For this reason it was necessary to make derivatization of aldehydic group of glucose first by hydroxylamin hydrochloride. The

result method shows suitable parameters for using in analysis of microdialysate samples.

Lactate was determined by derivatization by dimethoxypropane, propylamine and further by heptafluorobutyranhydride by formation of derivate of L-lactin-n-propylamidheptafluorobutyrate. Following parameters were determined – accuracy 3,25%, precision 3,15%, parameters of linear regression for concentrations within 0,5 – 10 mmol/l were under given conditions $R^2 = 0,999$ and the regression equation $y = 0,215 + 1,039x$. This relatively complicated derivatization method was taken over from an associated workshop at the University of Lausanne and its parameters were compared with a simpler method of derivatization by N-(butyl-dimethyl-silyl)-2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamide. The formed derivate di(tert-butyl-dimethylsilyl) lactate was determined by the method GC-MS. The precision was 3,02%, accuracy 3,8%, parameters of linear regression $R^2 = 0,999$, the regression equation $y = -0,0809 + 0,792x$.

The presented methods were used in the pilot study of microdialyse of muscle and hepar of rats in various metabolic situations. At present the methods are used in clinical research on patients suffering from diabetes mellitus type I and have extended a spectrum of methods applied by the laboratory of the Clinic of Gerontology and Metabolism of the University Hospital of Hradec Králové.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Chromatografické metody pro stanovení metabolitů značených stabilními izotopy a jejich aplikace v klinickém výzkumu“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Českých Budějovicích 13.4.2009

.....

Podpis studenta

Poděkování

Upřímné poděkování patří vedoucí této bakalářské práce RNDr. Aleně Tiché, PhD. a MUDr. Radomíru Hyšplerovi, PhD. za odborné vedení práce, cenné rady a praktické zkušenosti. Dále též vedení Kliniky gerontologické a metabolické FNHK, které mi umožnilo využít laboratoře v experimentální části.

.....

Jana Žabokrtská

OBSAH

ÚVOD	- 11 -
1 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY	- 12 -
1.1 Chromatografické metody	- 12 -
1.1.1 Rozdělení chromatografických metod	- 12 -
1.1.1.1 Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu	- 12 -
1.1.1.2 Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu	- 13 -
1.1.2 Plynová chromatografie	- 13 -
1.1.2.1 Instrumentace v plynové chromatografii	- 13 -
1.2 Hmotnostní spektrometrie	- 15 -
1.2.1 Princip metody	- 15 -
1.2.2 Instrumentace	- 16 -
1.2.2.1 Iontový zdroj	- 16 -
1.2.2.2 Hmotnostní analyzátoři	- 17 -
1.2.2.3 Detektory iontů	- 18 -
1.2.3 Hmotnostní spektrum	- 19 -
1.2.4 Aplikační oblast GC-MS	- 19 -
1.3 Derivatizace v plynové chromatografii	- 19 -
1.3.1 Nejvýznamnější derivatizační reakce využívané při plynově chromatografické analýze	- 20 -
1.4 Využití izotopického značení v metabolických studiích	- 21 -
1.5 Glukosa	- 21 -
1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti	- 22 -
1.5.2 Biologický význam	- 22 -

1.5.2.1	Glykémie.....	- 22 -
1.5.2.2	Glykosurie.....	- 23 -
1.5.3	Metabolismus glukosy	- 23 -
1.5.4	Analytické metody stanovení glukosy	- 25 -
1.5.4.1	Metody enzymové	- 25 -
1.5.4.2	Metoda fotometrická	- 26 -
1.5.4.3	Zkouška Benediktova	- 26 -
1.5.4.4	Chromatografické metody	- 27 -
1.6	Laktát.....	- 27 -
1.6.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti	- 27 -
1.6.2	Biologický význam	- 27 -
1.6.3	Metabolismus laktátu	- 28 -
1.6.4	Analytické metody stanovení laktátu.....	- 28 -
1.6.4.1	Enzymové metody	- 28 -
1.6.4.2	Elektrochemické metody	- 29 -
1.6.4.3	Chemické metody.....	- 29 -
1.6.4.4	Chromatografické metody	- 29 -
1.7	Mikrodialýza.....	- 29 -
1.8	Validace analytické metody	- 30 -
1.8.1	Přesnost	- 30 -
1.8.2	Správnost.....	- 31 -
1.8.3	Stabilita.....	- 31 -
1.8.4	Linearita	- 31 -
1.8.5	Mez detekce.....	- 32 -

1.8.6	Mez stanovitelnosti	- 32 -
2	CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	- 33 -
2.1	Cíl práce	- 33 -
2.2	Hypotéza.....	- 33 -
3	METODIKA	- 34 -
3.1	Stanovení glukosy.....	- 34 -
3.1.1	Přístroje a pomůcky	- 34 -
3.1.2	Chemikálie.....	- 34 -
3.1.3	Příprava roztoků.....	- 35 -
3.1.4	Odběr a příprava vzorku.....	- 35 -
3.1.4.1	Mikrodialyzát	- 35 -
3.1.4.2	Postup derivatizace.....	- 35 -
3.1.5	Chromatografické podmínky.....	- 36 -
3.1.5.1	Analýza na přístroji GC-FID a GC-MS.....	- 36 -
3.2	Stanovení laktátu.....	- 37 -
3.2.1	Přístroje a pomůcky	- 37 -
3.2.2	Chemikálie.....	- 38 -
3.2.3	Příprava roztoků.....	- 38 -
3.2.4	Odběr a příprava vzorku.....	- 39 -
3.2.4.1	Mikrodialyzát	- 39 -
3.2.4.2	Postup derivatizace s heptafluorobutyriánhydridem	- 39 -
3.2.4.3	Postup derivatizace s (N-(butyl-dimethyl-silyl)-2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamidem).....	- 40 -
3.2.5	Chromatografické podmínky.....	- 41 -
3.2.5.1	Analýza na přístroji GC-FID a GC-MS.....	- 41 -

3.3	Zpracování dat	- 42 -
3.4	Uspořádání mikrodialýzy	- 42 -
3.4.1	Přístroje a pomůcky	- 43 -
3.4.2	Roztoky a chemikálie	- 43 -
3.4.3	Postup mikrodialýzy	- 43 -
4	VÝSLEDKY	- 45 -
4.1	Glukosa.....	- 45 -
4.1.1	Validace metody	- 47 -
4.1.1.1	Linearita	- 47 -
4.1.1.2	Správnost	- 50 -
4.1.1.3	Přesnost.....	- 51 -
4.1.1.4	Detekční a kvantifikační limit.....	- 52 -
4.1.1.5	Stabilita	- 53 -
4.1.2	Optimalizace metody	- 57 -
4.1.2.1	Optimalizace chromatografické analýzy	- 57 -
4.1.2.2	Optimalizace času derivatizace	- 58 -
4.2	Laktát.....	- 60 -
4.2.1	Validace metody pro derivatizaci s HFBA.....	- 65 -
4.2.1.1	Linearita	- 65 -
4.2.1.2	Správnost	- 67 -
4.2.1.3	Přesnost.....	- 68 -
4.2.1.4	Detekční a kvantifikační limit.....	- 70 -
4.2.1.5	Stabilita	- 70 -
4.2.2	Optimalizace metody pro derivatizaci s HFBA.....	- 74 -

4.2.3	Validace metody pro derivatizaci s MTBSTFA	- 77 -
4.2.3.1	Linearita	- 77 -
4.2.3.2	Správnost	- 79 -
4.2.3.3	Přesnost	- 80 -
4.2.3.4	Detekční a kvantifikační limit	- 82 -
4.2.3.5	Stabilita	- 82 -
4.2.4	Optimalizace metody pro derivatizaci s MTBSTFA	- 85 -
5	DISKUZE	- 89 -
6	ZÁVĚR	- 91 -
7	KLÍČOVÁ SLOVA	- 92 -
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	- 93 -

ÚVOD

Význam sledování metabolismu v patologických situacích je neustále v popředí zájmu klinického výzkumu a tvoří nedílnou součást všech oborů medicíny. Využití substrátů značených stabilním izotopem ^{13}C je moderní přístup k hodnocení aktivity metabolických cest. Tyto substráty mají široké možnosti použití, ale dosud nejsou v praxi laboratorních vyšetřovacích metod zcela běžně využívány. V současné době je využívána močovina se značeným izotopem uhlíku ^{13}C pro diagnostiku přítomnosti *Helicobacter pylori* pomocí neinvazivního dechového testu.

Stanovení požadovaného analytu může být prováděno celou řadou analytických postupů, které mohou mít různou výpovědní hodnotu. Metody se vždy posuzují z hlediska analytické spolehlivosti, která je dána jednak přístrojovým vybavením a validací dané analytické metody s důrazem na preanalytickou část laboratorního vyšetření. Bakalářská práce se zabývá vývojem, validací a aplikací analytických metod, které využívají $^{13}\text{C}_6$ -glukosy a $^{13}\text{C}_1$ -laktátu v mikrodialýze intersticia modelových zvířat a pacientů v klinickém výzkumu. Mikrodialýza je moderní metoda používaná k hodnocení tkáňového metabolismu. Spočívá v zavedení tenké sondy tvaru jehly do tkáně (podkoží, sval, orgán určený k transplantaci), přičemž vnější stěna sondy je tvořena polopropustnou membránou. Uvnitř sondy protéká Ringerův roztok a do něho pronikají nízkomolekulární metabolity z vyšetřované tkáně (glukosa, laktát, pyruvát, glycerol, atd.). Jejich koncentrace v mikrodialyzátu je přímo úměrná koncentraci v tkáni po vynásobení dialyzační účinností. V případě užití stabilních izotopů jsou metabolity stanovovány po jejich chromatografické separaci metodou hmotnostní spektrometrie. Aplikace těchto moderních metod umožní přesnější sledování tkáňového metabolismu pacientů.

1 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

1.1 *Chromatografické metody*

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, umožňující nejenom dělení velmi složitých směsí, ale též identifikaci a kvalitativní i kvantitativní stanovení jednotlivých látek.(2)

1.1.1 *Rozdělení chromatografických metod*

Chromatografické metody se vzhledem k různé možnosti klasifikace dělí podle několika hledisek:

- podle povahy děje, který převládá při separaci (rozdělovací, adsorpční, gelová, afinitní, iontově-výměnná chromatografie)
- podle skupenství mobilní fáze (kapalinová a plynová chromatografie)
- podle uspořádání stacionární fáze (kolonová chromatografie a chromatografie v plošném uspořádání – papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie).

(16)

1.1.1.1 *Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu*

Pro identifikaci složek směsi rozdělené chromatografií jsou významná retenční data jako je retenční čas (t_R), neboli doba od nástřiku po maximum daného elučního píku, dále retenční objem (V_R) nebo retenční index.

$V_R = t_R \cdot F$, kde

F – je objemová rychlost toku mobilní fáze

Nejvýhodnější postup identifikace složky je porovnání retenčních charakteristik daného píku s údaji standardních látek. Dále se užívá metoda standardního přídávku nebo spektrálních technik. Při identifikaci látek, u nichž není k dispozici standard nebo údaje z literatury, se užívá závislosti retenčních dat v homologických řadách.(14)

1.1.1.2 Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu

Kvantitativní zastoupení složky ve směsi je za určitých podmínek dáno plochou pod píkem dané složky. Přístroje jsou vybaveny počítačem s výstupem do tiskárny, jenž umožňuje automatický záznam retenčních dat pro přesnou kvantifikaci analýzy. Dále se obsah látky ve vzorku může zjistit při metodě vnějšího standardu nebo při metodě vnitřního standardu. (14)

1.1.2 Plynová chromatografie

Hlavními výhodami plynové chromatografie (GC) jsou jednoduchost, velmi vysoká separační účinnost a vysoká citlivost. Pokud má být vzorek analyzován metodou plynové chromatografie, musí být všechny složky vzorku převedeny do plynného stavu definovaným způsobem. V praxi to znamená, že GC je vhodná především pro organické látky s teplotou varu do 400 °C.

GC je dělena dle použité stacionární fáze na plynovou adsorpční chromatografii, kde je řídicím procesem adsorpce složky z plynné fáze na povrch tuhého adsorbentu (např. aktivní uhlí, silikagel) a na plynovou rozdělovací chromatografii, u které distribuce složky probíhá mezi kapalnou stacionární fází a plynnou mobilní podle rozdělovacího koeficientu jednotlivých látek. (2, 10, 34)

1.1.2.1 Instrumentace v plynové chromatografii

Mobilní fáze

Mobilní fáze v plynové chromatografii se označuje jako nosný plyn. Nosný plyn transportuje složky rozdělované směsi analytickou kolonou a přitom se sám neúčastní separačního procesu. Jako nosné plyny se používají dusík, vodík, helium a argon. Důležité je, aby nosný plyn měl vysokou čistotu a neměl by obsahovat kyslík a H₂O. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev. (34)

Injektor (dávkovací zařízení)

Injektor je dokonale proplachován nosným plynem. Injektor nahoře uzavírá septum, které je ze speciální pryže odolné vysokým teplotám. Teplota v injektoru má

být vyšší oproti teplotě varu nejméně těkavé složky vzorku. Páry vzorku jsou transportovány do připojené kolony. (34)

Analytické kolony

V plynově chromatografii používáme dva typy kolon: náplňové a kapilární.

- Náplňové kolony tvoří trubice vyrobené ze skla či nerezové oceli, jsou naplněné granulovaným materiálem, např. absorbentem nebo nosičem pokrytým kapalnou stacionární fází. Křemelina o průměru částic 0,1 – 0,15 mm zde slouží jako nosič.
- Kapilární kolony jsou otevřené kapiláry, kde vnitřní stěny kapiláry zastávají funkci nosiče. Vnitřní stěny kapiláry jsou pokryty kapalnou stacionární fází. Kolony se zhotovují z taveného křemene, kde povrch potažený vrstvičkou polyamidu dává koloně pružnost. Existují různé typy těchto kolon. (15)

WCOT (wall coated open tubular) je kolona s tenkým filmem stacionární fáze, který je přímo nanesen na vnitřní stěně kolony. Tloušťka stěny i vnitřní průměr se pohybují ve stovkách μm .

SCOT (support coated open tubular) na nosiči je zakotvena kapalina. Nosič je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry. Tloušťka náplně je 1-5 μm .

PLOT (porous layer open tubular) je kolona, kde se na vnitřní stěně kapiláry nachází pórovitá vrstva o tloušťce kolem 10 μm i větší. (15)

Stacionární fáze se volí podle charakteru vzorku a podle rozsahu teplot varu. Udává se, že zvolená stacionární fáze má být podobného typu jako stanovovaný vzorek. Používané fáze jsou na bázi polysiloxanu. (15, 34)

Detektory

Úkolem detektoru je, aby při průchodu samotného nosného plynu a při průchodu nosného plynu obsahující eluovanou složku poskytl rozdílné signály. Od detektoru se vyžaduje rychlá odezva, stabilita základního signálu a vysoká citlivost. (12, 34)

- Plamenový ionizační detektor (FID)

FID (Flame Ionization Detector) je nejpoužívanějším detektorem v plynové chromatografii. Jeho podstatnou část tvoří hořák. K ionizaci dochází v miniaturním

plamenu. Do nosného plynu, vycházejícího z kolony, je v detektoru přidáván vodík hořící při zapálení nesvítivým plamenem. Ionty, radikály a elektrony, které se vytvoří spálením složek vycházejících z kolony s nosným plynem, umožní průchod elektrického proudu mezi elektrodami, na které je vloženo stabilizované stejnosměrné napětí. Jednotlivé konstrukční typy FID se od sebe liší zejména tvarem a umístěním elektrod, které se umísťují např. jako dvě destičky rovnoběžné s plamenem nebo jednou z elektrod je elektricky odizolovaná kovová tryska hořáku. V redukční zóně plamene dochází ke krakování a hydrogenaci uhlíkatých látek za vytvoření radikálů $\text{CH}_3\cdot$, které další reakcí s kyslíkem produkují ionty schopné přenosu elektrického proudu. Pouze hydrogenovatelný uhlík je v podmínkách FID ionizován, proto není velikost odezvy úměrná počtu všech uhlíkových atomů, ale počtu tzv. efektivních uhlíkových atomů. (10, 12, 34)

Další detektory užívané v GC:

- Detektor elektronového záchytu
- Tepelně vodivostní detektor
- Plamenový fotometrický detektor
- Hmotnostní spektrometr

1.2 Hmotnostní spektrometrie

1.2.1 Princip metody

Hmotnostní spektrometrie (MS) převádí molekuly vzorku na ionty a ty pak separuje podle hodnoty podílů hmotnosti a náboje (m/z). Základními kroky jsou:

- 1) ionizace
- 2) akcelerace iontu do hmotnostního analyzátoru
- 3) separace iontu hmotnostním filtrem
- 4) detekce iontu

Tato metoda má, při vhodné interpretaci výsledků měření, velmi dobrou vypovídající schopnost o struktuře stanovovaných látek. Spojení hmotnostního

spektrometru se separačními metodami umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matici a výrazně zvyšuje selektivitu. (16, 30)

1.2.2 Instrumentace

K převedení analyzované látky do ionizovaného stavu slouží iontový zdroj. Jako disperzní prvek slouží hmotnostní analyzátor a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých m/z . Na detektor směřovaný proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem poskytuje analogový signál, který je úměrný počtu dopadajících iontů. Signál je po digitalizaci převeden do počítače a programovým vybavením zpracován do formy hmotnostních spekter. Kromě sběru dat v reálném čase a jejich zpracování zajišťuje počítač další řídicí a kontrolní funkce související s chodem přístroje. (30)

Hmotnostní spektrometr pracuje za velmi nízkých tlaků. Hlavní součástí zařízení je i výkonný, nejčastěji dvoustupňový vakuový čerpací systém, který umožňuje držet nízký tlak za všech provozních podmínek. Dále je součástí vhodný vstup umožňující převedení vzorku analyzované látky z vnějšího prostředí do prostoru iontového zdroje. Při kombinaci hmotnostního spektrometru s plynovým chromatografem (GC-MS) je do prostoru iontového zdroje přiváděna mobilní fáze spolu s látkami vystupujícími z chromatografické kolony buď přímo nebo přes vhodné rozhraní, které snižuje podíl mobilní fáze. (30)

1.2.2.1 Iontový zdroj

Hmotnostní spektrometrie poskytuje veškeré, informace týkající se pouze částic nesoucích náboj. Naprosto nezbytným předpokladem analýzy je tedy ionizace analyzované látky.

Ionizační techniky se podle množství dodané energie dělí na tzv. měkké a tvrdé

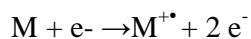
- Měkké – energetický přebytek dodaný molekule je malý a pravděpodobnost fragmentace nízká.
- Tvrdé – nadbytek vnitřní energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu.

Nejčastější techniky ionizace jsou v plynné fázi, kde analyzovaná látka je předem odpařena do vakua a důležitým předpokladem je její dostatečná těkavost. (30)

Způsob ionizace molekul

- *Elektronová ionizace (electron ionization, EI)*

EI je příkladem tvrdé ionizační techniky v plynné fázi. Jde o nejběžnější a nejlépe propracovaný způsob ionizace, běžně používaný u kombinace GC-MS. Energetickým procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce molekul analyzované látky M s proudem urychlených elektronů. Při této interakci může dojít k následujícím dějům:



= elektron ovlivní elektromagnetické pole molekuly za uvolnění valenčního elektronu za vzniku molekulárního iontu $M^{+\bullet} + e^-$

Pro zdroj elektronů se používá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno (katoda). Množství emitovaných elektronů určuje velikost žhavicího proudu. Proud elektronů je směřován směrem k anodě. Potenciálový proud mezi žhavenou katodou a anodou určuje energii elektronu, přicházejících do kontaktu s ionizovanou látkou. Za standard se považuje energie 70eV. Vzniklé ionty jsou z ionizačního prostoru vytlačovány elektrostatickým repelery udržovanými na vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlován a směřován z iontového zdroje soustavou akceleračních a fokusačních elektrod. (30)

Další způsoby ionizace jsou:

- *Chemická ionizace*
- *Ionizace polem*
- *Ionizace laserem za účasti matrice*
- *Ionizační techniky za atmosférického tlaku*

1.2.2.2 Hmotnostní analyzátoři

Užívají se k rozdělení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle jejich m/z

- Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole, Q)

Tvoří ho čtyři tyčové elektrody. Na dvě protilehlé elektrody je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na ostatní dvě elektrody záporné stejnosměrné napětí. Na všechny elektrody je ještě současně superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Velikost těchto napětí se mění v závislosti na čase, přičemž jejich poměr zůstává stejný.

Iont, který je převeden do středu osy kvadrupólu a vlivem vložených napětí začne oscilovat. V ten okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro iont s určitou hodnotou m/z , který se po průchodu kvadrupólu dostane na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Za určitých podmínek projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém m/z . Zařízení se chová jako hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu m/z iontu. (15, 16, 21)

Další analyzátory:

- Iontová past
- Průletový analyzátor
- Magnetický hmotnostní analyzátor

1.2.2.3 Detektory iontů

Děleny do dvou kategorií:

- 1) Detektory pro přímá měření, které detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů.
 - 2) Násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů, poskytují měřitelné signály pro jednotlivé ionty.
- Faradayova klec
Jednoduchý detektor tvořen konverzní elektrodou miskovitěho tvaru.
 - Elektronový násobič
Ionty dopadající na povrch elektrody z ní vyrazí elektrony, které jsou dále zesíleny systémem dynod. (16)

1.2.3 Hmotnostní spektrum

Je to záznam iontů vzniklých z analyzované sloučeniny uspořádaný podle vzrůstajícího poměru m/z , vyneseny proti absolutnímu či relativnímu zastoupení jednotlivých iontů. Na ose y je relativní intenzita v %, na ose x poměr m/z

Píky ve spektru:

Hlavní pík – nejintenzivnější pík (intenzita 100%)

Molekulární pík M – naznačuje molekulovou hmotnost analytu

Izotopické píky ($M+1$, $M+2$) - přirozeně se vyskytující izotopy

Píky ve spektru jsou zobrazeny v čárové (centroidové) formě. (15, 21)

1.2.4 Aplikační oblast GC-MS

Metoda GC-MS je s výhodou používána pro analýzu komplikovaných směsí látek. Díky vysoké citlivosti detekce hmotnostním spektrem sahá aplikovatelnost GC-MS do oblasti stopové a ultrastopové analýzy. GC-MS je omezena pouze požadavkem těkavosti látky, jež musí projít separační kolonou. (30)

1.3 Derivatizace v plynové chromatografii

Derivatizační techniky se zahrnují do kategorie reakční chromatografie proto, že využitím specifických reakcí buď před chromatografickou separací, anebo až po rozdělení látek před vstupem do detektoru docílujeme kvalitativně nových vlastností separovaných látek. Tyto vlastnosti umožní separaci, zvýší citlivost a selektivitu detekce, usnadní jejich identifikaci.

