

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd



**STANOVENÍ OXOKYSELIN ODVOZENÝCH
OD AMINOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM
POMOCÍ HPLC S FLUORIMETRICKOU DETEKCÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Jana Jirošová
VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

2008

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences



**DETERMINATION OF KETO ACIDS DERIVED
FROM BRANCH CHAIN AMINO ACIDS USING HPLC
WITH FLUORESCENCE DETECTION**

THESIS

AUTHOR: Bc. Jana Jirošová
SUPERVISOR: Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

2008

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Mgr. Romanu Kandárovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc v průběhu experimentu a za pomoc při zpracování naměřených výsledků.

Také děkuji všem dobrovolným dárcům, kteří poskytli vzorky své krve, a personálu dětského oddělení Krajské nemocnice Pardubice.

ABSTRAKT

Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem (ketoisovalerát, ketoisokaproát, ketomethylvalerát) jsou prvními produkty metabolismu při odbourávání aminokyselin s rozvětveným řetězcem.

Vysoké hladiny oxokyselin s rozvětveným řetězcem v plazmě a krvi mohou způsobit nemoc javorového sirupu.

Byla vyvinuta HPLC metoda s fluorescenční detekcí pro stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem v plazmě a suchých krevních skvrnách. Oxokyseliny byly derivatizovány s o-fenylendiaminem. Pro separaci derivátů byla použita chromatografická kolona LiChroCart 125-4 Purospher RP-18e, 5 μm . Eluce byla provedena v gradientovém módu, kde jako mobilní fáze A byla použita směs methanolu s deionizovanou vodou (55:45, v/v pro plazmu a 50:50, v/v pro suché krevní skvrny) a mobilní fáze B obsahovala 100% methanol.

Analytické parametry prezentované metody byly následující: přesnost v sérii, vyjádřená variačním koeficientem, byla v suchých krevních skvrnách 3,67% pro KIV, 3,58% pro KIC a 3,18% pro KMV. Kalibrační křivka byla lineární v testovaném rozsahu koncentrací. Správnost vyjádřená výtěžností metody pro suché krevní skvrny KIV, KIC a KMV byla následující: 104,98% (CV 1,79%), 104,00% (CV 3,59%) a 101,99% (CV 4,85%).

Vyvinuli jsme jednoduchou a selektivní HPLC metodu s fluorescenční detekcí pro stanovení oxokyselin v suchých krevních skvrnách a v plazmě.

ABSTRACT

The branched-chain keto acids (α -ketoisovaleric acid, α -ketoisocaproic acid and α -ketomethylvaleric acid) are the first degradation products of these amino acids produced by enzymatic transamination with branched-chain amino acids transaminase.

Highly increased concentrations of branched-chain keto acids in human plasma and blood lead to the clinical syndrome of maple syrup urine disease.

A HPLC method with fluorescence detection for the measurement of branched-chain keto acids in plasma and dried blood spots has been developed and evaluated. The branched-chain keto acids were derivatized with *o*-phenylenediamine into 2-quinoxalinol derivatives. The quinoxalinol derivatives were separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a column LiChroCart 125-4 Purospher RP-18e, 5 μ m with gradient elution. As mobile phase A was used the mixture of methanol and deionized water (55:45, v/v for plasma and 50:50, v/v for dried blood spots) and mobile phase B was used 100% methanol.

The analytical performance of the method is satisfactory for clinical trials. The intra-assay coefficients of variation for KIV, KIC, KMV were 3.67%, 3.58% and 3.18% for dried blood spots. The calibration curve was linear with the tested range 0-100 μ mol/l for KIV, KMV, KIC. The recoveries were as follows: 104.98% (CV 1.79%), 104.00% (CV 3.59%) and 101.99% (CV 4.85%) for dried blood spots.

We have developed a simple and a selective HPLC method with fluorescence detection for the determination branched-chain keto acids in dried blood spots and plasma.