Analyzované látky se působením různých činidel převedou chemickou reakcí na deriváty, tj. na látky nové, s odlišnými chemickými a fyzikálně – chemickými vlastnostmi. Důvody vedoucí k derivatizaci v plynové chromatografii jsou tyto:

- Zvýšení těkavosti analyzovaných látek - velmi mnoho organických látek není totiž možno chromatografovat v plynné fázi proto, že je nelze převést do plynného stavu anebo se při pokusu o zplynění rozkládají.
- Zamezení nežádoucí sorpce - využívá se všude tam, kde přítomná funkční skupina vytváří silné interakce se stacionární fází.

- Zlepšení selektivity, zvýšení citlivosti a snížení limitu detekce - do molekuly separované látky se zavádějí při derivatizačním pochodu takové elementy, které vykazují selektivitu při určitém způsobu detekce. (12)

1.3.1 *Nejvýznamnější derivatizační reakce využívané při plynově chromatografické analýze*

- Acylderiváty

K přípravě derivátů alkoholu, fenolu, aminu a thiolu se využívá acylačních reakcí. Vzniklé deriváty mají výhodnější chromatografické vlastnosti a vykazují zpravidla nižší polaritu než původní látky. Blokováním protonu nemůže docházet k jejich interakcím s okolními molekulami, zamezí se tak tvorbě vodíkových můstků. Při ztrátě tvorby vodíkové vazby dochází ke zvyšování těkavosti derivátů ve srovnání s původními nederivatizovanými látkami.

Příkladem derivatizačních činidel je N-methyl-N-bis(trifluoroacetamid) nebo heptafluorobutyranhydrid. (12)

- Estery

Nejčastější derivatizační reakce je esterifikace. Tato reakce má zásadní význam pro analýzu karboxylových kyselin plynovou chromatografií. Estery jsou těkavější než jim odpovídající kyseliny. Estery nemohou disociovat, nemohou vytvářet vazby vodíkovými můstky, takže patří mezi látky s dobrými chromatografickými vlastnostmi.

K esterifikaci lze použít methanol v kyselém prostředí (HCl nebo BF₃). (12)

- Silylderiváty

V chromatografii se silylační reakce využívají velmi často. Principem je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující různé polární funkční skupiny s aktivním vodíkem. Aktivní vodík je schopen reakce a nezáleží přitom na tom, zda-li je vodík vázán na kyslík, síru či dusík.

Mezi silylační činidla patří například N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid nebo N-methyl-N-(t-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid. (12)

1.4 Využití izotopického značení v metabolických studiích

Izotopově značená látka (tracer) je látka s molekulami označenými způsobem, který neovlivní její metabolický osud a je rovnoměrně rozptýlena mezi neoznačenými molekulami (tzv. tracee) v konkrétním metabolickém poolu. Pool je zásoba sledované látky v určitém kompartmentu, který může být velký (např. celková tělesná voda pro deuteriumoxid nebo ureu) nebo naopak pouze intravaskulární (značené erytrocyty). Pro značení látek lze například využít stabilní či nestabilní (radioaktivní) izotopy. Stabilní izotop je jeden ze dvou či více forem prvku, který ve svém jádře má stejný počet protonů, ale odlišný počet neutronů a v elektronovém obalu stejný počet elektronů a nepodléhá samovolné přeměně doprovázené emisí částic. Tracery jsou využívány pro diagnózy onemocnění či objasnění metabolických pochodů v živých systémech. Využívají se pak měřicí metody pozitronové emisní tomografie, magnetické resonance či hmotnostní spektrometrie.

Po rozptýlení traceru je odebrán vzorek materiálu k analýze. Vyextrahovaný vzorek je po chromatografické separaci analyzován hmotnostním spektrometrem. Výstupem je hmotnostní chromatogram, který zaznamená množství látky v přirozené formě a množství látky značené, tedy traceru. Hodnotí se poměr ploch pod křivkou (TTR – tracer/tracee ratio), odpovídající molárnímu poměru tracer vs. tracee a dále je stanoveno procento obohacení (APE – atom percent excess).

$$APE = \frac{AREA\ tracer}{(AREA\ tracer + AREA\ tracee)}$$

Metody sledování syntézy de novo jsou s využitím diluce značeného metabolitu v poolu či inkorporace prekursoru do metabolitu. (35)

1.5 Glukosa

Glukosa je metabolicky nejvýznamnějším sacharidem. Představuje hlavní zdroj energie pro většinu tkání. (20, 24)

1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Glukosa je bílá krystalická látka, monosacharid ze skupiny aldohexóz. Vzhledem k přítomnosti aldehydické skupiny patří glukosa k redukujícím sacharidům, tj. např. redukuje soli dvojmocné mědi na jednomocné, což se v minulosti užívalo ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení cukru v roztoku (např. v moči). V přírodě se přirozeně vyskytuje hlavně konfigurační izomer D, který je pravotočivý. Je tvořena do 50 °C stabilním hydrátem α -D-glukopyranosy a β -D-glukopyranosy v roztoku, nad 50°C se vyskytuje v anhydrátové formě, při dalším zvyšování teploty je dominantní anomer β -D-glukopyranosy. (1, 4, 19, 33)

1.5.2 Biologický význam

Glukosa je energetickým substrátem pro všechny buňky, podílí se na intermediárním metabolismu, tj. na vzájemné přeměně sacharidů, lipidů a proteinů. Pokud není buňkou přímo využita jako zdroj energie, může být uložena do zásoby ve formě glykogenu, nebo po přeměně na tuk ve formě zásobních triacylglycerolů. V době delšího hladovění (po vyčerpání jaterního glykogenu) je podíl energie čerpané z glukosy na celkové spotřebě organismu pouze 20 %, větší část energie se získává oxidací lipidů. (1, 4, 19, 33)

Metabolismus glukosy je regulován hormonálně, koncentrace glukosy v krvi (glykémie) je tak udržována v konstantním rozmezí. (20)

Glukosa se může stanovovat v plné krvi, v krevním séru nebo krevní plazmě. Používá se krev venózní i kapilární.

1.5.2.1 Glykémie

Hladina glukosy v krvi je udržována v relativně úzkém rozmezí 3,3-5,6 mmol/l. Zvýšení hladiny glukosy v krvi nad 5,6 mmol/l se označuje jako hyperglykémie, naopak snížení hladiny pod 3,3 mmol/l je hypoglykémie. (6)

Hypoglykémie představuje hlavní nebezpečí při nedostatečně energetickém zásobení mozku, které může vést až ke kómatu nebo úmrtí.

Hyperglykémie zahrnuje onemocnění zvané diabetes mellitus, kde hladina glukosy na lačno je vyšší než 7,0 mmol/l. Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované absolutním nebo relativním nedostatkem insulinu. Existuje několik forem i několik stádií. Nejčastější jsou:

- *Diabetes mellitus typ 1*

Je charakterizován absolutním nedostatkem insulinu, ke kterému došlo v důsledku destrukce β -buněk Langerhansenových ostrůvků slinivky břišní při autoimunitním poškození. Postihuje většinou mladé lidi a jedná se o polygenní autoimunitní onemocnění.

- *Diabetes mellitus typ 2*

Hyperglykémie je způsobena kombinací insulinové rezistence a relativního nedostatku insulinu. Postižení bývají spíše starší lidé. (20)

1.5.2.2 Glykosurie

Do moče se glukosa dostává z krevního oběhu glomerulární filtrací. Za fyziologických okolností se definitivní močí dostává jen nepatrné množství glukosy (0,11 – 0,83 mmol/l). Hodnoty nad tuto mez jsou již patologické. Zvýšené množství glukosy v moči je způsobeno buď patologickou hyperglykémii nebo snížením tzv. renálního prahu pro glukosu. Za patologických okolností se glukosa vylučuje ve zvýšeném množství do moče převážně u diabetické glykosurie nebo při renální glykosurii. (3)

1.5.3 Metabolismus glukosy

Za hlavní cestu katabolismu glukosy je označována glykolysa, zvaná též Embdenova-Mayerhofova cesta (17). Glykolysa je hlavní metabolickou dráhou pro utilizaci glukosy a vyskytuje se v cytosolu všech buněk. Je to ojedinělá dráha, protože může využívat kyslík, je-li dostupný (aerobně), nebo může fungovat i za úplné nepřítomnosti kyslíku (anaerobně) (21). Glykolysa probíhá v několika fázích. První fází je aktivace glukosy a přeměna na triosafosfáty, důležitá je fosforylace glukosy na glukosu-6-fosfát, který je klíčový meziprodukt při metabolismu glukosy a ostatních

sacharidů (24). Druhá fáze glykolysy je oxidační a vede ke vzniku 3-fosfoglycerátu. Třetí fáze vede ke vzniku pyruvátu a dále to pokračuje dle toho, zda bude využit kyslík. Buď dojde k hydrogenaci pyruvátu na laktát, kde není přítomen žádný kyslík, je to tedy anaerobní prostředí. Je-li přiveden kyslík, laktát se netvoří, ale složitou dekarboxylační a oxidační reakcí vznikne acetyl-CoA (17). Oxidace glukosy poskytuje až 38 molů ATP za aerobních podmínek, avšak pouze 2 moly v nepřítomnosti kyslíku (22, 28).

Další důležitou součástí je metabolismus glykogenu. Glykogen jako rezervní polysacharid a současně zásobní forma glukosy se vyskytuje téměř ve všech tkáních. Nejvíce je ho však v játrech a ve svalu (24). V játrech je jeho hlavní funkcí být k dispozici jiným tkáním cestou tvorby krevní glukosy. Ve svalu slouží pouze potřebám tohoto orgánu, protože je dostupným zdrojem metabolického paliva (22). Metabolismus glykogenu se skládá z glykogeneze a glykogenolýzy.

Glykogeneze je proces, kdy je glykogen syntetizován z glukosy a jiných prekurzorů. Glukosa je fosforylována na glukosa-6-fosfát v reakci, která je první reakcí glykolytické dráhy vycházející z glukosy. Dále dochází k přeměně glukosa-6-fosfát na glukosa-1-fosfát a pokračováním dalších reakcí dojde až k synthese glykogenu (22, 24).

Glykogenolýza je sled enzymových reakcí, jimiž se z molekuly glykogenu uvolní glukosa.

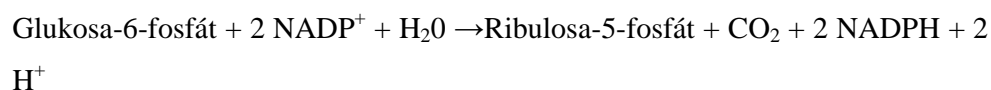
Alternativní cestou metabolismu glukosy je pentosový cyklus. Je to děj, který se uskutečňuje v cytosolu a nevytváří ATP, má však dvě hlavní funkce:

- 1) Generuje NADPH pro redukční synthesy, např. pro biosynthesu mastných kyselin nebo steroidů.
- 2) Poskytuje zbytky ribosy pro biosynthesu nukleotidů a nukleových kyselin. (17, 22)

Přestane-li být potřeba obou zmíněných produktů nutná, odstraní se nadbytek meziproduktů pentosového cyklu tak, že se postupně převede na meziprodukty glykolýzy. (24)

Reakce pentosového cyklu se dělí na dvě části: na reakce přímé oxidace glukosy – při nichž vznikají NADPH a na reakce neoxidační, jejichž hlavním produktem je ribosa-5-fosfát.

- a) Oxidační fáze vychází stejně jako glykolýza z glukosa-6-fosfátu a končí vznikem ribulosa-5-fosfátu. Sumárně je možno vznik NADPH popsat reakcí:



- b) Neoxidační fáze je složitá. Začíná přeměnou ribulosa-5-fosfátu na ribosa-5-fosfát v konečné fázi vznikají glyceraldehyd-3-fosfát a fruktosa-6-fosfát. Fruktosa-6-fosfát podléhá izomerii a jako glukosa-6-fosfát se může stát přímo meziproduktem glykolýzy. Podobně je tomu i s glyceraldehyd-3-fosfát. (17, 24)

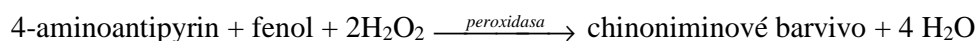
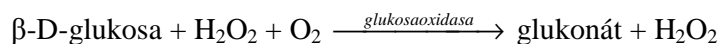
Metabolické dráhy, které jsou zodpovědné za přeměnu necukerných sloučenin na glukosu a glykogen jsou tvořeny glukoneogenesí. Hlavními substráty pro glukoneogenesi jsou glukogenní aminokyseliny, laktát, glycerol. Glukoneogenese probíhá v játrech a ledvinách. V cytoplazmě buněk těchto orgánů se aminokyseliny, laktát a glycerol, které sem byly přivedeny krví z periferie, mění na pyruvát. Pyruvát se však nemůže přímo měnit na fosfoenolpyruvát, proto vzniká za součinnosti mitochondriálních meziproduktů a enzymů. Vznik glukosa-6-fosfát je možné považovat za konečný produkt glukoneogenese, jelikož je klíčovým meziproduktem metabolismu sacharidů. Vychází z něj jak syntéza glykogenu, glykolýza, přímá oxidace glukosy, tak uvolnění volné glukosy. (24)

1.5.4 Analytické metody stanovení glukosy

1.5.4.1 Metody enzymové

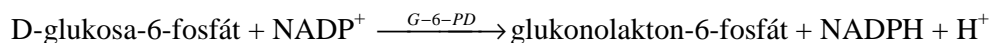
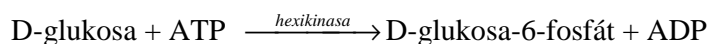
a) pomocí glukosaoxidasy a peroxidasy

Glukosa se oxiduje kyslíkem za katalýzy enzymem glukosaoxidasou na peroxid vodíku a glukonát. Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4-aminoantipyrinem katalysovanou enzymem peroxidasou. (31)



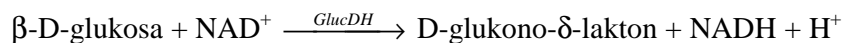
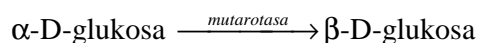
b) pomocí hexokinasy

Glukosa je fosforylována hexokinasou za přítomnosti ATP a Mg⁺. Glukosa-6-fosfát je oxidována glukosou-6-fosfát dehydrogenasou za přítomnosti NADP⁺. Množství vytvořeného NADPH, měřeného 334, 340 nebo 366 nm, je přímo úměrný koncentraci glukosy v reakční směsi. (31)



c) pomocí glukosa dehydrogenasy

Enzym glukosa dehydrogenasa (Gluc DH) katalyzuje oxidaci glukosy na lakton kyseliny glukonové. Množství vytvořeného NADPH je přímo úměrný koncentraci glukosy v reakční směsi. (31)



1.5.4.2 Metoda fotometrická

Glukosa reaguje za varu v prostředí kys. octové s o – toluidinem za vzniku zbarveného komplexu, jehož intenzita se měří fotometricky. (3)

1.5.4.3 Zkouška Benediktova

Glukosa redukuje za varu měďnatou sůl v alkalickém prostředí za přítomnosti uhličitanu a citronanu sodného na oxid měďný, čímž dochází k charakteristickému zbarvení roztoku. Po ochlazení se hodnotí modré a zelené zbarvení čirého obsahu zkumavky nebo zelená, oranžová až červená sraženina a výsledek se uvádí v arbitrárních jednotkách. (3)

1.5.4.4 Chromatografické metody

Referenční metodou pro stanovení glukosy v klinické biochemii je metoda plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem, která využívá izotopové ředění. (3)

Glukosu lze stanovit metodami, jak kapalinové chromatografie, tak i plynovou chromatografií. Při kapalinové chromatografii se využívá například detekce refrakčním indexem, isokratická eluce mobilní fáze – acetonitril:voda (75:25) o průtoku 1,8 ml/min. a teplota kolonového termostatu 25 °C (11). Metody plynové chromatografie využívají pro stanovení vždy derivatizaci. Užívá se například silylační činidlo BSTFA (N,O-bis-(trimethylsilyl)fluororacetamid a po separaci derivátů cukrů na kapilární koloně DB5-MS (30m x 0,255 mm ID) se stanovuje GC-MS (23). Další derivatizační metodou je acetylace. Krevní plazma se extrahuje s hydroxidem barnatým a síranem zinečnatým, po té se užívají iontově výměnná kolony AG50W-X8 a AG1-X8. Eluent je derivatizován acetanhydridem s pyridinem (2:1) a derivát je separován na kapilární koloně OV 101 a koncentrace stanovována GC-MS (35).

1.6 Laktát

1.6.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Sůl kyseliny mléčné (anion kyseliny mléčné) se nazývá laktát. Kyselina mléčná je lehce rozpustná, tvoří bezbarvé krystaly. Tato kyselina vzniká mléčným kvašením cukrů.

1.6.2 Biologický význam

Největší množství laktátu v lidském organismu vzniká v příčně pruhovaném svalu a dále se tvoří v erytrocytech. Laktát se ve svazech metabolizuje jen ve velmi malém rozsahu. Většina laktátu se ze svalů odsunuje do krve a následně do jater, kde se z něj většinou vytváří zpětně glukosa. Hromadění laktátu samo o sobě není příčinou svalové únavy a bolestivosti, tou je pokles pH (17, 24). Laktát se může stanovovat

v kapilární krvi, arteriální nebo venosní krvi, v krevní plasmě a mozkomíšním moku (31). Koncentrace laktátu patří v kritických stavech mezi denně sledované parametry.

Jeho zvýšení vyvolává laktátovou acidózu, která se dělí na dva typy:

- a) Typ A je způsoben nedostatečnou oxidací na úrovni mitochondrií,
- b) Typ B je vyvolán podáním řady látek, které ovlivňují intermediární metabolismus ve smyslu zvýšení produkce laktátu, aniž je přítomna tkáňová hypoxie. (36)

1.6.3 Metabolismus laktátu

Tkáně, které fungují za hypoxických podmínek, mají tendenci k tvorbě laktátu. Je tomu tak u kosterního svalu, kde rychlost, s jakou tento orgán může pracovat, není limitován jeho oxygenační kapacitou. Zvýšená množství produkovaného laktátu pak mohou být zjištěna ve tkáních, v krvi a v moči.

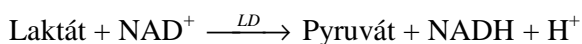
Glykolysa v erytrocytech, i za aerobních podmínek, je vždy zakončena laktátem, protože chybějí mitochondrie obsahující enzymové mechanismy pro aerobní oxidaci pyruvátu. (22)

Propojení anaerobní glykolysy ve svalectech s glukoneogenesí v játrech se nazývá Coriho cyklus. Při anaerobní glykolýze vzniká ve svalu pyruvát, který je redukován na laktát. Laktát je krví dopraven do jater, kde je zpětně oxidován na pyruvát. Pyruvát je v játrech za spotřeby energie zpětně převáděn na glukosu, která je krví dopravována zpět do svalu. Tento děj zabraňuje hromadění toxického laktátu v krvi a pomáhá udržovat stálou hladinu glukosy v krvi. Podobný přenos substrátů mezi játry a svalectem představuje cyklus alaninový. (13, 20)

1.6.4 Analytické metody stanovení laktátu

1.6.4.1 Enzymové metody

Laktát je oxidován na pyruvát laktátdehydrogenásou (LD) za přítomnosti NAD^+ . NADH je měřena spektrofotometricky v rozmezí pro laktát 340 nebo 366nm. (31)



Pyruvát + Glutamát \xrightarrow{ALT} Alanin + α -ketoglutarát

1.6.4.2 Elektrochemické metody

Používá se elektroda, která má imobilizovanou laktát oxidázu v membráně. Laktát oxidáza produkuje H_2O_2 z laktátu a O_2 . H_2O_2 difunduje k platinové elektrodě, která je udržována na definovaném potenciálu, daný stříbrnou referenční elektrodou. Na platinové elektrodě je H_2O_2 oxidován na O_2 , množství vyprodukovaného O_2 odpovídá množství laktátu. (31)

1.6.4.3 Chemické metody

Dinitrofenylhydrazin reaguje s ketokyselinami za vzniku barevných hydrazonů. Analýzu komplikuje nutnost rozlišit kyselinou mléčnou od ostatních, v plazmě přítomných, ketokyselin. (3)

1.6.4.4 Chromatografické metody

Kromě těchto běžně používaných analytických metod, lze laktát stanovit chromatograficky a elektroforeticky. Laktát, pyruvát a askorbát lze současně stanovit kapalinovou chromatografií s UV detekcí, po separaci na kationtově výměnné koloně (8). Metody plynové chromatografie využívají pro stanovení vždy derivatizaci. Užívá se například silylační činidlo BSTFA (N,O-bis-(trimethylsilyl)fluoracetamid pyridinem (5:1) a po extrakci vzorků krve ethylacetátem a HCl jsou deriváty separovány a kapilární koloně OV 101 a stanovovány GC-MS s chemickou ionizací. (35). Další možností je derivatizace laktátu na n-propyl-amid heptafluorobutyrátový derivát, který má ideální strukturní uspořádání pro hodnocení metabolismu laktátu ve studiích využívající stabilní izotopy (32).