SEZNAM ZKRATEK

AVG	Průměrná hodnota
BCAA	Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
BCKA	Oxokyseliny (ketokyseliny) s rozvětveným řetězcem
CV	Variační koeficient
DBS	Suchá krevní skvrna
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
I.S.	Vnitřní standard
KC	Ketokaproát
KIC	Ketoisokaproát
KIV	Ketoisovalerát
KMV	Ketomethylvalerát
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MSUD	Nemoc javorového sirupu
OPD	o-fenylendiamin
p	pravděpodobnost
SD	Směrodatná odchylka

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1	CHARAKTERISTIKA OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM	13
2.1.1	Ketoisovalerát, ketomethylvalerát, ketoisokaproát.....	13
2.2	METABOLICKÉ PORUCHY V KATABOLISMU ROZVĚTVENÝCH AMINOKYSELIN.....	17
2.2.1	Hypervalinemie.....	17
2.2.2	Hyperleucinemie-iso-leucinemie	17
2.2.3	Nemoc javorového sirupu (Maple syrup urine disease = MSUD)	17
2.2.4	Isovalerová acidemie.....	19
2.2.5	Vyšetření metabolických poruch.....	19
2.2.5.1	Suché krevní skvrny	19
2.2.6	Novorozenecký screening pro dědičné metabolické poruchy	21
2.3	METODY STANOVENÍ OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM	21
2.3.1	Semikvantitativní stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem.....	21
2.3.2	Metody pro kvantitativní analýzu oxokyselin s rozvětveným řetězcem ...	22
2.3.2.1	GC (Gas chromatography).....	22
2.3.2.2	HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	23
2.3.3	Analýza enzymu oxidační dekarboxylasy	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉ POPULACE	25
3.2	MATERIÁL.....	25
3.2.1	Vzorky.....	25
3.2.2	Chemikálie.....	25
3.2.3	Pomůcky a přístroje	26
3.2.4	Pracovní roztoky.....	27
3.3	POSTUP STANOVENÍ OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM POMOCÍ HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ	30
3.3.1	Příprava vzorku	30
3.3.1.1	Příprava vzorků plazmy	30
3.3.1.2	Příprava vzorků suchých krevních skvrn (DBS).....	30
3.3.1.3	Derivatizace s o-fenylendiaminem.....	31
3.3.2	Chromatografická analýza	31

3.3.2.1	HPLC parametry	31
3.3.2.2	Nastavení vhodné citlivosti fluorescenčního detektoru	32
3.3.3	Kalibrační křivka pro stanovení v plazmě	33
3.3.4	Kalibrační křivka pro stanovení v suchých krevních skvrnách	33
3.3.5	Analytické parametry	34
3.3.5.1	Přesnost v sérii	34
3.3.5.2	Recovery test	34
3.4	ÚPRAVA VZORKŮ PŘED HPLC ANALÝZOU	35
3.4.1	Srovnání deproteinačních roztoků	35
3.4.2	Srovnání úpravy vzorku s použitím SPE a bez použití SPE	35
3.4.3	Porovnání elučních činidel	35
3.4.4	Test stability	36
3.4.4.1	Stabilita vnitřního standardu – OPD	36
3.5	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	36
4	VÝSLEDKY	37
4.1	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA	37
4.1.1	Nastavení vhodné citlivosti fluorescenčního detektoru	37
4.1.2	Kalibrační křivka pro stanovení v plazmě	38
4.1.3	Kalibrační křivka pro stanovení v suchých krevních skvrnách	41
4.1.4	Analytické parametry	43
4.1.4.1	Přesnost v sérii	43
4.1.4.2	Výtěžnost (recovery test)	43
4.2	ÚPRAVA VZORKU PŘED HPLC ANALÝZOU	45
4.2.1	Srovnání deproteinačních roztoků	45
4.2.2	Srovnání úpravy vzorku s použitím SPE a bez použití SPE	45
4.2.3	Porovnání elučních činidel z DBS	45
4.2.4	Test stability	46
4.2.4.1	Stabilita vnitřního standardu – OPD	46
4.3	DISTRIBUCE HLADIN OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETEZCEM V SOUBORU DOBROVOLNÝCH DÁRCŮ KRVE	47
4.3.1	Hladiny ketoisovalerátu	47
4.3.2	Hladiny ketoisokaproátu	48
4.3.3	Hladiny ketomethylvalerátu	49
4.3.4	Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV	50