1.7 Mikrodialýza

Mikrodialýzační metoda byla vyvinuta před více než 25 lety. Představuje moderní techniku, široce využitelnou v experimentálních i v klinických aplikacích, umožňuje odběr metabolicky aktivních látek i aplikaci dalších látek (endogenní látky,

léky, metabolity) přímo ve tkáních, tělesných dutinách i v krvi. Těmito látkami mohou být např. glukosa, laktát, aminokyseliny, adrenalin, noradrenalin. Přednostmi metody jsou její malá invazivnost a možnost dlouhodobého kontinuálního sledování lokálního metabolismu. (5, 26, 29)

Mikrodialýza v principu napodobuje pasivní funkci krevních kapilár. Mikrodialyzační katetr se skládá z vnitřní a vnější kanyly se semipermeabilní membránou. Katetr je implantován do intersticiálního prostoru tkání. Vnitřní kanyla je spojitě promývána roztokem elektrolytů co nejpodobnějším extracelulární tekutině. Během návratu skrz vnější kanylu dojde k výměně analytu mezi kanylou a intersticiálním prostorem přes semipermeabilní membránu. Tento dialyzát je sbírán a jeho obsah je stanovován příslušnou analytickou metodou. Dialyzát je odebírán v určitých zvolených intervalech. Výměna mezi promývací tekutinou a intersticiální tekutinou je oboustranná. Mikrodialyzační dialyzát může být užíván k detekci analytu z intersticiální tekutiny. (5, 9, 18, 25, 26, 29)

Mikrodialyzační studie mohou být zaměřeny na měření metabolitů souvisejících s energetickým metabolismem. Pomocí mikrodialýzy je tedy možné velmi šetrně lokálně aplikovat látky přímo do tkáně, sledovat v závislosti na čase lokální změny extracelulárních koncentrací endogenních látek a také monitorovat hladiny podaných metabolitů, téměř ve všech orgánech a tkáních (např. v játrech, srdci, plicích, mozku, dutině břišní, synoviální tekutině) Odebírané vzorky neobsahují bílkoviny (např. enzymy), jsou tedy stabilnější a množství látek je možno přímo detekovat. Vzorky lze odebírat plynule po hodiny až dny. (5, 26, 29)

1.8 Validace analytické metody

1.8.1 Přesnost

Přesnost analytické metody je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Počet opakování musí být dostatečně velký, aby umožňoval statistické vyhodnocení. Přesnost by měla být určována na třech úrovních: opakovatelnost, intermediární přesnost a

reprodukovatelnost. Míra přesnosti je vyjádřena pomocí směrodatné odchylky (s) a relativní směrodatné odchylky (RSD). (26)

Požadavek na přesnost pro biologický materiál **RSD = 5 % - 10 %**

1.8.2 Správnost

Tento test charakterizuje těsnost shody mezi výsledkem analýzy C_i a přijatou referenční hodnotou C_0 . Touto referenční hodnotou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je zaručena.

V případě, že se stanovovaná látka nachází v matrici, která může při měření interferovat, testuje se správnost metody pomocí standardního přídávku účinné látky a to buď k samotné matrici nebo k analyzovanému přípravku, její známá koncentrace C_0 , koncentrace stanovená u modelového vzorku je C_i . (26)

Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti (Rec), která se vypočítá podle vzorce:

$$\text{Rec (\%)} = 100 \cdot C_i / C_0$$

Požadavek pro směrodatnou odchylku pro biologický materiál je RSD <10%.

1.8.3 Stabilita

Stabilita se testuje při uchovávání za daných podmínek

- Laboratorní teplota (22° C)
- Lednice (4° C)
- Mrazák (- 25° C)

1.8.4 Linearita

Linearita definuje schopnost metody poskytnout v určitém rozmezí koncentrací měřený signál přímo úměrný měřené koncentraci. Tento test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky v rozmezí +/- 50% očekávané koncentrace. Připraví se pět vzorků standardní látky v uvedeném koncentračním rozmezí a každý se analyzuje třikrát.

Důležitou charakteristikou linearit y přímky je regresní koeficient. Korelační koeficient je definován tak, že nabývá pouze hodnoty v rozmezí $-1 \leq R \leq 1$. Hodnoty blízké 1 signalizují požadovanou silnou lineární závislost.

1.8.5 Mez detekce

Mez detekce (Limit of detection – L_D) daného analytického postupu je definována nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, nikoliv však stanoveno jako exaktní hodnota s určitou nejistotou. Mez detekce je dána množstvím (či koncentrací) složky, která vygeneruje odezvu rovnou součtu průměrné hodnoty blanku plus trojnásobnou jeho směrodatné odchylky (S_{bl}). Jestliže se odezva blanku rovná nule, pak:

$$L_D = 3 s_{bl}$$

Hodnota meze detekce vyjadřuje schopnost analytického systému rozlišit přístrojový šum od identifikované odezvy – analytického signálu. (7)

1.8.6 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti (Limit of quantification – L_Q) je definována jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.

Určuje se jako průměrná hodnota koncentrace slepého vzorku + 10x směrodatná odchylka slepého vzorku. (7, 26)

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce byl vývoj, optimalizace a validace analytických metod využívajících ^{13}C tracery ve studiích užívajících mikrodialýzu. Dále bylo cílem osvojení si základů práce se stabilními izotopy a jejich aplikace v metabolických studiích v klinickém výzkumu.

2.2 Hypotéza

Problematika objasnění metabolických procesů při patologických situacích je v popředí zájmu již řadu let. Doposud však chybí propracované analytické metody, které využívají moderní technologie, tj. např. stabilní izotopy a mikrodialyzační metodu.

Vypracované analytické metody a metodiky interpretace výsledků umožní přesnější sledování tkáňového metabolismu pacientů.

3 METODIKA

3.1 Stanovení glukosy

3.1.1 Přístroje a pomůcky

- Plynový chromatogram Fisions Instruments GC 8000 series (Pragolab, Česká republika)
- Kapilární kolona DB – 5MS (30 m x 0,53 mm x 1,5 µm), (Supelco, Bellefonte, USA)
- Plynový chromatograf 7890A (vybavený autsamplérem) spojený s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem 5975C (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)
- Kapilární kolona CP-Sil 8 CB-MS (Supelco, Bellefonte, USA) 60 m x 0,32 mm, tloušťka filmu 0,5 µm
- Analytické váhy (A + B company 202 M, Česká republika)
- AD koncentrátor 5301 Eppendorf (MEDESA, Česká republika)
- Termoblok QBT 2 (Tectra a.s., Česká republika)
- Chemstation software (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Software Clarity (DataApex, Česká republika)
- Statistický software SigmaStat (Systat software USA)
- Autosamplerové vialky -1 ml, (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Krimpovací víčka – 11mm (Supelco, Bellefonte, USA)

3.1.2 Chemikálie

- glukosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- inositol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- acetanhydrid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- pyridin p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- redestilovaná voda (GORO, Česká republika)
- fyziologický roztok (Braun Melsungen, Německo)
- helium 5.5 (SIAD, Braňany u Mostu)

- vodík 4.0 (SIAD, Braňany u Mostu)
- vzduch 2.2a (SIAD, Braňany u Mostu)
- dusík 5.0 (SIAD, Braňany u Mostu)
- hydroxylamin hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

3.1.3 Příprava roztoků

- Zásobní roztok glukosy 0,05 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,09 mg glukosy a doplněn na 10 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok glukosy 0,5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,90 mg glukosy a doplněn na 10 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok glukosy 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 9,00 mg glukosy a doplněn na 10 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok glukosy 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 18,01 mg glukosy a doplněn na 10 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok glukosy 15 mmol/l byl připraven rozpuštěním 27,03 mg glukosy a doplněn na 10 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok inositolu 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 27,02 mg inositolu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem. (interní standard = IS)

3.1.4 Odběr a příprava vzorku

3.1.4.1 Mikrodialyzát

Vzorky mikrodialyzátu k analýze byly získány elucí z mikrodialyzační sondy, dle experimentu popsaného v kapitole 3.4. Pro validaci a optimalizaci analytické metody byly použity vzorky získané při hemodialýze.

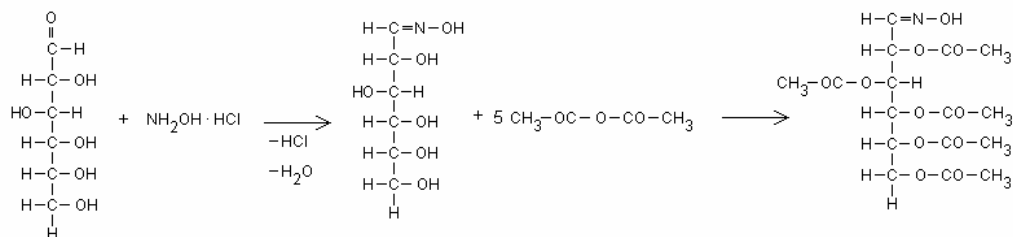
3.1.4.2 Postup derivatizace

- Do vialky se napipetuje 10 μl vzorku a 10 μl inositolu.
- Tato směs se odpaří v koncentrátoru do sucha (program 3 – pro vodné roztoky, 60 °C).
- Do vialky s odparkem se napipetuje 50 μl $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$.

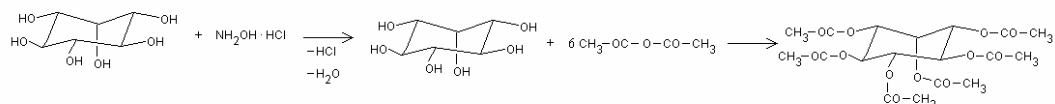
- Vialka se uzavře a nechá se v termobloku 1 hodinu při 50 °C.
- Vialky se ochladí a odvíčkují.
- Přidá se 25 µl acetanhydridu.
- Vialka se opět uzavře a nechá se v termobloku 1 hodinu při 50 °C.
- Vzniklé deriváty (aldonitrilpentacetyl-D-glukosa a hexaacetylinositol) a byly stanovovány metodou GC-FID a GC-MS (Agilent Technologies).

Rovnice derivatizace

Obrázek 1: Rovnice derivatizace glukosy pomocí $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ a acetanhydridu



Obrázek 2 : Rovnice derivatizace inositolu (IS) pomocí $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ a acetanhydridu



3.1.5 Chromatografické podmínky

3.1.5.1 Analýza na přístroji GC-FID a GC-MS

Pro analýzu vzniklého derivátu byly použity tyto podmínky:

Injektor: 250 °C

Nosný plyn: helium o tlaku 190 kPa

Teplotní program kolonového termostatu: počáteční $t = 70$ °C, vzestup po 8 °C na 255 °C

Teplota detektoru (FID): 330 °C

Parametry MS:

- Elektronová ionizace

- Hmotnostní analyzátor - kvadrupól
- Teplota ionizačního zdroje: 250 °C
- Ionizační energie: 70 eV
- Dwell: 0,2 s

Byly monitorovány tyto fragmenty (m/z):

- Derivát glukosy značený $^{13}\text{C}_6$ – 246; 334,1
- Derivát glukosy neznačený – 242; 328,1
- Derivát interního standardu - 373,1; 374,1

3.2 Stanovení laktátu

3.2.1 Přístroje a pomůcky

- Plynový chromatogram Fisions Instruments GC 8000 series (Pragolab, Česká republika),
- Kapilární kolona DB – 5MS (30 m x 0,53 mm x 1,5 μm), (Supelco, Bellefonte, USA)
- Plynový chromatograf 7890A (vybavený autosamplerem) spojený s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem 5975C (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Plynový chromatograf Autosystem XL (vybavený autosamplerem) spojený s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)
- Kapilární kolona CP-Sil 8 CB-MS (Supelco, Bellefonte, USA) 60 m x 0,32 mm, tloušťka filmu 0,5 μm
- Analytické váhy (A + B company 202 M, Česká republika)
- AD koncentrátor 5301 Eppendorf (MEDESA, Česká republika)
- Termoblok QBT 2 (Tectra a.s., Česká republika)
- Turbomass software (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)
- Software Clarity (DataApex, Česká republika)
- Chemstation software (Agilent Technologies, Waldbronn, USA)
- Statistický software SigmaStat (Systat software GmbH, Německo)

- Autosamplerové vialky -1 ml, (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Krimpovací víčka – 11 mm (Supelco, Bellefonte, USA)

3.2.2 *Chemikálie*

- kyselina salicylová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- laktát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- pyridin p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- antracen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2,2-dimethoxypropan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)
- methanol p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- n-propylamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- heptafluorobutyranhydrid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- N-(butyl-dimerthyl-silyl)-2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- redestilovaná (GORO, Česká republika)
- fyziologický roztok (Braun Melsungen, Německo)
- helium 5.5 (SIAD, Braňany u Mostu)
- vodík 4.0 (SAID, Braňany u Mostu)
- vzduch 2.2a (SAID, Braňany u Mostu)
- dusík 5.0 (SAID, Braňany u Mostu)

3.2.3 *Příprava roztoků*

- Zásobní roztok laktátu 0,5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 1,40 mg laktátu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok laktátu 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 2,80 mg laktátu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok laktátu 2,5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 7,00 mg laktátu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem.

- Zásobní roztok laktátu 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 14,00 mg laktátu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok laktátu 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 28,01 mg laktátu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok laktátu 15 mmol/l byl připraven rozpuštěním 42,02 mg laktátu a doplněn na 25 ml fyziologickým roztokem.
- Zásobní roztok salicylátu 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 17,25 mg salicylátu a doplněn do 25 ml fyziologickým roztokem. (interní standard = IS)
- Zásobní roztok antracenu 0,1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,45 mg antracenu a doplněn do 25 ml pyridinu. (standard pro verifikaci hmotnostní stupnice)

3.2.4 Odběr a příprava vzorku

3.2.4.1 Mikrodialyzát

Vzorky mikrodialyzátu k analýze byly získány elucí z mikrodialyzační sondy, dle experimentu popsaného v kapitole 3.4. Pro validaci a optimalizaci analytické metody byly použity vzorky získané při hemodialýze.

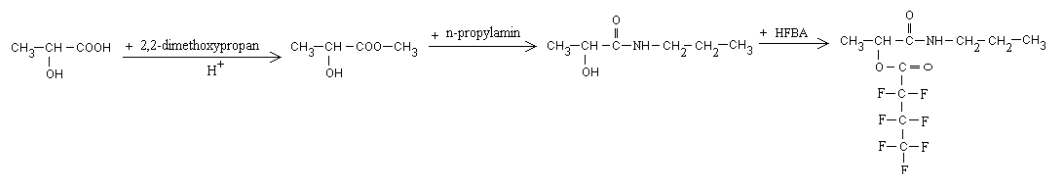
3.2.4.2 Postup derivatizace s heptafluorobutyriánhydridem

- Do vialky se napipetuje 10 µl vzorku a 10 µl salicylátu.
- Tato směs se odpaří pod inertní atmosférou dusíku do sucha.
- Do vialky s odparkem se napipetuje 200 µl 2,2-dimethoxypropanu a 20 µl roztoku HCl (200 µl HCl a 1,8 ml methanolu).
- Vialka se uzavře a nechá se při laboratorní teplotě 1 hodinu v digestoři.
- Poté se přidá 50 µl n-propylaminu, opět se vialka uzavře a vloží se do termobloku na 30 minut při 100 °C.
- Vialka se ochladí a odpaří pod inertní atmosférou dusíku do sucha.
- Přidá se 10 µl heptafluorobutyriánhydridu a nechá se přesně 5 minut derivatizovat
- Znovu se tato směs odpaří pod inertní atmosférou dusíku do sucha.

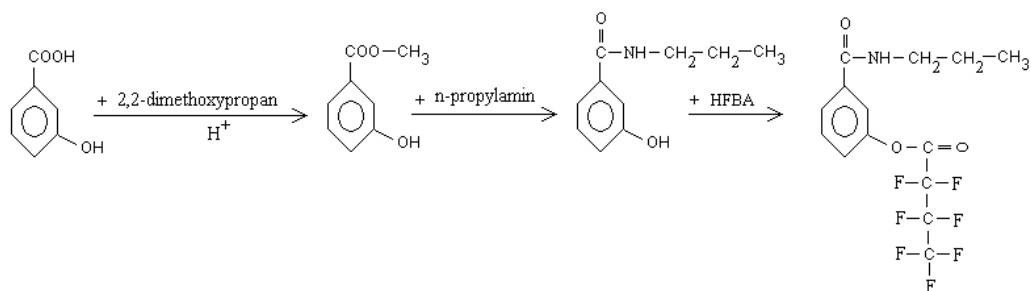
- Odparek se rozpustí v 50 µl ethylacetátu.
- Vzniklé deriváty L-lactin-N-propylamidheptafluorobutyrát a derivát interního standardu byly stanovovány metodou GC-FID a GC-MS (Perkin Elmer).

Rovnice derivatizace s HFBA

Obrázek 3: Rovnice derivatizace laktátu pomocí HFBA



Obrázek 4: Rovnice derivatizace salicylátu (IS) pomocí HFBA

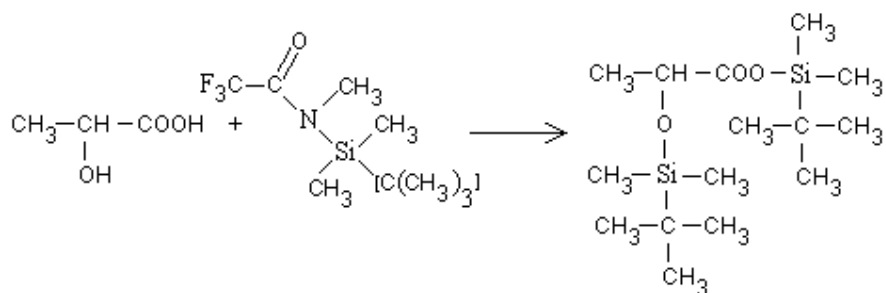


3.2.4.3 Postup derivatizace s (N-(butyl-dimethyl-silyl)-2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamidem)

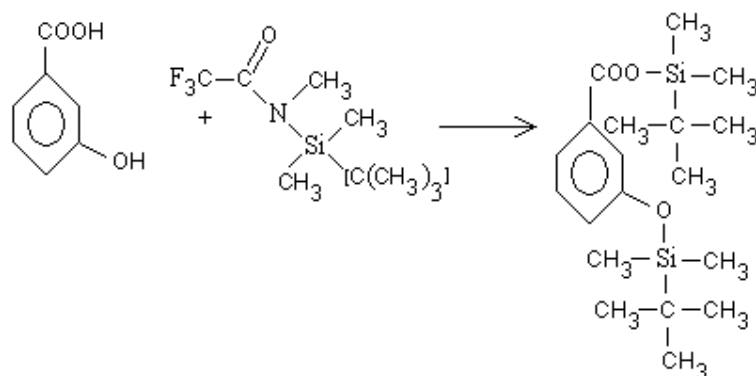
- Do vialky se napipetuje 10 µl vzorku a 10 µl salicylátu.
- Tato směs se odpaří v koncentrátoru do sucha (program 3 – pro vodné roztoky, 45 °C).
- Do vialky s odparekem se napipetuje 25 µl antracenu v pyridinu a 25 µl N-(butyl-dimethyl-silyl)2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamid (MTBSTFA).
- Vialka se uzavře a nechá se v termobloku 45 minut při 50 °C.
- Vzniklé deriváty di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu a derivát interního standardu byly stanovovány metodou GC-FID a GC-MS (Agilent Technologies).

Rovnice derivatizace s MTBSTFA

Obrázek 5: Rovnice derivatizace laktátu pomocí MTBSTFA



Obrázek 6: Rovnice derivatizace salicylátu (IS) pomocí MTBSTFA



3.2.5 Chromatografické podmínky

3.2.5.1 Analýza na přístroji GC-FID a GC-MS

Pro analýzu vzniklého byly použity tyto podmínky:

Injektor: 250 °C

Nosný plyn: helium o tlaku 190 kPa

Teplotní program kolonového termostatu: počáteční t = 70 °C, vzestup po 15 °C na 310°C

Teplota detektoru (FID): 330 °C

Parametry MS:

- Elektronová ionizace
- Hmotnostní analyzátor - kvadrupól
- Teplota ionizačního zdroje: 250 °C
- Ionizační energie: 70 eV
- Dwell: 0,2 s

Pro derivatizaci s HFBA byly monitorovány fragmenty (m/z):

- Derivát neznačeného laktátu – 241
- Derivát laktátu značeného $^{13}\text{C}_1$ – 242
- Derivát laktátu vzniklého při glykolýze - 244
- Derivát salicylátu (IS) – 289; 290

Pro derivatizaci s MTBSTFA byly monitorovány fragmenty (m/z):

- Derivát neznačeného laktátu – 261,1
- Derivát značeného laktátu $^{13}\text{C}_1$ – 262,1
- Derivát laktátu vzniklého při glykolýze – 264,1
- Derivát salicylátu (IS) – 309,2; 310,2
- Antracén – 178,1; 179,1

3.3 Zpracování dat

Výsledky byly zpracovány softwarem Data Apex, Chemstation, Turbomass a statisticky zhodnoceny programem SigmaStat.

3.4 Uspořádání mikrodialýzy

Ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Hradci Králové byla provedena pilotní studie mikrodialýzy svalu a jater potkanů v různých metabolických situacích pro ověření účinnosti mikrodialýzy, optimalizaci průtoku mikrodialyzačního roztoku, dále koncentraci látek v mikrodialyzačním roztoku a ostatních parametrů ovlivňujících mikrodialýzu.

3.4.1 *Přístroje a pomůcky*

- Perfusor Space (B Braun, Německo)
- Mikrodialyzační katetry – sondy CMA/20 4 mm (CMA Microdialysis AB, Švédsko)
- Stříkačky Omnifix 2 ml (B Braun, Německo)
- Infúzní hadička Gama plus 1,8 x 450 LL (Gama, Česká republika)
- Mikozkumavky eppendorf (P-lab, Česka republika)

3.4.2 *Roztoky a chemikálie*

- *Mikrodialyzační roztok*

Ringerův roztok 250 ml (B Braun, Německo)

Sodium L-lactate (3-¹³C) 20% W/W vodný roztok (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. USA)

D-glucose (U-¹³C₆) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. USA)

Byl připraven roztok pro mikrodialýzu se složením 5 mmol/l ¹³C₆ glukosy, 1 mmol/l ¹³C₁ laktátu. Roztok pro mikrodialýzu byl sterilizován filtrací a adjustován do ampulek po 2 ml. Mikrodialyzační roztok byl připraven v lékárně FN Hradec Králové.

- *Glukoso-inzulinový roztok*

20% glukosa (B Braun, Německo)

Humulin (Eli Lilly, Česka republika)

Tento roztok byl připraven přidavkem 0,2 jednotek inzulínu do 10 ml 20% glukosy.

3.4.3 *Postup mikrodialýzy*

Laboratorní potkani (kmen Wistar, cca 400 g, Biotest s.r.o., Konárovice) byly ustájeny ve skupinách po šesti. Aklimatizace po dobu dvou týdnů. Potkani byly krmeny standardní dietou, krmná směs a pitná voda ad libitum. Experiment probíhal v celkové anestézii zvířete pentobarbitalem. Úvodní dávka anestézie byla 50 mg/kg zvířete, dále pak 0,1 µl/100g zvířete bylo aplikováno rychlostí 0,1 ml/min. do peritoneální dutiny. Po otevření břišní dutiny byla zavedena mikrodialyzační sonda do jaterní tkáně a dále byla zavedena druhá sonda do svalu (musculus soleus). Průtok mikrodialyzačního roztoku

byl 2 $\mu\text{l}/\text{min}$.. Po 30-ti minutách byly eluovány vzorky do mikrozkuavek, po dobu 5-ti hodin.

U skupiny potkanů s intervencí inzulínu byla kanylována vena jugularis pro i.v. podání glukoso-inzulínového roztoku (průtok 2 ml/h) po dobu 3 hodin. Kontrolní skupina byla bez aplikace inzulínu.

Mikrodialyzační sondou byl po dobu 6 hodin sledován poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ – glukosy a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -laktátu. Do vnitřního kanálu mikrodialyzační sondy byl rychlostí 1-2 $\mu\text{l}/\text{min}$ injikován perfusorem Ringerův roztok s rozpuštěnou $^{13}\text{C}_6$ -glukosou (5 mmol/l) a $^{13}\text{C}_1$ -laktátem sodným (1 mmol/l), který se následně dostává do mezikruží sondy, které je odděleno od intersticia výše zmíněnou polopropustnou membránou. Ustavuje se rovnováha mezi nízkomolekulárními látkami v intersticiu (obsahují ^{12}C) a uvnitř sondy v mikrodialyzátu (obsahující ^{13}C). Při difuzi, která je klíčovým procesem mikrodialýzy, $^{13}\text{C}_6$ -glukosa a $^{12}\text{C}_6$ -glukosa vzájemně neinterferují a chovají se jako nezávislé sloučeniny. Mikrodialyzační sonda byla zavedena do jaterní tkáně a do svalu. Mikrodialyzát opouštějící sondu byl frakcionovaně sbírán v periodách 30 min. do mikrozkuavek a v těchto frakcích byla pomocí GC-MS stanovena koncentrace glukosy a laktátu a poměr atomů $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v těchto molekulách. Po ukončení experimentu byla zvířata utracena předávkováním anestetika. Vzorky mikrodialyzátů byly ihned zamraženy ($-25\text{ }^\circ\text{C}$).

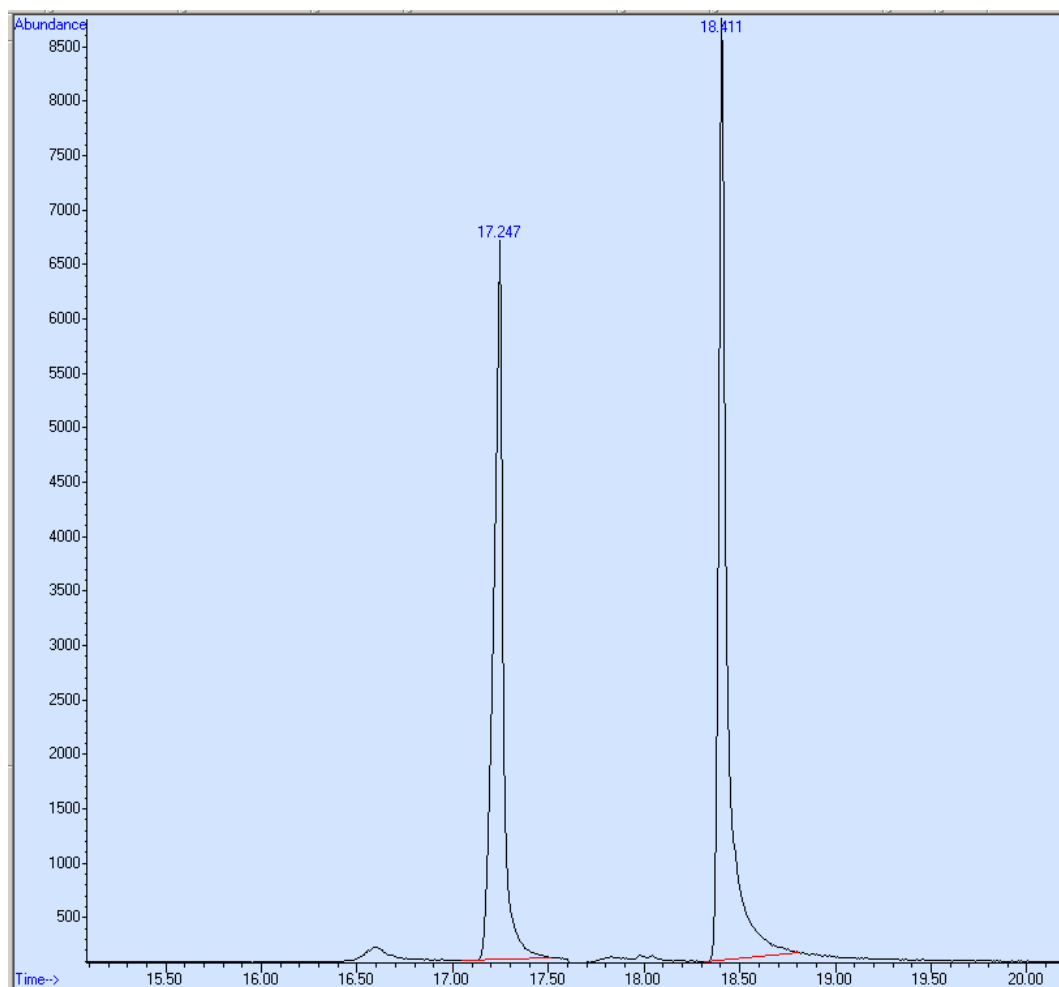
Experiment byl schválen odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č.246/92Sb. v platném znění, § 17, 3c.

4 VÝSLEDKY

4.1 Glukosa

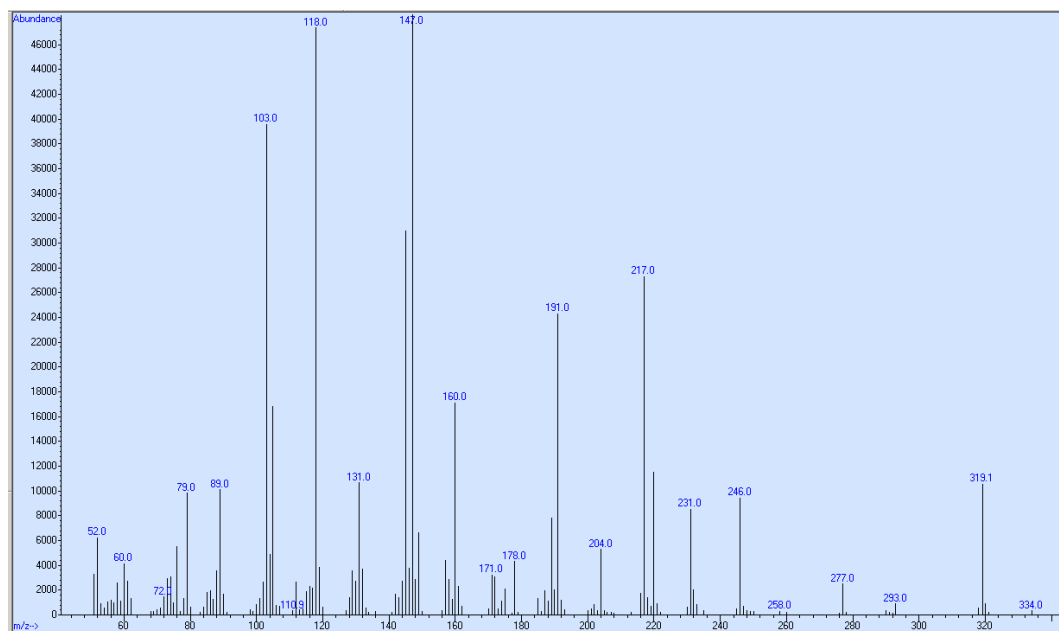
Retenční čas vzniklého derivátu glukosy – aldonitril pentacetyl-D-glukosy (AlpenG) a IS - hexaacetylinositolu za uvedených chromatografických podmínek byl 17,25 minut pro aldonitril pentacetyl-D-glukosu a pro IS 18,4 minut (Obrázek 7). Hmotnostní spektra vzniklých derivátů jsou uvedeny na obrázcích 8 – 10.

Obrázek 7: Chromatografický záznam analýzy reálného vzorku podle chromatografických podmínek uvedených v kapitole 3.1.5.1



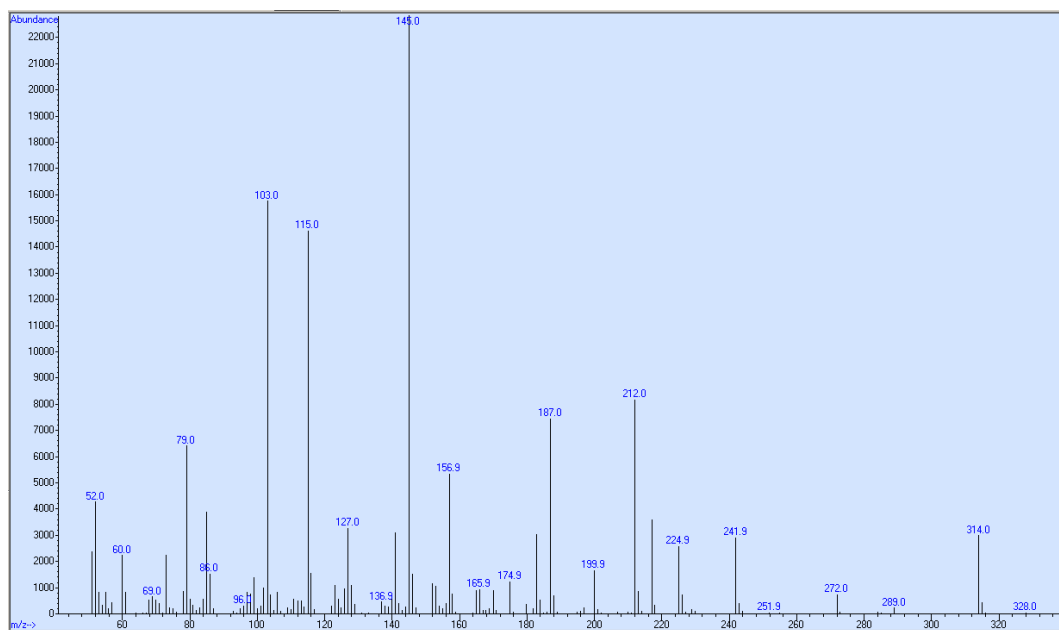
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 8: Hmotnostní spektrum derivátu aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy značeného $^{13}\text{C}_6$



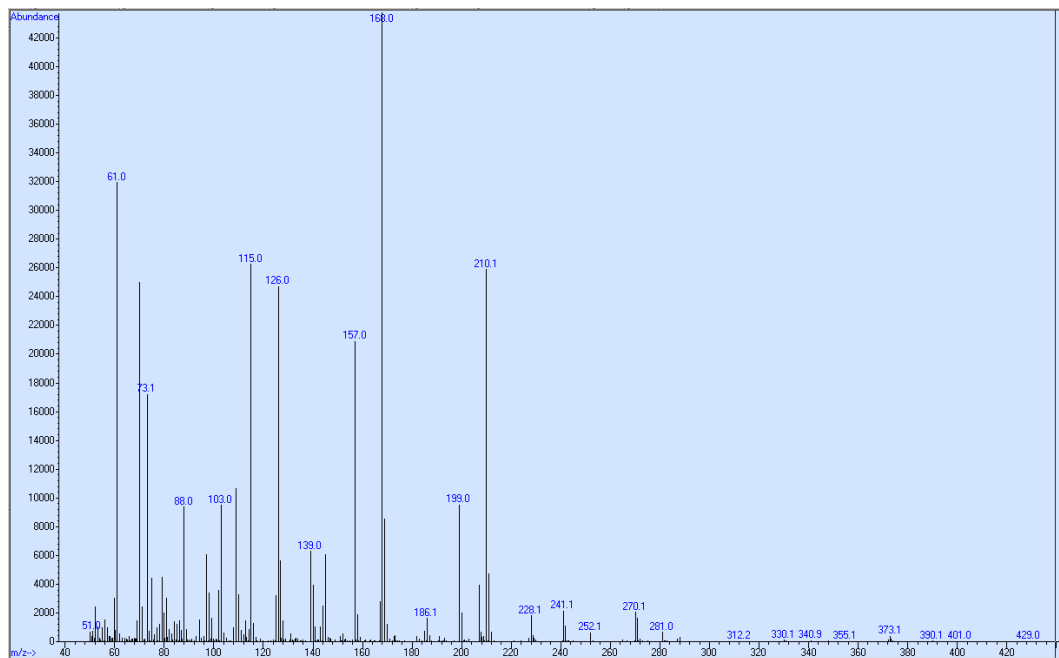
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 9: Hmotnostní spektrum aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 10: Hmotnostní spektrum hexaacetylinositolu



zdroj: vlastní výzkum

4.1.1 Validace metody

Byly stanoveny tyto validační parametry:

- Linearita
- Správnost
- Přesnost
- Stabilita
- Detekční a kvantifikační limit

4.1.1.1 Linearita

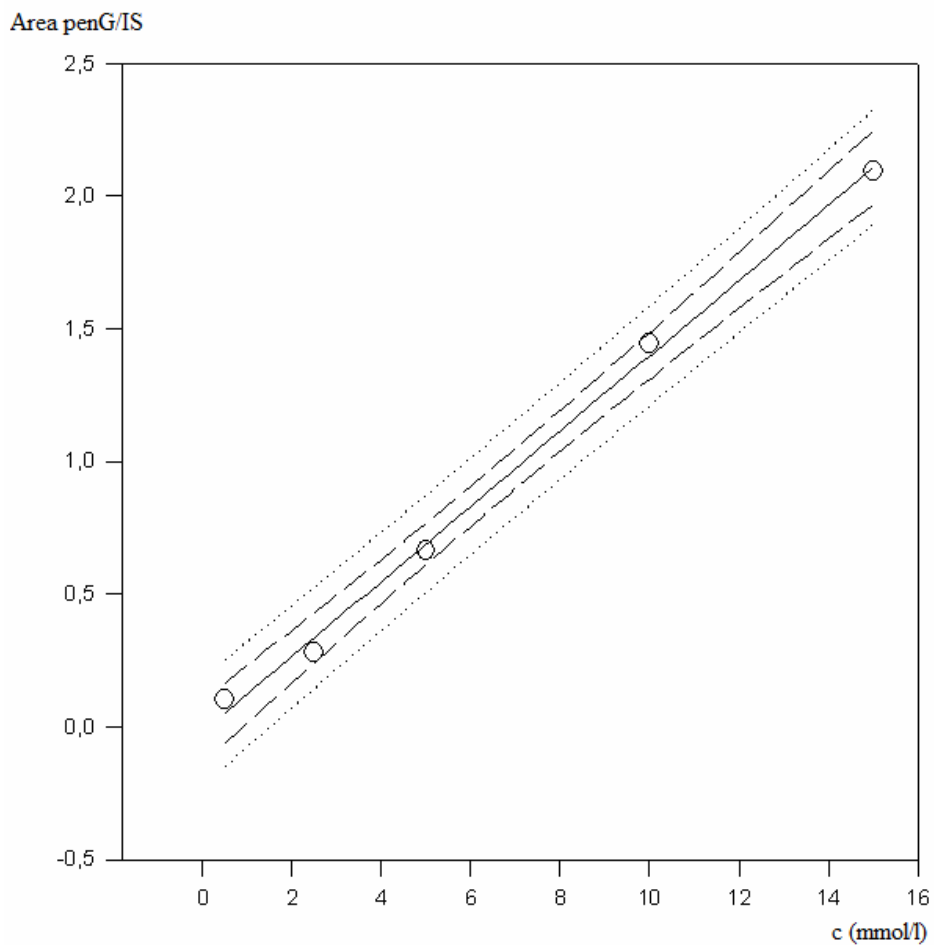
Linearita byla stanovována v rozsahu koncentrací 0,5 mmol/l až 15 mmol/l glukosy. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a na obrázku 11.

Tabulka 1: Linearita – hodnoty ploch píků (Area) vzniklých derivátů a hodnoty poměru Area (AlpenG) /Area (IS) při různých koncentracích

c St (mmol/l)	Area(AlpenG)	Area (IS)	Area (penG)/Area (IS)
0,5	16268	151435	0,11
	18583	192111	0,09
	13115	127451	0,10
průměr			0,10
2,5	38771	13364	0,28
	8959	30842	0,29
	16624	61254	0,27
průměr			0,28
5	109524	164791	0,66
	116103	189044	0,61
	154206	215321	0,71
průměr			0,66
10	241411	165352	1,46
	225404	158633	1,42
	215478	149325	1,44
průměr			1,44
15	32046	149733	2,14
	342953	168938	2,03
	289521	136984	2,11
průměr			2,09

zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 11: Kalibrační přímka aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy (osa x – koncentrace St glukosy, osa y – poměr Area (aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy)/Area (IS))



zdroj: vlastní výzkum

Parametry regresní přímky aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy:

$$A_{\text{AlpenG}} / A_{\text{IS}} = -0,0185 + [0,142 * c(\text{mmol/l})]$$

A_{AlpenG}Area (aldonitril pentacetyl-D-glukosa)

A_{IS}Area (IS)

Korelační koeficient (R^2) byl 0,997, závislost odezvy detektoru na koncentraci látky je lineární.

4.1.1.2 Správnost

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídávku ke vzorku (hemodialyzátu), přidávány byly 3 koncentrační úrovně, od každé koncentrace 3 vzorky (Tabulka 2).

Výtěžnost (Rec) byla vypočítána dle vzorce $Rec = 100 \times c_i / c_o$

c_o je koncentrace vypočítaná (koncentrace látky obsažená ve vzorku + koncentrace přidaného standardu)

c_i koncentrace stanovená GC metodou

Odchylka stanovení (D-deviaton) byla vypočítána takto:

$$D = 100 - Rec$$

- Vzorek 3x
- Vzorek + 1 mmol/l roztok glukosy (10 μ l) 3x
- Vzorek + 2,5 mmol/l roztok glukosy (10 μ l) 3x
- Vzorek + 5 mmol/l roztok glukosy (10 μ l) 3x

původní koncentrace ve vzorku: 6,38 mmol/l

Tabulka 2: Správnost aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy po přídávku St

c přidaného St (mmol/l)	c_i (mmol/l)	c_o (mmol/l)	Rec (%)	D (%)
1	7,41	7,33	101,08	1,08
	7,49	7,33	102,24	2,24
	7,29	7,33	99,44	0,56
průměr	7,39			1,29
2,5	9,04	8,83	98,59	1,41
	9,12	8,83	102,40	2,40

	8,96	8,83	103,37	3,37
průměr	8,96			2,39
5	11,37	11,33	100,41	0,41
	11,46	11,33	101,14	1,14
	11,24	11,33	99,19	0,81
průměr	11,35			0,78

zdroj: vlastní výzkum

4.1.1.3 Přesnost

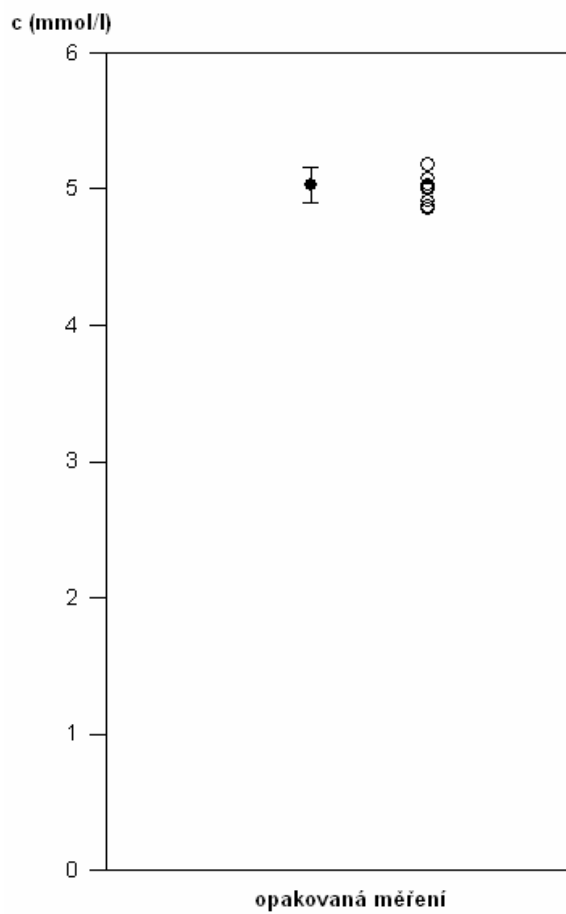
Měřený vzorek (hemodialyzátu) byl rozpipetován do deseti vialek. Každý vzorek byl dále zpracován dle popsaného pracovního postupu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 a na obrázku 12.