4.3.5	Korelace mezi hladinami oxokyselin s rozvětveným řetězcem a hladinami aminokyselin s rozvětveným řetězcem v plazmě.....	51
4.4	DISTRIBUCE HLADIN OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM U NOVOROZENCŮ.....	52
4.4.1	Hladiny ketoisovalerátu u novorozenců	52
4.4.2	Hladiny ketoisokaproátu u novorozenců	53
4.4.3	Hladiny ketomethylvalerátu u novorozenců	54
4.4.4	Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV u novorozenců	55
4.4.5	Korelace mezi hladinami oxokyselin s rozvětveným řetězcem a hladinami aminokyselin s rozvětveným řetězcem v suchých krevních skvrnách.....	56
5	DISKUZE	57
6	ZÁVĚR	61
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
	Přílohy	

1 ÚVOD

Vrozené dědičné metabolické poruchy tvoří skupinu onemocnění, které se přes veškerou snahu lékařů i vědeckých pracovníků stále významně podílejí na úmrtnosti novorozenců nebo zneprůjemňují kvalitu života nemocného.

Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem, resp. ketoisovalerát, ketoisokaproát, ketomethylvalerát, jsou meziprodukty vznikající při odbourávání aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Jejich podíl značně stoupá při defektu enzymu oxidační dekarboxylasy v průběhu jejich odbourávání. Sledovanou metabolickou poruchou je nemoc javorového sirupu, která se může projevit několik dní po porodu. Je to onemocnění poměrně vzácné, přesto svými klinickými příznaky velmi závažné. Z tohoto důvodu je důležitý novorozenecký screening této nemoci. Novorozenecký screening, aby byl efektivní, musí být proveden včas a v dostatečné míře ještě v době, než se příslušné geneticky vázané onemocnění projeví a dojde k vážnému poškození mentálního a fyzického zdraví, resp. zdravého vývoje.

Naším hlavním cílem je zavést vhodnou metodiku pro stanovení uvedených oxokyselin a stanovit orientační hodnoty v plazmě u dobrovolných dárců krve. Metoda by měla být co nejjednodušší a nejšetrnější. Ke stanovení oxokyselin jsme použili HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci s o-fenylendiaminem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

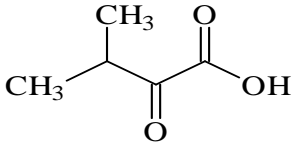
2.1 CHARAKTERISTIKA OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM

2.1.1 Ketoisovalerát, ketomethylvalerát, ketoisokaproát

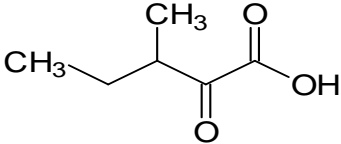
Vlastnosti ketoisovalerátu, ketomethylvalerátu, ketoisokaproátu

KIV, KMV, KIC jsou oxokyseliny odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem (od valinu, isoleucinu, leucinu). Tyto aminokyseliny patří mezi esenciální α -aminokyseliny s nepolárním postranním řetězcem, které v těle nelze syntetizovat de novo a musí být do organismu přijímány potravou ve formě bílkovin. Bílkoviny jsou dále štěpeny na odpovídající aminokyseliny a ty následně na odpovídající oxokyseliny. Hlavním úkolem oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCKA, z angl. branched chain keto acids) je odstranění toxického amoniaku, především v prostředí svalů. Hromadění amoniaku totiž způsobuje svalovou únavu, zpomaluje restituční fázi a zpomaluje proces proteosyntézy. Nejúčinnější látkou v tomto směru je ketoisokaproát, který udržuje hladinu amoniaku na bezpečné výši. Pokud je v potravě nedostatek aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA, z angl. branched chain amino acids), mohou být nahrazeny BCKA.