Tabulka 3: Přesnost aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy v deseti opakovaných měřeních – hodnoty koncentrace analytů v hemodialyzátu

vzorek	Area (AlpenG)	Area(IS)	Area (AlpenG)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	98095	132663	0,74	5,08
2	88092	116905	0,75	5,18
3	72384	95986	0,75	5,18
4	91471	127787	0,72	4,91
5	115728	163128	0,71	4,87
6	86338	118218	0,73	5,01
7	72384	95986	0,75	5,18
8	95427	134915	0,71	4,85
9	89563	122255	0,73	5,03
10	67468	92605	0,73	5,00
			průměrná c	5,03
			s	0,13
			RSD (%)	2,51

zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 12: Statistické porovnání dat – bodový graf – stanovení přesnosti – vzorky hemodialyzátu (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

4.1.1.4 Detekční a kvantifikační limit

Limit detekce byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 1 $\mu\text{mol/l}$.

Limit kvantifikace byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 5 $\mu\text{mol/l}$.

4.1.1.5 Stabilita

Testovány byly vzorky o koncentraci 5 mmol/l. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (c_x), (Tabulka 4-7). Stabilita byla testována při uchování za daných podmínek:

- Laboratorní teplota (22° C)
- Lednice (4° C)
- Mrazák (- 25° C)

Koncentrace je vyjádřena plochou píku Area (AlpenG) /Area (IS) a přepočtena lineární regresní rovnicí (kap. 4.1.1.1).

Tabulka 4: Stabilita aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy v čase (den 0)

den 0	Area (AlpenG)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	0,74	5,08
	0,75	5,18
	0,75	5,18
c_x		5,14
4 °C	0,72	4,91
	0,73	5,01
	0,75	5,18
c_x		5,03
-25 °C	0,71	4,85
	0,73	5,03
	0,73	5,00
c_x		4,96

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 5: Stabilita aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy v čase (den 7)

den 7	Area (AlpenG)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	0,72	4,97

	0,75	5,14
	0,74	5,11
c_x		5,07
4 °C	0,73	5,04
	0,75	5,13
	0,75	5,15
c_x		5,11
-25 °C	0,74	5,06
	0,75	5,15
	0,72	4,95
c_x		5,05

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 6: Stabilita aldonitrilu pentacetyl-D-glukosy v čase (den 21)

den 21	Area (AlpenG)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	0,69	4,71
	0,70	4,79
	0,68	4,67
c_x		4,72
4 °C	0,75	5,12
	0,70	4,81
	0,77	5,27
c_x		5,07
-25 °C	0,73	5,01
	0,72	4,95
	0,75	5,13
c_x		5,03

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 7: Stabilita aldonitridu pentacetyl-D-glukosy v čase (den 42)

Den 42	Area (AlpenG)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	0,65	4,43
	0,67	4,58
	0,67	4,61
c_x		4,54
4 °C	0,67	4,62
	0,69	4,75
	0,71	4,89
c_x		4,76
-25 °C	0,73	5,02
	0,74	5,08
	0,75	5,18
c_x		5,10

zdroj: vlastní výzkum

Ze získaných dat (Tabulka 4-7) byly vypočteny odchylky (D):

$$D = \frac{100 * c_x(\text{den7,21,42})}{c_x(\text{den0})}$$

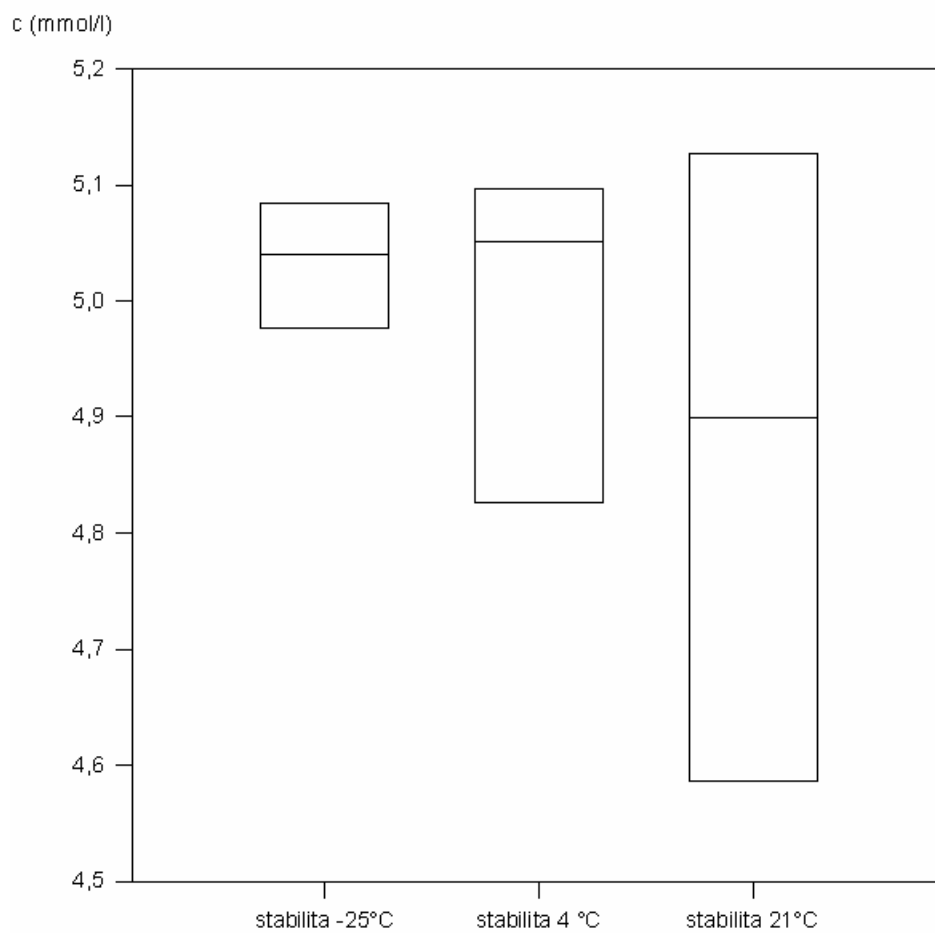
Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8. Statistické zhodnocení dat je na obrázcích 13 a 14.

Tabulka 8: Stabilita – průměrné koncentrace při dané teplotě a jejich odchylka

Den	- 25 °C	100 - D (%)	4 °C	100 - D (%)	21 °C	100 - D (%)
0	4,96	0	5,03	0	5,14	0
7	5,05	1,86	5,11	1,43	5,07	1,38
21	5,03	1,38	5,07	0,64	4,72	8,18
42	5,10	2,73	4,76	5,54	4,54	11,72

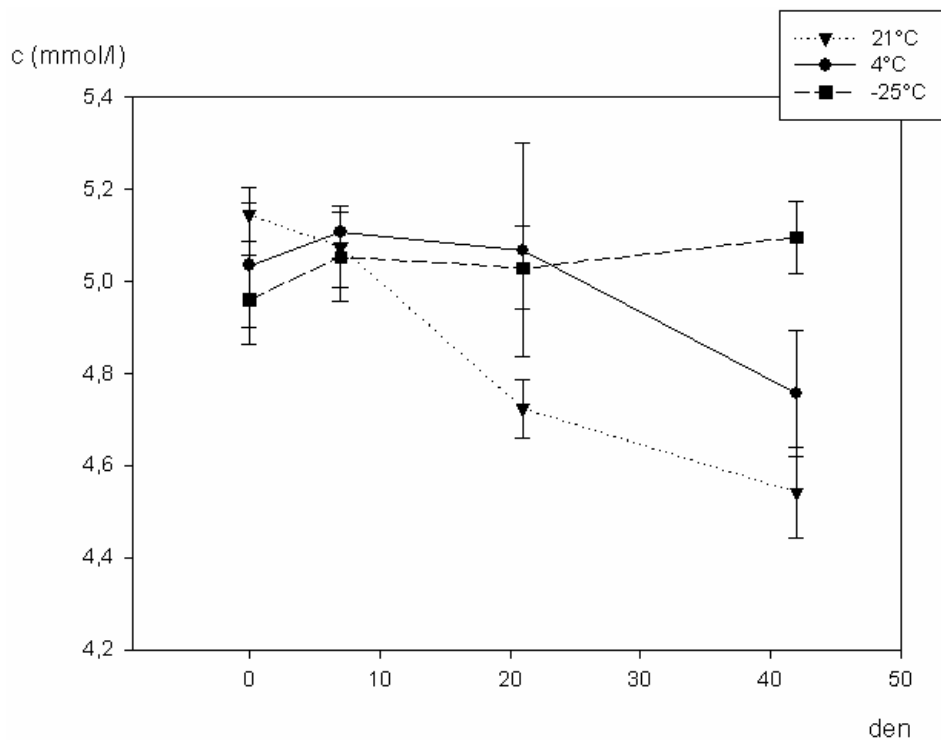
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 13: Statistické porovnání dat – stabilita derivátů – krabicový graf (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 14: Statistické porovnání dat –koncentrace pentacetylu-D- glukosy v čase 0 – 42 dnů.
(software SigmaStat)



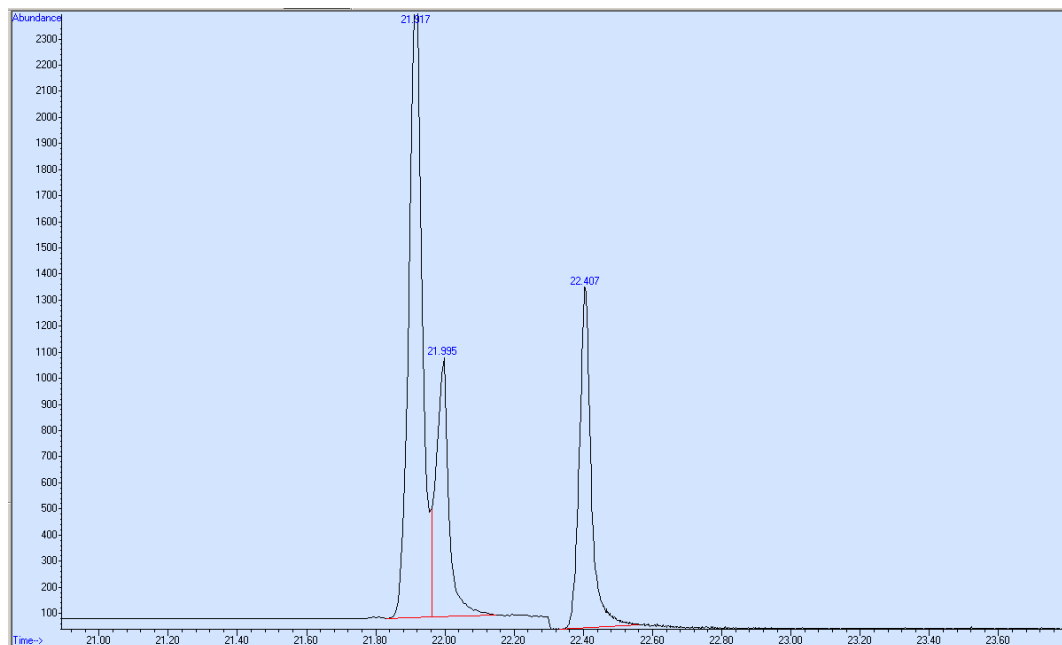
zdroj: vlastní výzkum

4.1.2 *Optimalizace metody*

4.1.2.1 *Optimalizace chromatografické analýzy*

Běžně je glukosa pro stanovení plynovou chromatografií derivatizována pouze acetanhydridem, který však při použití kapilární kolony CP-Sil 8 CB-MS (60 m x 0,32 mm) poskytuje interferenci v chromatografickém záznamu - dvojitý pík (Obrázek 15) pravděpodobně vzniklých anomerů pentacetyl-glukopyranosy, proto bylo nutno derivatizovat aldehydickou skupinu glukosy nejprve hydroxylamin hydrochloridem.

Obrázek 15: Chromatografický záznam analýzy reálného vzorku derivatizovaného pouze acetanhydridem – retenční čas pentacetyl-D-glukopyranosy 21,9 min.



zdroj: vlastní výzkum

4.1.2.2 Optimalizace času derivatizace

V průběhu optimalizace byly testovány vzorky při 50 °C, pro zjištění délky trvání derivatizace. Vzorky hemodialyzátu o koncentraci 5 mmol/l byly připraveny výše popsaným způsobem a hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (c_x), (Tabulka 9).

Tabulka 9: Optimalizace – koncentrace derivátů glukosy v závislosti na čase

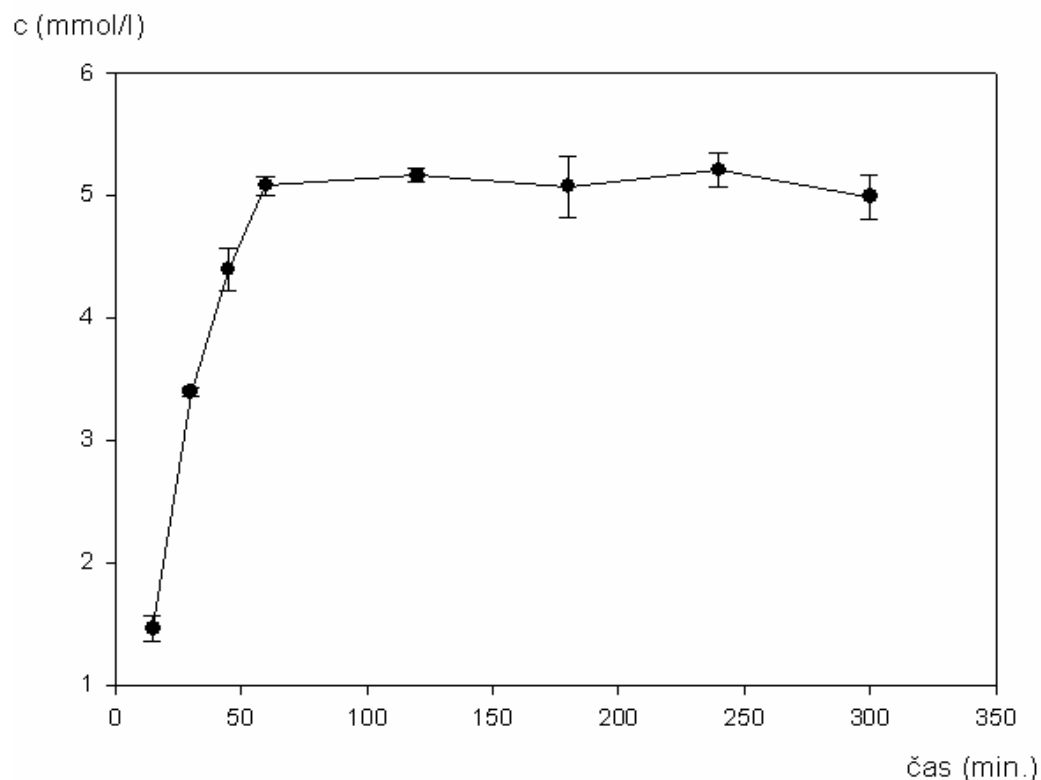
čas (min)	Area (AlpenG)/Area (IS)	c (mmol/l)
15	0,24	1,4
	0,26	1,59
	0,24	1,39
c_x		1,46
30	0,51	3,42

	0,51	3,39
	0,50	3,35
c_x		3,39
45	0,64	4,33
	0,63	4,25
	0,67	4,58
c_x		4,39
60	0,74	5,07
	0,73	5,00
	0,75	5,16
c_x		5,08
120	0,74	5,10
	0,76	5,19
	0,75	5,19
c_x		5,16
180	0,72	4,92
	0,72	4,93
	0,78	5,36
c_x		5,07
240	0,76	5,20
	0,74	5,07
	0,78	5,35
c_x		5,20
300	0,72	4,97
	0,75	5,17
	0,70	4,81
c_x		4,99

zdroj: vlastní výzkum

Optimální čas pro derivatizaci byl zvolen v 60 min. Derivatizace v čase 15min. až 45min. vykazovala pomalejší nárůst výtěžku derivátu (Obrázek 16).

Obrázek 16: Statistické porovnání dat – optimalizace doby trvání derivatizace glukosy



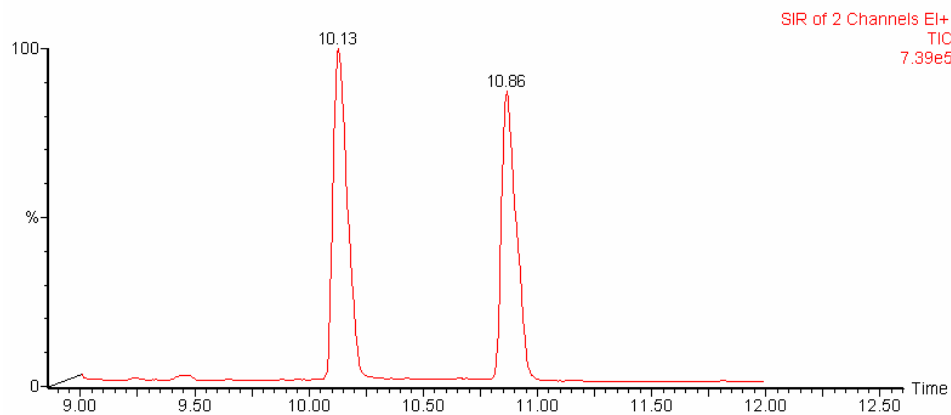
zdroj: vlastní výzkum

4.2 Laktát

- Derivatizace s HFBA

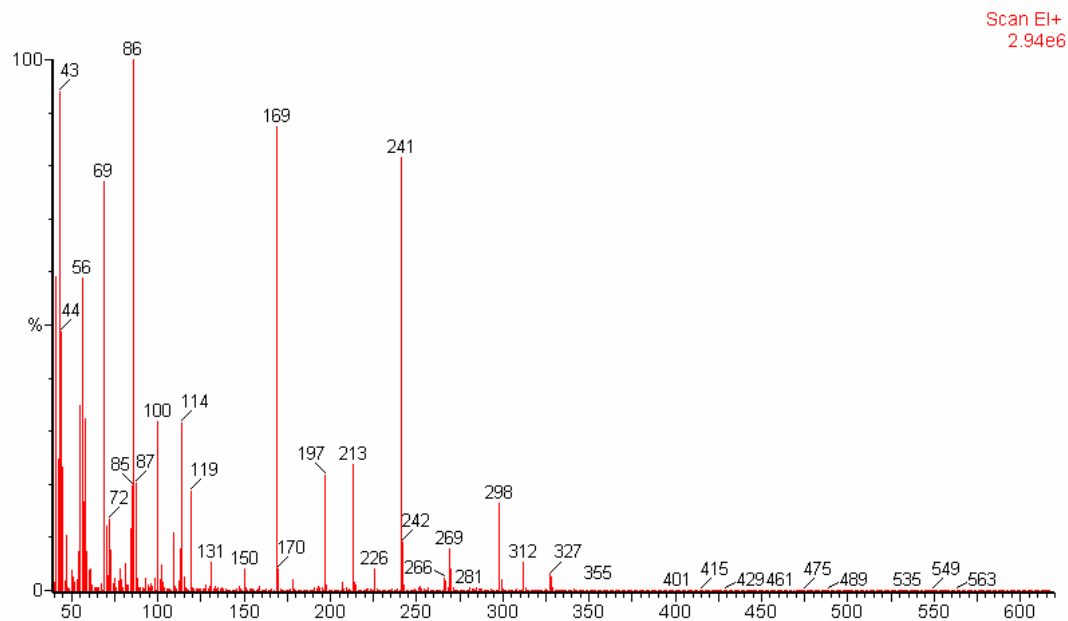
Retenční čas vzniklého derivátu laktátu a IS za uvedených chromatografických podmínek byl pro L-lactin-n-propylamidheptafluorobutyrate (LPHB) 10,13 minut a pro derivát salicylátu 10,86 minut (Obrázek 17). Hmotnostní spektrum LPHB je na obrázku 18.

Obrázek 17: Chromatografický záznam analýzy reálného vzorku derivatizovaného heptafluorobutyranhydridem – retenční čas L-lactin-n-propylamidheptafluorobutyrátu a IS



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 18: Hmotnostní spektrum derivátu laktátu (L-lactin-n-propylamidheptafluorobutyrát)

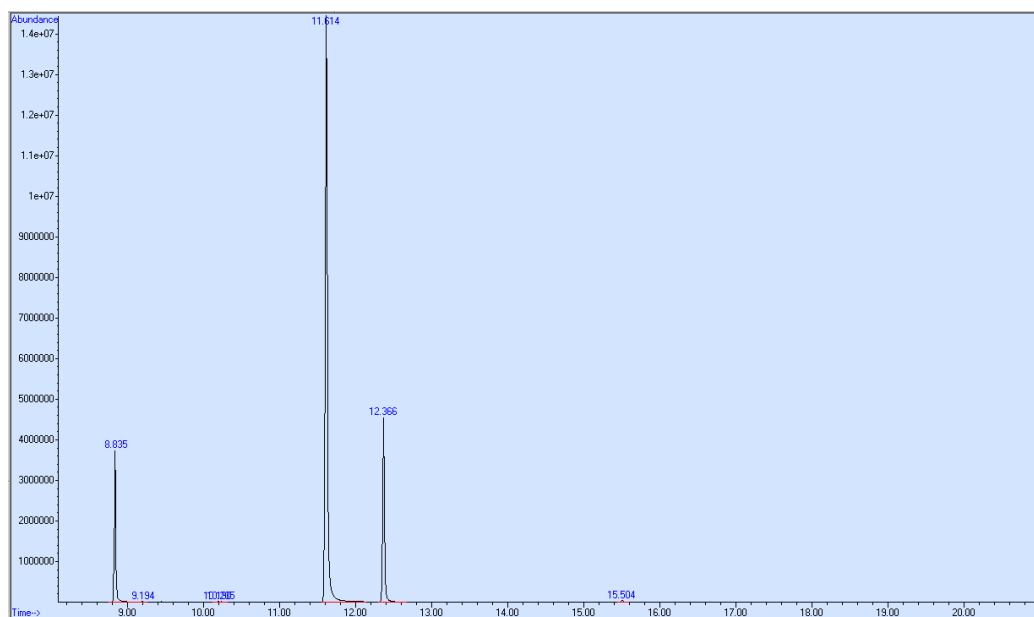


zdroj: vlastní výzkum

- Derivatizace s MTBSTFA

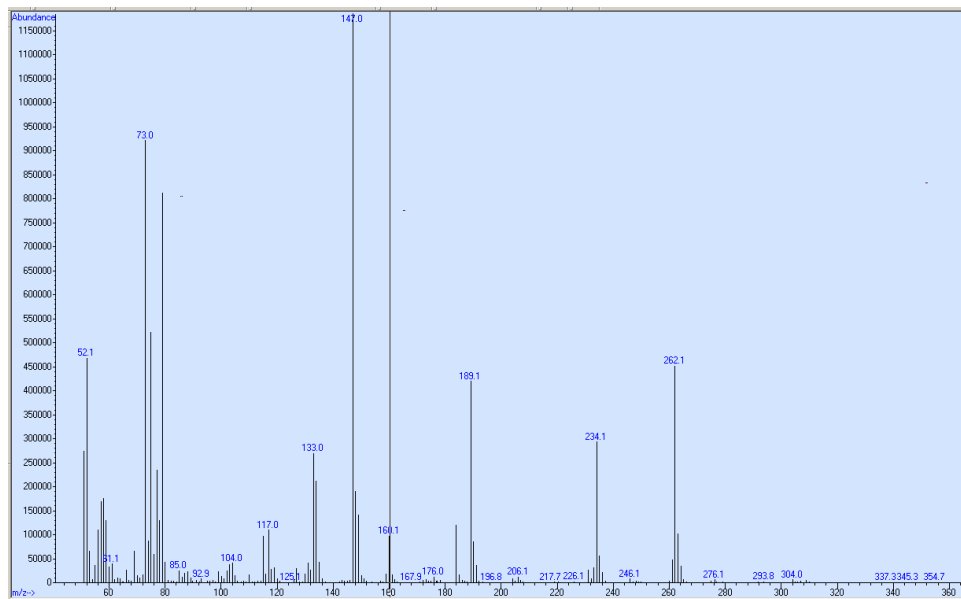
Retenční čas vzniklého derivátu laktátu a IS za uvedených chromatografických podmínek byl pro di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu (DBMSL) 8,8 minut a pro derivát salicylátu 12,3 minut, retenční čas antracenu byl 11,6 minut (Obrázek 19). Hmotnostní spektra derivátu značeného a neznačeného laktátu, IS a antracenu jsou na obrázcích 20 – 23.

Obrázek 19: Chromatografický záznam analýzy reálného vzorku derivatizovaného MTBSTFA podle chromatografických podmínek uvedených v kapitole 3.2.5.1



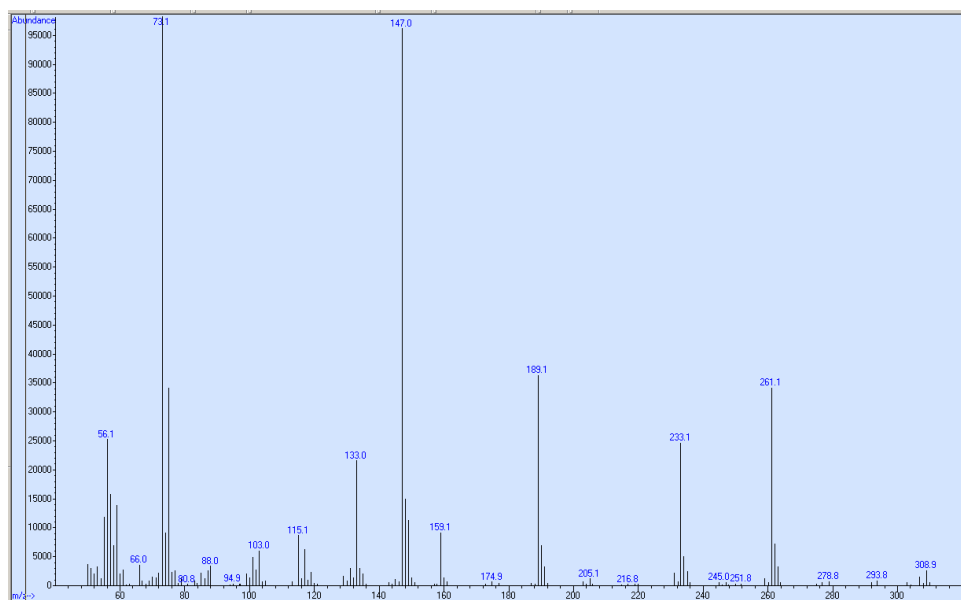
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 20: Hmotnostní spektrum značeného $^{13}\text{C}_1$ derivátu di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu



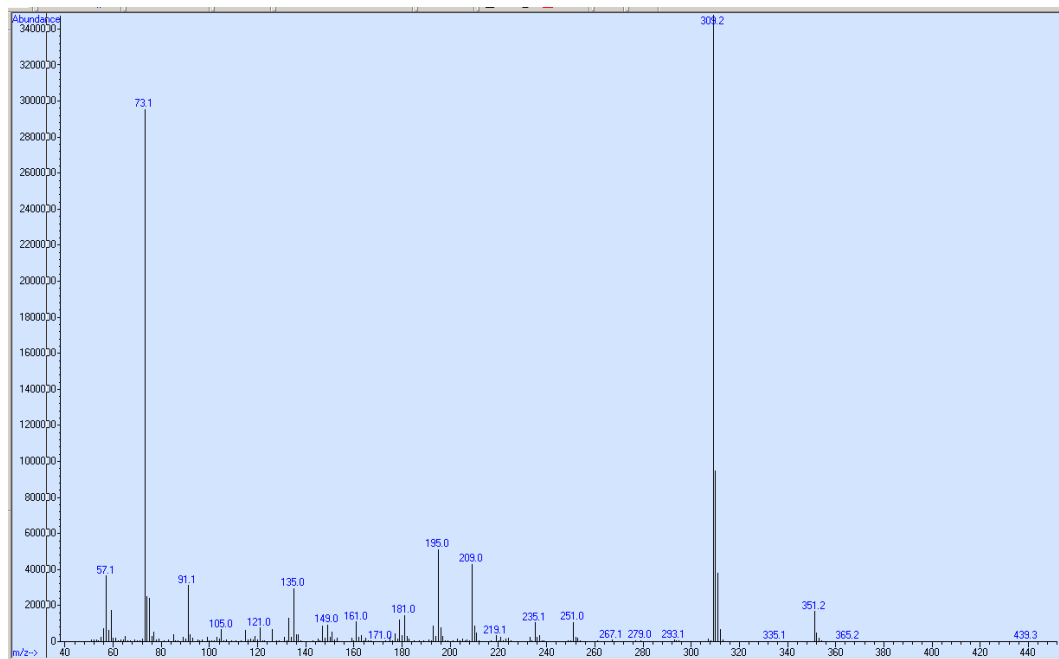
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 21: Hmotnostní spektrum neznačeného derivátu di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu



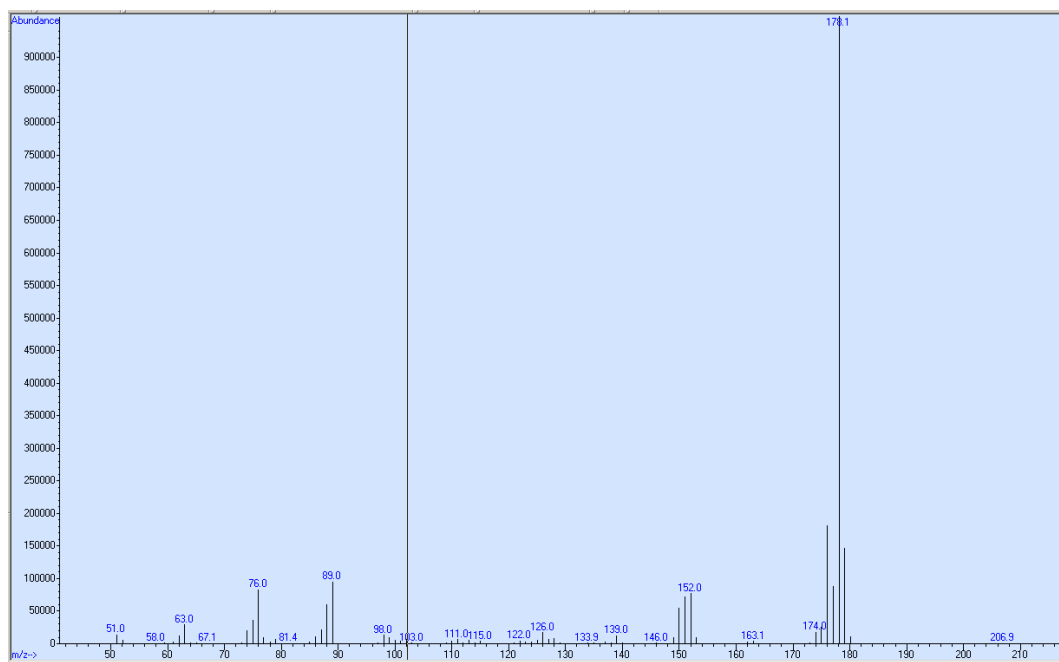
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 22: Hmotnostní spektrum derivátu salicylátu



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 23: Hmotnostní spektrum antracenu



zdroj: vlastní výzkum

4.2.1 Validace metody pro derivatizaci s HFBA

Byly stanoveny tyto validační parametry:

- Linearita
- Správnost
- Přesnost
- Stabilita
- Detekční a kvantifikační limit

4.2.1.1 Linearita

Linearita byla stanovována v rozsahu koncentrací 0,5 mmol/l až 10 mmol/l laktátu. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (Tabulka 10 a Obrázek 24)

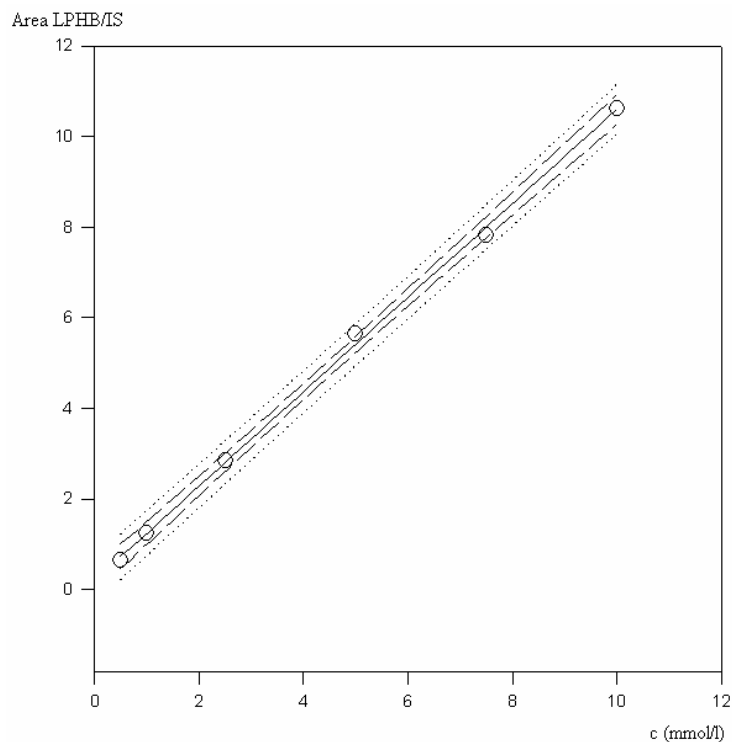
Tabulka 10: Linearita – hodnoty ploch píků (Area) vzniklých derivátů a hodnoty poměru Area (LPHB) /Area (IS) při různých koncentracích

c St (mmol/l)	Area (LPHB)	Area IS	Area (LPHB)/Area (IS)
0,5	599647	975553	0,61
	514165	78844	0,65
	662253	98844	0,67
průměr			0,65
1	1288595	1045234	1,23
	1254119	1036483	1,21
	131681	1017685	1,29
průměr			1,25
2,5	2904279	1100084	2,64
	2976347	1060589	2,81
	3173275	1029101	3,08
průměr			2,84
5	5661252	1056983	5,36
	5624326	99901	5,63

	5628532	949449	5,93
průměr			5,64
7,5	673922	857753	7,86
	7995879	1044787	7,65
	7202558	906155	7,95
průměr			7,82
10	9068589	884259	10,26
	9159908	854834	10,72
	3503219	321232	10,91
průměr			10,63

zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 24: Kalibrační přímka L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyátu (osa x – koncentrace St laktátu, osa y – poměr Area (LPHB)/Area (IS))



zdroj: vlastní výzkum

Parametry regresní přímky L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyátu:

$$A_{\text{LPHB}}/A_{\text{IS}} = 0,215 + [1,039 * c(\text{mmol/l})]$$

A_{LPHB}Area (L-lactin-n-propylamidheptafluorobutyát)

A_{IS}Area (IS)

Korelační koeficient (R^2) byl 0,999, závislost odezvy detektoru na koncentraci látky je lineární.

4.2.1.2 *Správnost*

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídávku ke vzorku (hemodialyzátu), přidávány byly tři koncentrační úrovně, od každé koncentrace tři vzorky (Tabulka 11).

Výtěžnost (Rec) byla vypočítána dle vzorce **Rec = 100 × c_i/c_o**

c_o je koncentrace vypočítaná (koncentrace látky obsažená ve vzorku + koncentrace přidaného standardu)

c_i koncentrace stanovená GC metodou

Odchylka stanovení (D) byla vypočítána takto:

$$D = 100 - \text{Rec}$$

- | | |
|---|----|
| ▪ Vzorek | 3x |
| ▪ Vzorek + 1 mmol/l roztok laktátu (10 μ l) | 3x |
| ▪ Vzorek + 2,5 mmol/l roztok laktátu (10 μ l) | 3x |
| ▪ Vzorek + 5 mmol/l roztok laktátu (10 μ l) | 3x |

původní koncentrace ve vzorku: 0,67 mmol/l

Tabulka 11: Správnost L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyrátu po přidavku St

c přidánoho St (mmol/l)	c_i (mmol/l)	c_o (mmol/l)	Rec (%)	D (%)
1	1,632	1,67	97,99	2,01
	1,74	1,67	104,23	4,23
	1,63	1,67	97,60	2,40
průměr	1,66			2,88
2,5	3,05	3,17	96,37	3,63
	3,04	3,17	95,90	4,10
	3,206	3,17	101,26	1,26
průměr	3,10			3,00
5	5,36	5,67	94,52	5,48
	5,52	5,67	97,44	2,56
	5,46	5,67	96,45	3,55
průměr	5,45			3,86

zdroj: vlastní výzkum

4.2.1.3 Přesnost

Měřený vzorek (hemodialyzátu) byl rozpipetován do deseti vialek. Každý vzorek byl dále zpracován dle popsaného pracovního postupu (kap. 3.2.4.2). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12 a na obrázku 25.

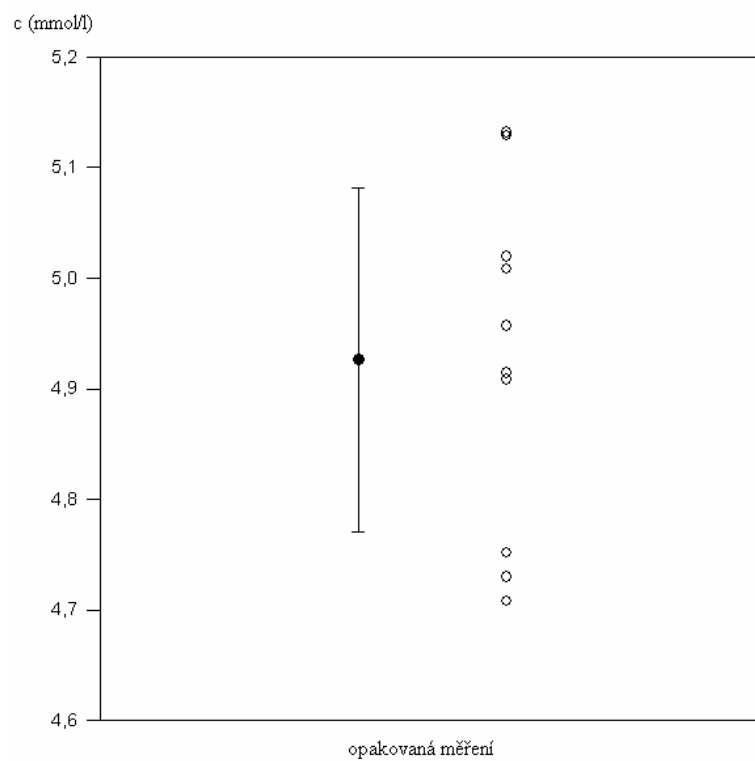
Tabulka 12: Přesnost L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyrátu v deseti opakováních – hodnoty koncentrace analytů v hemodialyzátu

vzorek	Area (LPHB)	Area (IS)	Area (LPHB)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	2697539	528275	5,11	4,71
2	5204186	979193	5,31	4,91
3	5244043	965687	5,43	5,02
4	5356323	966182	5,54	5,13
5	4955274	966137	5,13	4,73

6	2820476	53007	5,32	4,91
7	175873	32781	5,37	4,96
8	327189	603821	5,42	5,01
9	2606311	505918	5,15	4,75
10	3481069	627601	5,55	5,13
			průměrná c	4,93
			s	0,16
			RSD (%)	3,15

zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 25: Statistické porovnání dat – bodový graf – stanovení přesnosti derivátu laktátu – LPHB (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

4.2.1.4 Detekční a kvantifikační limit

Limit detekce byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 1 $\mu\text{mol/l}$.

Limit kvantifikace byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 5 $\mu\text{mol/l}$

4.2.1.5 Stabilita

Testovány byly vzorky o koncentraci 5 mmol/l. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (c_x), (Tabulky 13 – 16). Stabilita byla testována při uchovávání za daných podmínek:

- Laboratorní teplota (22 °C)
- Lednice (4 °C)
- Mrazák (- 25 °C)

Koncentrace je vyjádřena poměry ploch píku Area (LPHB) /Area (IS) a přepočteny lineární regresní rovnicí (kap. 4.2.1.1)

Tabulka 13: Stabilita L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyátu v čase (den 0)

den 0	Area (LPHB)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	5,31	4,91
	5,43	5,02
	5,54	5,13
c_x		5,02
4 °C	5,13	4,73
	5,32	4,91
	5,37	4,96
c_x		4,87
-25 °C	5,42	5,01
	5,15	4,75
	5,55	5,13
c_x		4,96

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 14: Stabilita L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyřátu v čase (den 7)

den 7	Area (LPHB)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	5,00	4,61
	5,12	4,72
	5,26	4,85
c _x		4,73
4 °C	5,36	4,95
	5,31	4,90
	5,26	4,86
c _x		4,90
-25 °C	5,39	4,98
	5,49	5,07
	5,49	5,08
c _x		5,04

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 15: Stabilita L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyřátu v čase (den 21)

den 21	Area (LPHB)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	4,80	4,41
	4,69	4,31
	4,61	4,23
c _x		4,32
4 °C	5,20	4,80
	5,15	4,75
	5,33	4,92
c _x		4,82
-25 °C	5,40	4,99
	5,46	5,05
	5,49	5,08
c _x		5,09

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 16: Stabilita L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyřátu v čase (den 42)

Den 42	Area (LPHB)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	4,26	3,89
	3,98	3,62
	4,14	3,77
c _x		3,76
4 °C	5,34	4,93
	5,13	4,73
	5,15	4,75
c _x		4,80
-25 °C	5,52	5,10
	5,40	4,99
	5,47	5,06
c _x		5,05

zdroj: vlastní výzkum

Ze získaných dat (Tabulka 13-16) byly vypočteny odchylky (D):

$$D = \frac{100 * c_x(\text{den}7,21,42)}{c_x(\text{den}0)}$$

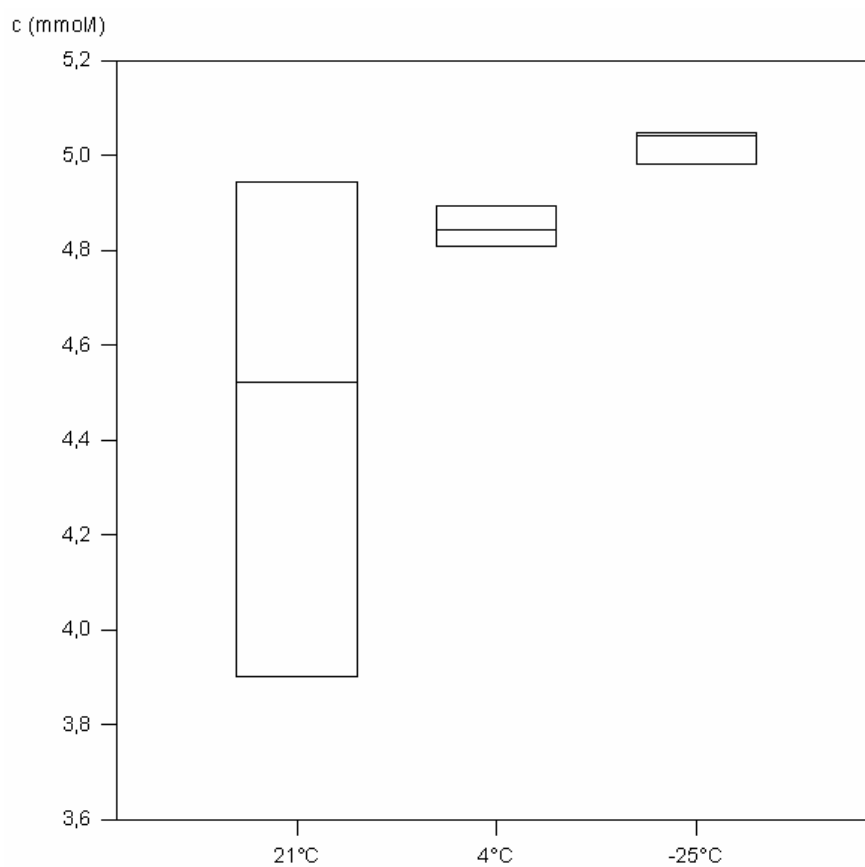
Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17. Statistické zhodnocení dat je na obrázcích 26 a 27.