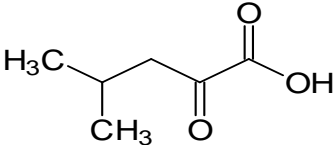
Tab. 1: Ketoisovalerát

Systematický název	3-methyl-2-oxo-butanová kyselina	Strukturní vzorec 
Sumární vzorec	C ₅ H ₈ O ₃	
Molekulová hmotnost	116,16 g.mol ⁻¹	

Tab. 2: *Ketomethylvalerát*

Systematický název	3-methyl-2-oxo-pentanová kyselina	Strukturní vzorec 
Sumární vzorec	C ₆ H ₁₀ O ₃	
Molekulová hmotnost	130,13 g.mol ⁻¹	

Tab. 3: *Ketoisokaproát*

Systematický název	4-methyl-2-oxo-pentanová kyselina	Strukturní vzorec 
Sumární vzorec	C ₆ H ₁₀ O ₃	
Molekulová hmotnost	130,13 g.mol ⁻¹	

Metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA)

Katabolismus leucinu, valinu a isoleucinu zpočátku probíhá stejnými reakcemi, avšak následně má každá aminokyselina svoji specifickou metabolickou cestu [2]. Na rozdíl od ostatních aminokyselin se ve velké míře metabolizují především ve svalech a mozku.

Prvním krokem při odbourávání je transaminace, s α -ketoglutarátem jako kosubstrátem, díky které vznikají příslušné rozvětvené oxokyseliny. Hlavní roli zde hraje enzym aminotransferasa, lokalizovaný jak v cytosolu, tak v mitochondriích. Tato reakce je reverzibilní a většina oxokyselin se zpětně přemění na aminokyseliny.

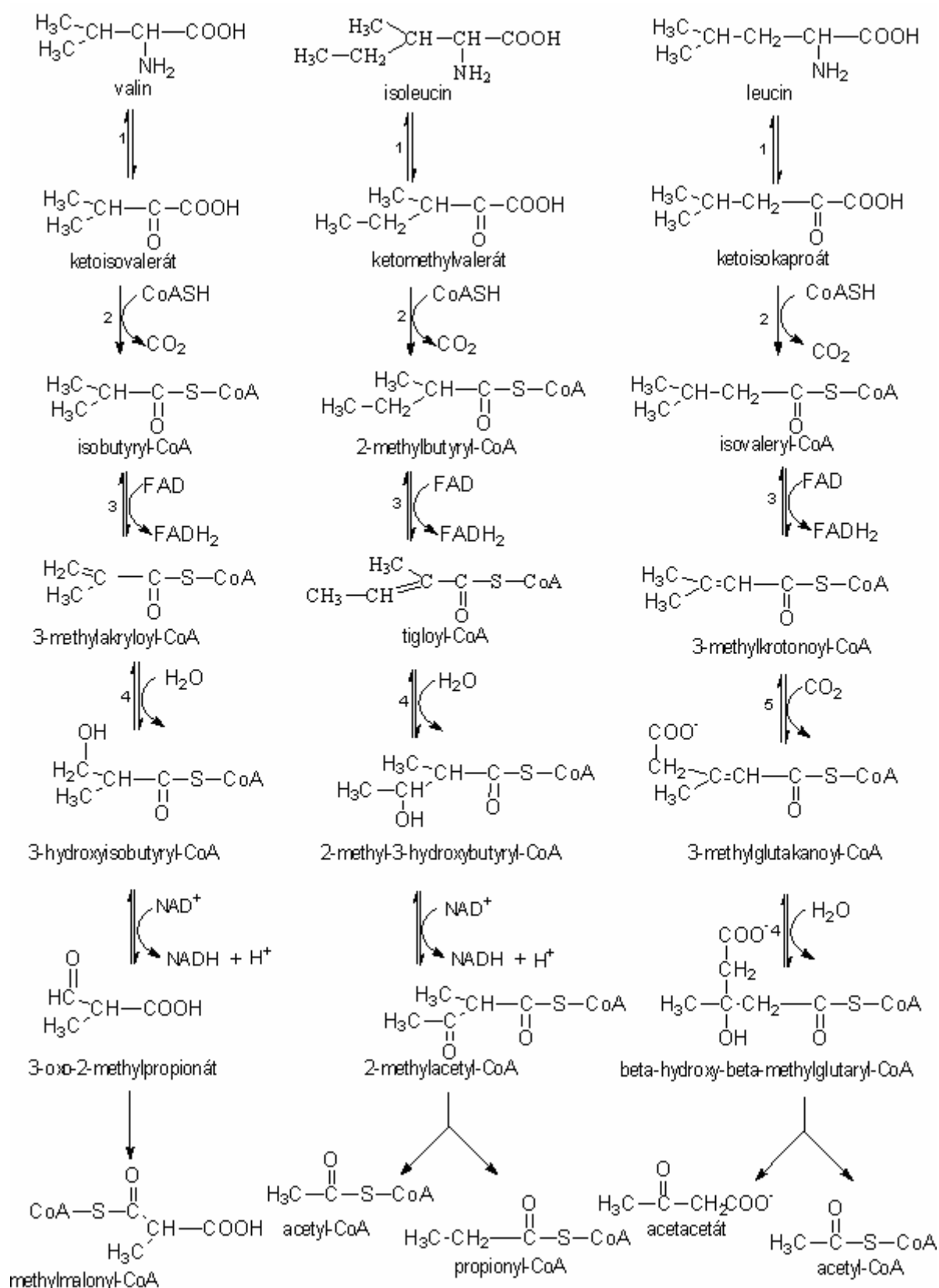
Druhou klíčovou reakcí je oxidativní dekarboxylace rozvětvených oxokyselin. Dehydrogenasa je multienzymový komplex lokalizovaný na povrchu mitochondriální membrány. Struktura a způsob regulace této dehydrogenasy se podobá pyruvátdehydrogenase, která taktéž obsahuje thiamindifosfát, lipovou kyselinu a FAD jako prostetickou skupinu, a potřebuje NAD⁺ a koenzym A jako koenzymy. Při poruše správné funkce tohoto enzymového komplexu dochází k rozvoji metabolických onemocnění spojených se zvýšenou hladinou jednotlivých oxokyselin a aminokyselin.

Vzniklé deriváty CoA podléhají dehydrogenaci za přítomnosti FAD (analogie s odbouráváním mastných kyselin).

Dalším stupněm reakce je adice vody, která probíhá u valinu a isoleucinu přímo, při metabolismu leucinu po karboxylaci biotinovým enzymem. Hydratací vzniká v průběhu odbourávání leucinu β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), meziproduct biosyntézy cholesterolu a především ketogenese. HMG-CoA je dále přeměněn na acetacetát a acetyl-CoA.

Další odbourávání isoleucinu probíhá podle klasických pravidel β -oxidace, kdy vzniká acetyl-CoA a propionyl-CoA. Isoleucin je tedy glukogenní i ketogenní aminokyselina.

Při odbourávání valinu vzniká hydratací β -hydroxyisobutyryl-CoA, který se za odštěpení zbytku CoA a dehydrogenací primární hydroxylové skupiny mění na 3-oxo-2-methylpropionát. Tento produkt je dále metabolizován na β -aminoisobutyryl, který se normálně vyskytuje v moči. Alternativně je 3-oxo-2-methylpropionát oxidativně acylován na methylmalonyl-CoA, který isomerací poskytuje sukcinyl-CoA. Výsledný produkt (sukcinyl-CoA) tedy vysvětluje glukogenní vlastnosti valinu [1].



Obr. 1: Metabolické cesty přeměny valinu, isoleucinu, leucinu [1,3]

2.2 METABOLICKÉ PORUCHY V KATABOLISMU ROZVĚTVENÝCH AMINOKYSELIN

2.2.1 Hypervalinemie

Jedná se o vzácnou metabolickou poruchu, pro níž je charakteristická chybějící nebo silně snižená aktivita v transaminaci valinu, zatímco transaminace leucinu a isoleucinu probíhá normálně. Hladina valinu v tkáních a v krvi vzroste, ale hladina ketoisovalerátu klesne. Děti trpí poruchami růstu, zvracením a je nepříznivě ovlivněn jejich duševní vývoj [3].