Tabulka 17: Stabilita – průměrné koncentrace při dané teplotě a jejich odchylka

Den	- 25 °C	100 - D (%)	4 °C	100 - D (%)	21 °C	100 - D (%)
0	4,96	0	4,87	0	5,02	0
7	5,04	1,61	4,90	0,61	4,73	5,85
21	5,04	1,61	4,82	1,03	4,32	13,99
42	5,05	1,81	4,80	1,44	3,76	25,07

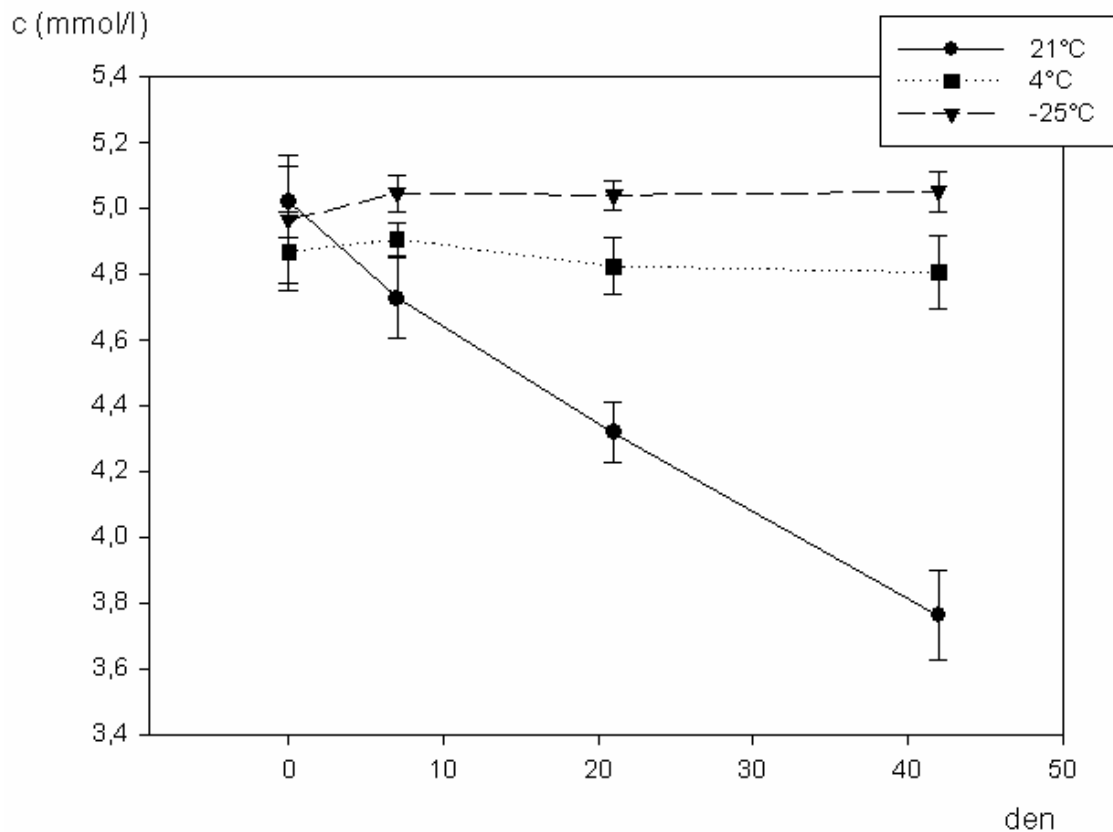
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 26: Statistické porovnání dat – stabilita derivátu laktátu – krabicový graf (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 27: Statistické porovnání dat – stabilita – koncentrace L-lactinu-n-propylamidheptafluorobutyrate v čase 0 – 42 dnů (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

4.2.2 Optimalizace metody pro derivatizaci s HFBA

V průběhu optimalizace byly testovány vzorky při 50 °C, pro zjištění nejvhodnějšího času derivatizace. Vzorky hemodialyzátu o koncentraci 5 mmol/l byly připraveny výše popsáním způsobem (kap.3.2.4.2) a hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (c_x). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 18.

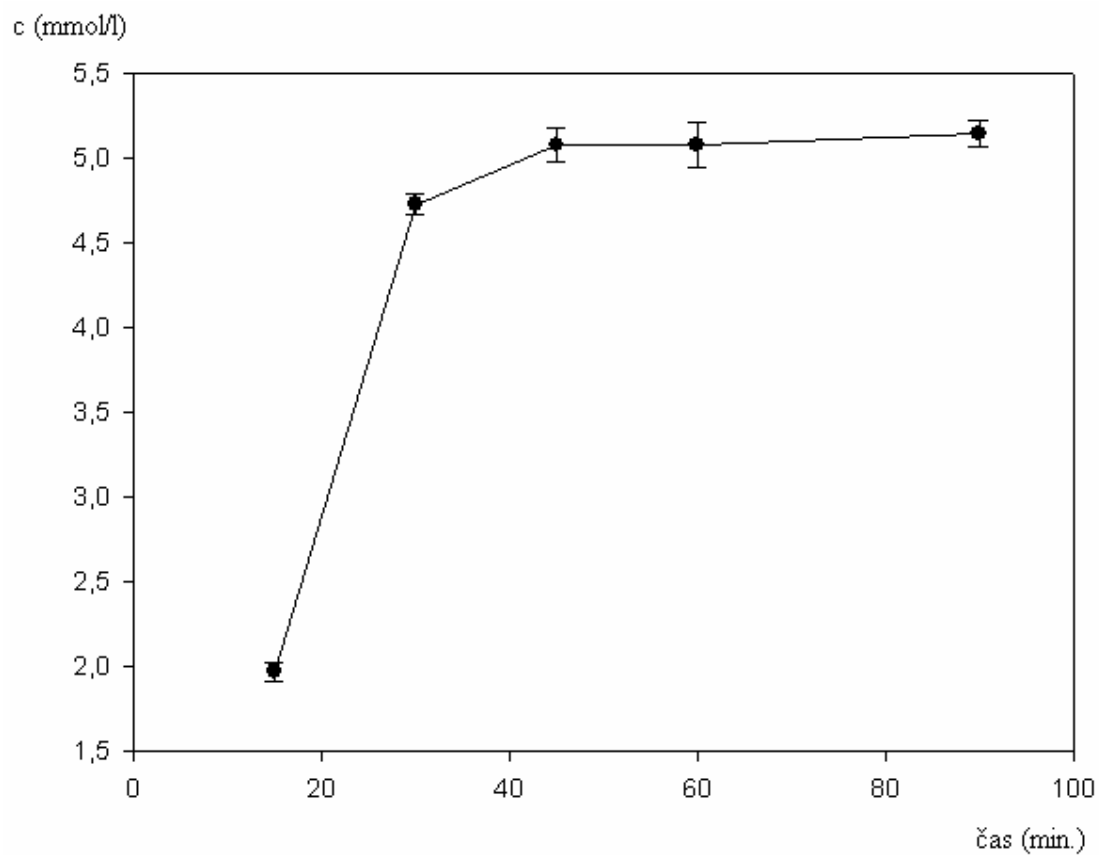
Tabulka 18: Optimalizace – koncentrace derivátu laktátu - LPHB v závislosti na čase

čas (min)	Area (LPHB)/Area (IS)	c (mmol/l)
15	2,26	1,97
	2,32	2,04
	2,21	1,92
		1,97
30	5,08	4,68
	5,11	4,71
	5,20	4,80
c_x		4,73
45	5,60	5,18
	5,48	5,07
	5,39	4,98
c_x		5,08
60	5,45	5,04
	5,65	5,23
	5,38	4,97
c_x		5,08
90	5,53	5,12
	5,65	5,23
	5,50	5,09
c_x		5,15

zdroj: vlastní výzkum

Optimální čas pro derivatizaci byl zvolen v 45min. Derivatizace v čase 15min. až 30min. vykazovala pomalejší nárůst výtěžku derivátu (Obrázek 28).

Obrázek 28: Statistické porovnání dat – optimalizace derivátu laktátu/IS



zdroj: vlastní výzkum

4.2.3 Validace metody pro derivatizaci s MTBSTFA

Byly stanoveny tyto validační parametry:

- Linearita
- Správnost
- Přesnost
- Stabilita
- Detekční a kvantifikační limit

4.2.3.1 Linearita

Linearita byla stanovována v rozsahu koncentrací 0,1 mmol/l až 10 mmol/l laktátu. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (Tabulka 19, Obrázek 29).

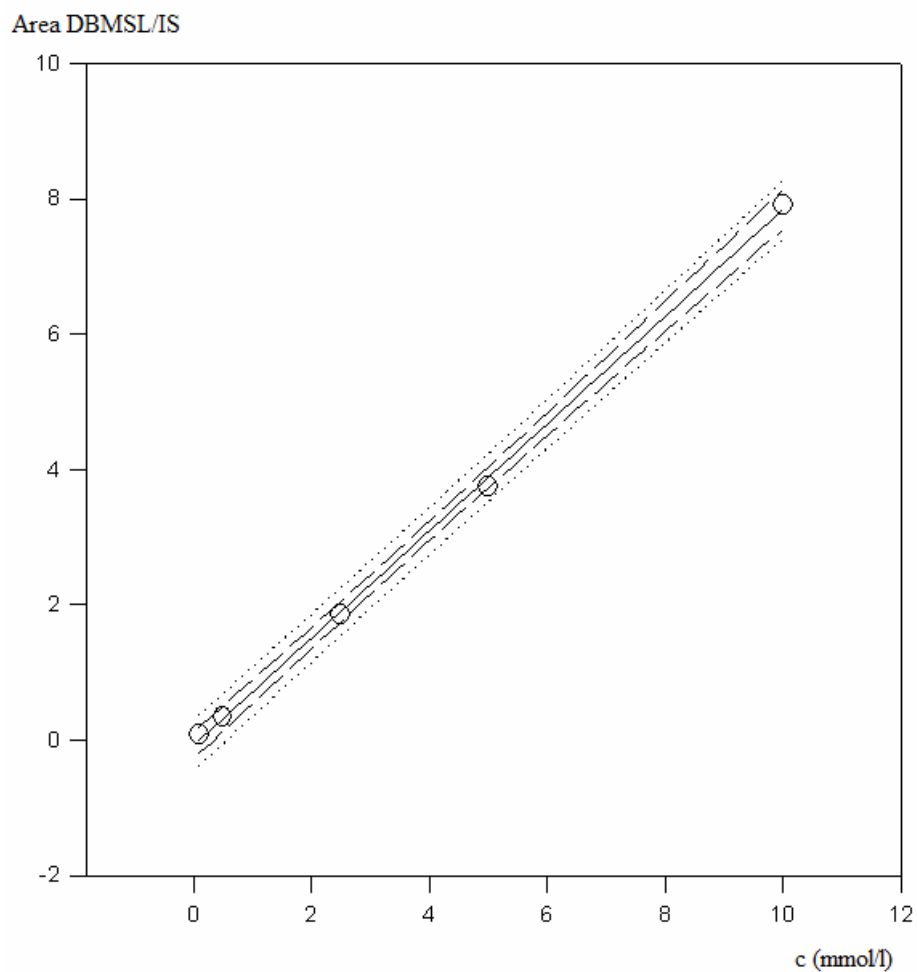
Tabulka 19: Linearita – hodnoty ploch píků (Area) vzniklých derivátů a hodnoty poměru Area (DBMSL) /Area (IS) při různých koncentracích

c St (mmol/l)	Area (DBMSL)	Area IS	Area (LPHB)/Area (IS)
0,1	39060	526544	0,07
	47968	623752	0,08
	22845	318745	0,07
průměr			0,07
0,5	156904	439388	0,36
	98452	292578	0,34
	112579	377956	0,30
průměr			0,33
2,5	957740	514162	1,86
	1165488	612488	1,90
	701559	380777	1,84
průměr			1,87
5	1981127	548649	3,61
	1124789	304040	3,70

	1587779	405155	3,92
průměr			3,74
10	4213332	532444	7,91
	2255547	289789	7,78
	2889795	359878	8,03
průměr			7,91

zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 29: Kalibrační přímka di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu (osa x – koncentrace St laktátu, osa y – poměr Area (DBMSL)/Area (IS))



zdroj: vlastní výzkum

Parametry regresní přímky di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu:

$$A_{\text{DBMSL}}/A_{\text{IS}} = -0,0809 + [0,792 * c(\text{mmol/l})]$$

A_{DBMSL}Area (di[tert-butyldimethylsilyl]laktát)

A_{IS}Area (IS)

Korelační koeficient (R^2) byl 0,999, závislost odezvy detektoru na koncentraci látky je lineární.

4.2.3.2 *Správnost*

Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídávku ke vzorku (hemodialyzátu), přidávány byly tři koncentrační úrovně, od každé koncentrace tři vzorky (Tabulka 20).

Výtěžnost (Rec) byla vypočítána dle vzorce **Rec = 100 × c_i/c_o**

c_o je koncentrace vypočítaná (koncentrace látky obsažená ve vzorku + koncentrace přidaného standardu)

c_i koncentrace stanovená GC metodou

Odchylka stanovení (D) byla vypočítána takto:

$$D = 100 - \text{Rec}$$

- | | |
|---|----|
| ▪ Vzorek | 3x |
| ▪ Vzorek + 2 mmol/l roztok laktátu (10 μ l) | 3x |
| ▪ Vzorek + 4 mmol/l roztok laktátu (10 μ l) | 3x |
| ▪ Vzorek + 6 mmol/l roztok laktátu (10 μ l) | 3x |

původní koncentrace ve vzorku: 2,21 mmol/l

Tabulka 20: Správnost di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu z mikrodialyzátu po přidavku St

c přidaného St (mmol/l)	c_i (mmol/l)	c_o (mmol/l)	Rec (%)	D (%)
2	4,05	4,21	96,23	3,77
	4,21	4,21	99,81	0,19
	4,35	4,21	103,35	3,35
průměr	4,203	4,21	99,8	2,44
4	6,37	6,21	102,57	2,57
	6,28	6,21	101,07	1,07
	6,02	6,21	96,98	3,02
průměr	6,223	6,21	100,2	2,22
6	8,64	8,21	105,12	5,12
	8,54	8,21	104,01	4,01
	8,54	8,21	103,97	3,97
průměr	8,573	8,21	104,4	4,37

zdroj: vlastní výzkum

4.2.3.3 Přesnost

Měřený vzorek (hemodialyzát) byl rozpipetován do deseti vialek. Každý vzorek byl dále zpracován dle popsaného pracovního postupu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 21 a na obrázku 30.

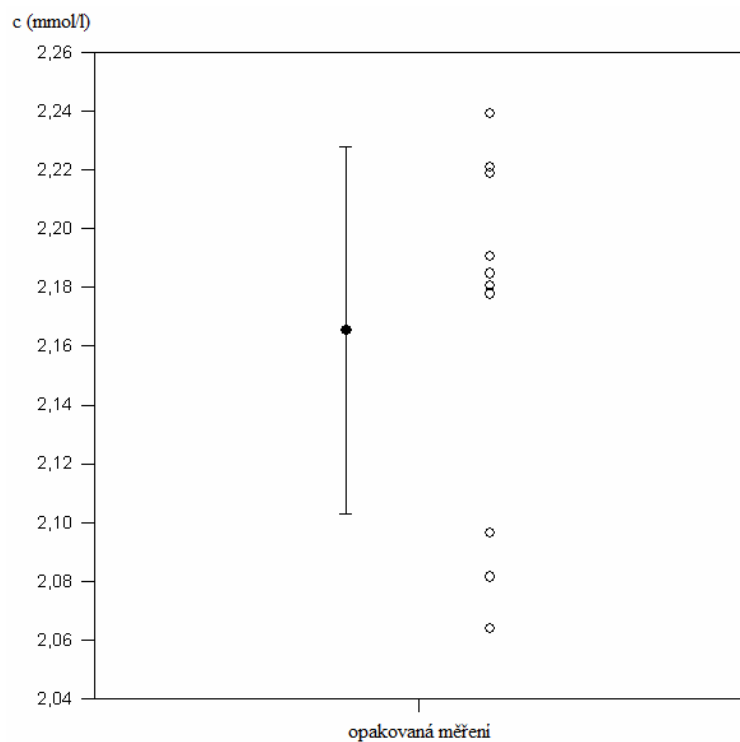
Tabulka 21: Přesnost di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu v deseti opakováních – hodnoty koncentrace analytů v hemodialyzátu

vzorek	Area (DBMSL)	Area (IS)	Area (DBMSL)/Area (IS)	c (mmol/l)
1	1030111	625758	1,65	2,18
2	809875	489633	1,65	2,19
3	1169065	690715	1,69	2,24

4	1144599	682117	1,68	2,22
5	805869	518692	1,55	2,06
6	754932	459251	1,64	2,18
7	1006055	600158	1,68	2,22
8	1041455	664384	1,57	2,08
9	798969	505859	1,58	2,10
10	1033320	626487	1,65	2,18
			průměrná c	2,17
			s	0,06
			RSD (%)	2,88

zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 30: Statistické porovnání dat – bodový graf – stanovení přesnosti derivátu laktátu – DBMSL (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

4.2.3.4 Detekční a kvantifikační limit

Limit detekce byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 1 $\mu\text{mol/l}$.

Limit kvantifikace byl za popsaných experimentálních podmínek stanoven 5 $\mu\text{mol/l}$

4.2.3.5 Stabilita

Testovány byly vzorky o koncentraci 5 mmol/l. Hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (c_x), (Tabulky 22-24). Stabilita byla testována při uchovávání za daných podmínek:

- Laboratorní teplota (22 °C)
- Lednice (4 °C)
- Mrazák (-25 °C)

Koncentrace je vyjádřena poměry ploch píku Area (DBMSL) /Area (IS) a přepočteny lineární regresní rovnicí (kap. 4.2.3.1)

Tabulka 22: Stabilita di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu v čase (den 0)

den 0	Area (DBMSL)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	1,68	2,22
	1,55	2,06
	1,64	2,18
c_x		2,15
4 °C	1,68	2,22
	1,57	2,08
	1,65	2,18
c_x		2,16
-25 °C	1,65	2,18
	1,65	2,19
	1,58	2,10
c_x		2,16

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 23: Stabilita di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu v čase (den 14)

den 14	Area (DBMSL)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	1,50	1,99
	1,69	2,23
	1,58	2,09
c _x		2,10
4 °C	1,72	2,28
	1,64	2,17
	1,58	2,09
c _x		2,18
-25 °C	1,63	2,16
	1,63	2,16
	1,70	2,25
c _x		2,19

zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 24: Stabilita di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu v čase (den 28)

den 28	Area (DBMSL)/Area (IS)	c (mmol/l)
22 °C	1,44	1,92
	1,40	1,86
	1,48	1,97
c _x		1,92
4 °C	1,55	2,06
	1,49	1,98
	1,68	2,21
c _x		2,08
-25 °C	1,59	2,11
	1,76	2,28
	1,64	2,17
c _x		2,19

zdroj: vlastní výzkum

Ze získaných dat (Tabulka 22-24) byly vypočteny odchylky (D):

$$D = \frac{100 * c_x(den14,28)}{c_x(den0)}$$

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 25. Statistické zhodnocení dat je na obrázcích 31 a 32.

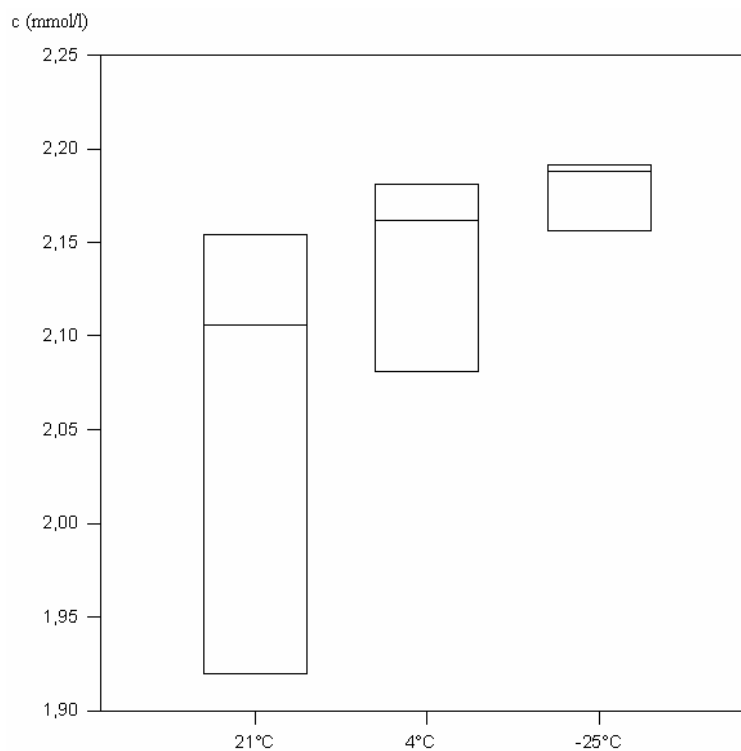
Tabulka 25: Stabilita – průměrné koncentrace při dané teplotě a jejich odchylka

Den	- 25 °C	100-D (%)	4 °C	100-D (%)	21 °C	100-D (%)
0	2,16	0	2,16	0	2,15	0
14	2,19	1,39	2,18	0,93	2,11	1,86
28	2,19	1,39	2,08	3,70	1,92	10,70

zdroj: vlastní výzkum

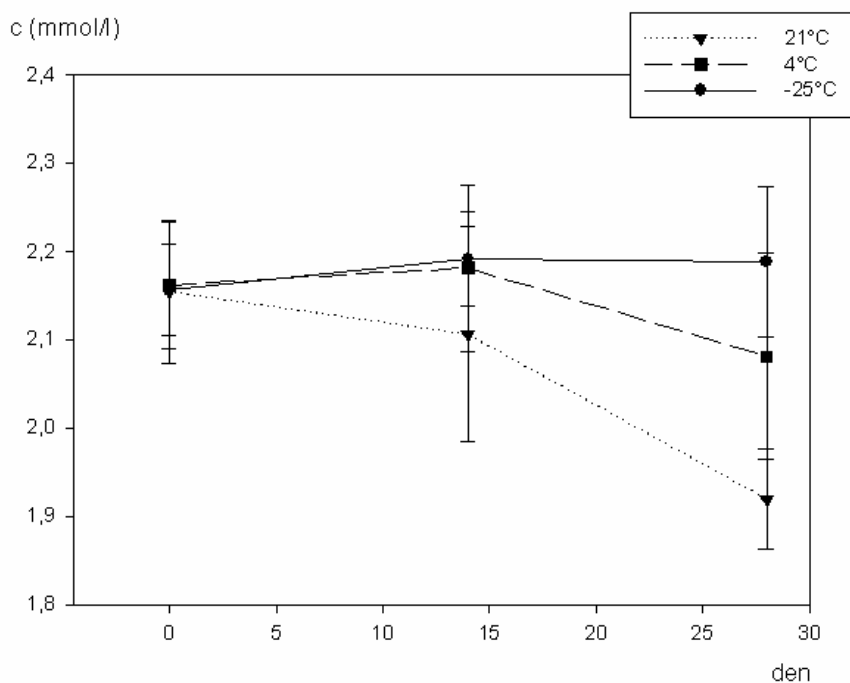
Obrázek 31: Statistické porovnání dat – stabilita derivátu laktátu - krabicový graf

(Software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 32: Statistické porovnání dat –stabilita di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu v čase 0 – 28 dnů (software SigmaStat)



zdroj: vlastní výzkum

4.2.4 Optimalizace metody pro derivatizaci s MTBSTFA

V průběhu optimalizace byly testovány vzorky při 50 °C, pro zjištění nejvhodnějšího času derivatizace. Vzorky hemodialyzátu o koncentraci 2 mmol/l byly připraveny výše popsaným způsobem a hodnoty byly vypočteny ze tří měření jako průměr (c_x). výsledky jsou uvedeny v tabulce 26 a na obrázcích 33 a 34.

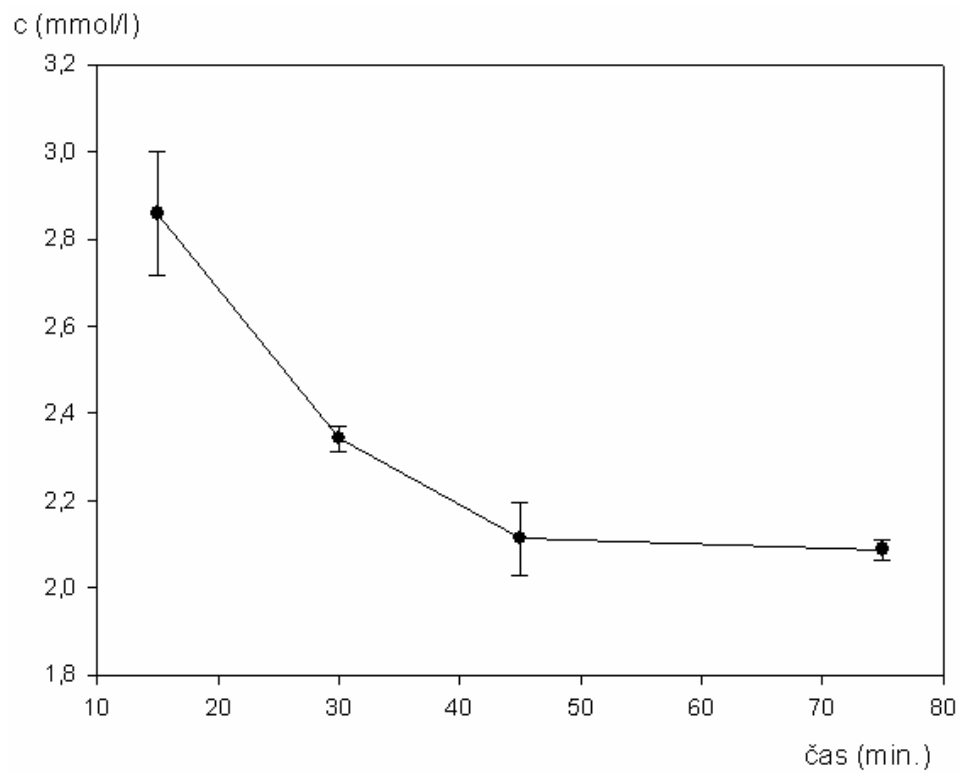
Tabulka 26: Optimalizace – koncentrace derivátů laktátu – DBMSL v závislosti na čase

čas (min)	Area (DBMSL)/Area (IS)	c (mmol/l)
15	2,22	2,91
	2,06	2,70
	2,28	2,97

		1,86
30	1,79	2,36
	1,75	2,31
	1,79	2,36
c_x		2,34
45	1,53	2,03
	1,66	2,20
	1,59	2,11
c_x		2,11
60	1,55	2,06
	1,59	2,11
	1,58	2,09
c_x		2,09
75	1,52	2,02
	1,56	2,07
	1,59	2,11
c_x		2,07

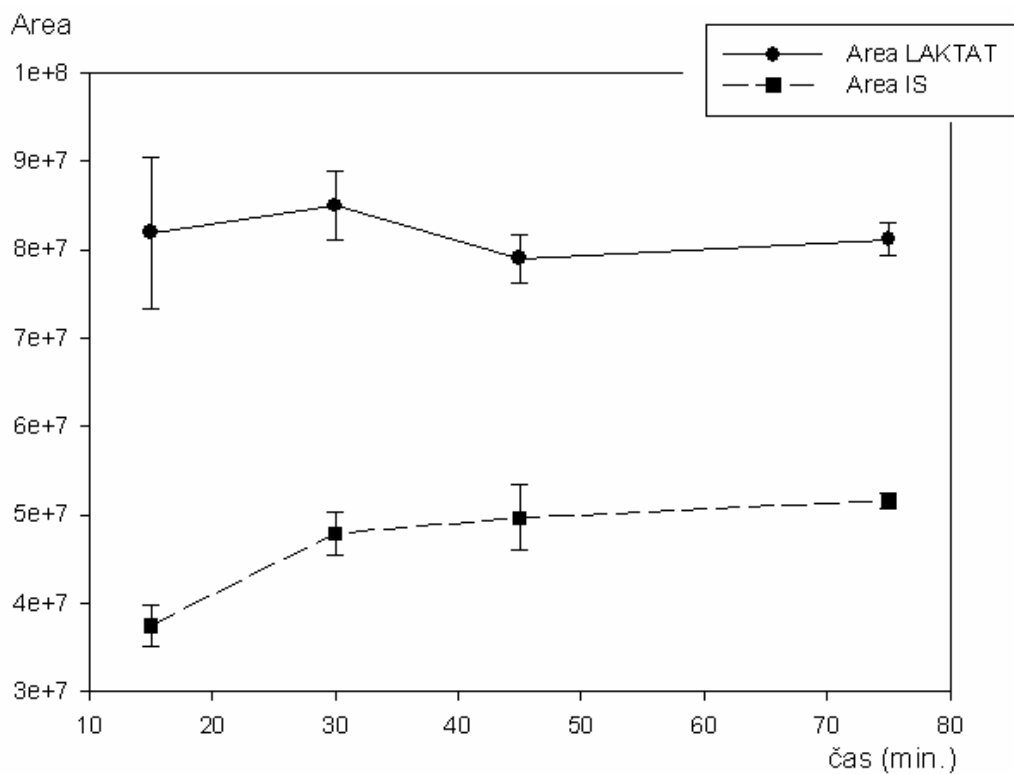
zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 33: Statistické porovnání dat – optimalizace derivátu laktátu Area
DBMSL/Area IS



zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 34: Statistické porovnání dat – optimalizace derivátu laktátu Area DBMSL/Area IS



zdroj: vlastní výzkum

Jak vyplývá z obrázku č. 34 do 45 minuty byl pozorován nárůst hodnot vznikajícího derivátu pro IS, zatímco pro derivát laktátu byly tyto hodnoty dosaženy již po 15 minutách.

5 DISKUZE

Prezentovaná metodika využívá stabilní izotopy uhlíku, které se přirozeně vyskytují v životním prostředí v 1,1% z celkového uhlíku. Látky obsahující izotop uhlíku ^{13}C nepodléhají radioaktivnímu rozpadu a nebyly zaznamenány žádné toxické účinky na lidský organismus. Jedná se o látky tělu vlastní a molekuly, které se v průběhu vyšetření vstřebávají jsou metabolizovány a vydychány jako $^{13}\text{CO}_2$. Množství aplikovaných látek je zcela zanedbatelné a tyto látky neovlivňují fyziologický či patologický vlastní metabolismus tkání ani v nejbližším okolí mikrodialyzační sondy. Jsou používány v řadě zemí k výzkumným účelům. Použití těchto látek ve FN Hradec Králové k výzkumným účelům bylo schváleno Odborným kolegiem Ministerstva zdravotnictví České republiky v prosinci 2008.

V práci prezentovaná derivatizační metoda glukosy na aldonitril pentacetyl-D-glukosu je výsledkem optimalizace reakčních a chromatografických podmínek. Použití pouze acetanhydridu pro derivatizaci glukosy se ukázalo nevhodné vzhledem k pravděpodobnému vzniku α a β anomerů pentacetyl-D-glukopyranosy. Bylo tedy nutné nejprve aldehydickou skupinu v molekule glukosy derivatizovat pomocí hydroxylaminu hydrochloridu a teprve poté ostatní hydroxyskupiny acetylovat za vzniku derivátu aldonitril pentacetyl-D-glukosy. Tento derivát poskytuje vhodné hmotnostní spektrum pro aplikaci značené $^{13}\text{C}_6$ -glukosy. K detekci neznačené glukosy byly vybrány fragmenty 242 a 328, pro značenou glukosu 246 a 334. Při analýze reálných vzorků nebyly pozorovány žádné interferující látky.

Pro derivatizaci laktátu jsou v práci popsány dvě metody. První metoda, derivatizace s propylaminem a následně heptafluorobutyranhydridem za vzniku L-lactin-n-propylaminheptafluorbutyrátu byla převzata ze spolupracujícího pracoviště laboratoře KGM FN HK, kterým je Katedra fyziologie Lékařské fakulty v Lausanne ve Švýcarsku (Prof. Luc Tappy). Vzniklý derivát má vhodné strukturní uspořádání pro aplikaci stabilních izotopů, jeho chemické vlastnosti jsou vhodné pro separaci GC-MS. Metoda je náročná jednak z hlediska dodržení času derivatizace s HFBA, kdy při překročení času 5 minut vzniká O-bis(heptafluorobutyrát), který kontaminuje GC-MS.

Dále pro tento postup nelze použít vakuový koncentrátor, veškeré zakoncentrování lze provádět pouze pod inertní atmosférou dusíku. Z výše uvedených důvodů byla hledána méně náročná metoda derivatizace laktátu, jejíž výsledný produkt by vykazoval vhodné parametry jak pro chromatografickou separaci, tak i pro aplikaci stabilních izotopů, tj. vhodné strukturní uspořádání pro monitoring při detekci hmotnostním spektrometrem. Z tohoto důvodu je v práci prezentována druhá, časově nenáročná a jednodušší metoda derivatizace laktátu s N-(butyl-dimethylsilyl)-2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamidem za vzniku di(tert-butyldimethylsilyl)laktátu, která nevyžaduje odpařování pod inertní atmosférou dusíku. Obě metody byly validovány. Jak vyplývá z validace obou metod uvedených v kapitolách 4.2.1 a 4.2.2, tato jednodušší metoda vykazuje srovnatelné parametry a lze tedy tuto metodou využít pro popsané aplikace. Při analýze reálných vzorků nebyly pozorovány žádné interferující látky.

Veškeré validace prezentovaných analytických metod byly prováděny na plynovém chromatografu s plameno-ionizačním detektorem vzhledem k případným aplikacím těchto metod bez stabilních izotopů. Dalším důvodem je skutečnost, že plynový chromatograf vybavený hmotnostním spektrometrem není běžnou součástí výbavy laboratoří klinické biochemie. Pro validaci analytických metod byly použity vzorky hemodialyzátů, protože eluáty získané průtokem mikrodialyzačního roztoku sondou o rychlosti 2 μ l/min jsou získány ve velmi malém množství. Vzorky hemodialyzátů jako modelové matrice byly zvoleny z důvodů jejich obdobného charakteru.

Důraz musí být kladen také na preanalytickou fázi mikrodialyzační metody. Vzorky eluované z mikrodialyzační sondy je třeba ihned konzervovat, například zmražením, nebo 0,1% koncentrací azidu sodného, aby došlo k přerušení metabolismu potenciálně přítomných bakterií, které spotřebovávají glukosu a produkují laktát. V mikrodialyzačním roztoku je také vhodná přítomnost látek, které umožní stanovit dialyzační účinnost mikrodialyzační sondy a tím zpřesnit odhad tkáňové koncentrace analytů. Pro tyto účely byl použit $^{13}\text{C}_1$ -laktát.

V současné době jsou data z experimentů vyhodnocována.

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zavedení, optimalizace a validace analytických metod využívajících $^{13}\text{C}_6$ -glukosu a $^{13}\text{C}_1$ -laktát ve studiích užívajících mikrodialýzu.

Byly stanoveny tyto parametry pro derivatizaci glukosy hydroxylamin hydrochloridem a acetanhydridem: správnost byla ověřena metodou standardního přídatku a byla stanovena 1,48%, přesnost byla stanovena opakovaným měřením reálného vzorku a zjištěný variační koeficient byl 2,51%. Parametry lineární regrese pro koncentrace 0,5 – 15 mmol/l byly za daných reakčních a chromatografických podmínek s regresním koeficientem (R^2) 0,9997 a rovnicí regrese $y = -0,0185 + 0,142x$.

Laktát byl stanovován derivatizací propylaminem a heptafluorobutanhydridem. Byly stanoveny tyto parametry – správnost 3,25%, přesnost 3,15%, parametry lineární regrese pro koncentrace v rozmezí 0,5 – 10 mmol/l byly za daných podmínek $R^2 = 0,999$ a rovnice regrese $y = 0,215 + 1,039x$. Parametry této poměrně složité derivatizační metody byly porovnávány s jednodušší metodou derivatizace pomocí N-(butyl-dimethyl-silyl)-2,2,2-trifluoro-N-methyl-acetamidem. Vzniklý derivát di(tert-butyldimethylsilyl) laktátu byl stanovován metodou rovněž GC-MS. Přesnost byla 3,02%, správnost 3,8%, parametry lineární regrese $R^2 = 0,999$, regresní rovnice $y = -0,0809 + 0,792x$.

Jak ukazují výše uvedené parametry, prezentované metody jsou vhodné pro aplikaci na vzorky z mikrodialýzy a využití stabilních izotopů a umožní přesnější sledování tkáňového metabolismu.

Tyto metody budou prezentovány na 18. IFCC - EFCC Evropském kongresu klinické chemie a laboratorní medicíny Euromedlab v Innsbrucku ve dnech 7. – 11.6.2009. Abstrakt na tento kongres byl přijat po zhodnocení odbornou komisí a bude publikován v časopise Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (If 1,741).

Předkládaná bakalářská práce je součástí řešení **Výzkumného záměru MZO 00179906** (hlavní řešitel výzkumného záměru - prof. MUDr. Zdeněk Zadák, CSc.).

7 KLÍČOVÁ SLOVA

Glukosa

Laktát

Mikrodialyzační metoda

Plynová chromatografie

Hmotnostní spektrometr

Derivatizace

Key words

Glucose

Lactate

Microdialysis method

Gas chromatography

Mass spectrometry

Derivatization

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. DEVLIN, T. M. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation*. 6th ed. Hoboken: Wiley-Liss, 1997. 1208 s., ISBN 0-471-15451-2
2. DOLEŽALOVÁ, V. a kol. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přepracované vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995. 286 s., ISBN 80-7013-198-5
3. DOLEŽALOVÁ, V. a kol. *Principy biochemických vyšetřovacích metod*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995. 234 s., ISBN 80-7013-206-X
4. DUCHOŇ, J. a kol. *Lékařská chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1985. 714 s.
5. FIŠEROVÁ, M. *Základní principy mikrodialýzy a její využití ve farmakokinetice* [online]. [cit. 2009-03-16].
Dostupné z <<http://farmspol.cls.cz/TDM/abstr98.doc>>.
6. FRIEDECKÝ, B. *Laboratorní diagnostika a sledování stavů diabetes mellitu* [online]. 01. 09. 2005. [cit. 2009-03-05].
Dostupné z <<http://www.diab.cz/modules/Standardy/sledovani.pdf>>.
7. FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, J. *Analytická kvalita v klinické laboratoři*. Praha: SEKK spol. s r. o., 2002.
Dostupné z <www.SEKK.cz/prodej/CDROM_analKvalita.htm>.
8. HALLSTROM, A., CARLSSON, A., HILLERED, L. *Simultaneous determination of lactate, pyruvate, and ascorbate in microdialysis samples from rat brain, blood, fat and muscle using high-performance liquid chromatography*. *Journal of Pharmacological Methods*. 1989, 22(2): 113-124

9. HENRY, S., SCHNEITER, Ph., JTIQUIER, E., TAPPY, L. *Effects of Hyperinsulinemia and Hyperglycemia on Lactate Release and Local Blood Flow in Subcutaneous Adipose Tissue of Healthy Humans*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1996, 81: 2891-5
10. HOLZBERGER, Z., CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická chemie*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1987. 663s.
11. CHAVÉZ-SERVÍN, J. L., CASTELLOTE, N. I. *Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection*. Journal of Chromatography A. 2004, 1043: 2111-215
12. CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1990. 384 s., ISBN 80-03-00569-8
13. JABOR, A. *Cyklus Coriho* [online]. [cit. 2009-03-05]. Dostupné z <<http://dasta.lf2.cuni.cz/dsmz/hypertext/AJCLZ.htm>>.
14. KARLÍČEK, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vydání. Praha: Karolinum, 2007. 281 s., ISBN 978-80-246-1453-3
15. KITSON, F. G., LARSEN, B. S., McEWEN Ch. N. *Gas chromatography and mass spectrometry-A practical guide*. 1st ed. San Diego: Academic press, 1996. 381 s., ISBN 0-12-483385-3
16. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. 203 s., ISBN 80-902155-0-5
17. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I.díl*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. 247 s., ISBN 80-246-0849-9
18. MARTINEZ, A. et al. *Assessment of adipose tissue metabolism by means of subcutaneous microdialysis in patients with sepsis or circulatory failure*. Clin Physiol Funct Imaging. 2003, 23: 286–292

19. MASOPUST, J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1998. 832 s., ISBN 80-7184-649-3
20. MASOPUST, J., PRŮŠA, R. *Patobiochemie metabolických drah* [online]. 2004 [cit. 2009-02-09].
Dostupné z <<http://web.telecom.cz/dotdiag/dokument/patobio/metdrahy.pdf>>.
21. McFFADDEN, W. *Techniques od combined GC/MS applications in organic analysis*. New York, Toronto: Wiley, 1973. 463 s., ISBN 0-471-58388-X
22. MURRAY, R. K. et al. *Harperova biochemie*. 2. české vydání. Praha: H & H, 1998. 872 s., ISBN 80-85787-38-5
23. NEDEIROS, P. M., SIMONEIT, B. R. T. *Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography- mass spektrometry*. Journal of Chromatography A. 2007, 1141: 271-278
24. NĚMEČKOVÁ, A. a kol. *Lékařská chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1991. 661 s., ISBN 80-201-0114-4
25. NOVEL-CHATÉ, V. et al. *Role of NaI-KI-ATPase in insulin-induced lactate release by skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001, 280: 296-300
26. RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. 317 s., ISBN 80-7262-324-9
27. ROOYACKERS, O., et al. *Microdialysis methods for measuring human metabolism*. Huddinge: Lippincott Williams & Wilkins, 2004
28. ŠPIČKA, J. *Biochemie*. České Budějovice: ZSF Jihočeské univerzity, 2004. 150 s., ISBN 80-7040-683-6
29. ŠTICH, V., HEJNOVÁ, J., SULJKOVIČOVÁ, H. *Využití mikrodialýzy při sledování metabolismu tukové tkáně a svalů u člověka* [online]. [cit. 2009-03-16]. Dostupné z <<http://farmspol.cls.cz/TDM/abstr98.doc>>.

30. ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. 264 s., ISBN 80-246-0852-9
31. THOMAS, L. *Clinical laboratory diagnostics*. 1st ed. Frankfurt am Main: TH – Books, 1998. 1527 s., ISBN 3-9805215-4-0
32. TSERNG, K. Y., GILLFILLAN, C. A. *Determination of Carbon-23 labeled lactate in blood by gas chromatography-mass spectrometry*. Analytical chemistry. 1984, 56: 517-523
33. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1., 2. upravené vydání*. Tábor: Osis, 2002. 343 s., ISBN 80-86659-00-3
34. VOLKA, K. *Analytická chemie II.*, 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2000. 228 s., ISBN 80-86659-03-8
35. WOLFE, R. R. *Radioactive and stable isotope tracers in Biomedicine*. New York: Wiley-Liss, 1992. 471 s., ISBN 0-471-56131-2
36. ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, Karolinum, 2002, 2007. 906 s., ISBN 978-80-7262-372-3, ISBN 978-80-246-1423-6