2.2.2 Hyperleucinemie-isoleucinemie

Toto onemocnění je charakterizováno zvýšenými hladinami leucinu a isoleucinu a nízkými hladinami ketoisokaproátu a ketomethylvalerátu. Klinické příznaky jsou podobné hypervalinemii, mimo toho dochází ke změnám na sítnici [3].

2.2.3 Nemoc javorového sirupu (Maple syrup urine disease = MSUD)

Jde o vrozenou poruchu metabolismu leucinu, isoleucinu a valinu s autozomálně recesivní dědičností podmíněnou deficitem některé podjednotky enzymového komplexu, který se podílí na dekarboxylaci těchto aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Koenzymem tohoto komplexu je thiaminpyrofosfát. Každá ze 4 podjednotek komplexu je kódována rozdílným genem (19p, 6q, 1q, 7p). Hladiny leucinu, isoleucinu a valinu a jejich α -ketokyselin v plazmě a moči rapidně stoupají. Rozlišují se varianty: 1. **klasická**, 2. **intermitentní**, 3. **mírná**, 4. **thiamin-responzivní**. Pro všechny je typickým znakem zápach moči po javorovém sirupu nebo páleném cukru. Incidence této nemoci je 1 : 185 000.

1. KLASICKÁ MSUD

Klasická MSUD je klinicky nejzávažnější formou, která se projevuje první týden po narození. Mezi první klinické příznaky nemoci patří zvracení, rostoucí apatie. V dalším průběhu se objevují křeče, epistotonus a poruchy dýchání. Děti, které přežívají tuto těžkou metabolickou poruchu, jeví těžkou poruchu duševního vývoje. Vztahy mezi biochemickými změnami a klinickými příznaky, které vyplývají zvláště z postižení centrálního nervového systému, nejsou ještě vysvětleny.

Léčba je založena na včasné diagnostice a vyžaduje nahradit proteiny v potravě směsí aminokyselin bez valinu, leucinu a isoleucinu. Pokud hladiny těchto tří aminokyselin a jejich α -ketokyselin klesnou k normě, lze tyto aminokyseliny v dietě nahradit ve formě mléka nebo jiných potravin, které nikdy nepřesáhnou metabolickou potřebu.

2. INTERMITENTNÍ MSUD

Tato varianta nemoci javorového sirupu se projevuje u doposud zdravého dítěte až po dosažení kojeneckého věku. U postižených jedinců je aktivita enzymového komplexu snížena na 8-16%, ale stále je tedy částečně zachována. Projevy této nemoci, s klinicky podobnými příznaky jako u klasické MSUD, se projevují po stresových situacích (infekce, operační výkony) a pouze příležitostně.

Také prognóza je při dietní terapii aminokyselin s rozvětveným řetězcem příznivější.

3. MÍRNÁ MSUD

U této formy se příznaky, které jsou typické pro klasickou formu, objeví v kojeneckém věku nejčastěji po infekci. Avšak stupeň psychomotorické retardace a vzestup aminokyselin s rozvětveným řetězcem je mírný.

4. THIAMIN RESPONZIVNÍ MSUD

Vyskytuje se u některých dětí s intermitentní nebo mírnou formou MSUD. Při existující zbytkové aktivitě dekarboxylasy může dojít ke zlepšení klinických a biochemických příznaků při podávání thiaminu [1].

2.2.4 Isovalerová acidemie

Metabolickou příčinou tohoto onemocnění je porucha enzymu isovaleryl-CoA-dehydrogenasy v průběhu odbourávání leucinu. Způsobuje zvýšené hladiny isovalerátu v plazmě, likvoru, moči a potu. Vylučování isovalerátu v potu a moči způsobuje ostrý sýrový pach, který je důležitým hlavním příznakem. Klinický obraz je charakteristický silným zvracením a metabolickou acidosou [3].

2.2.5 Vyšetření metabolických poruch

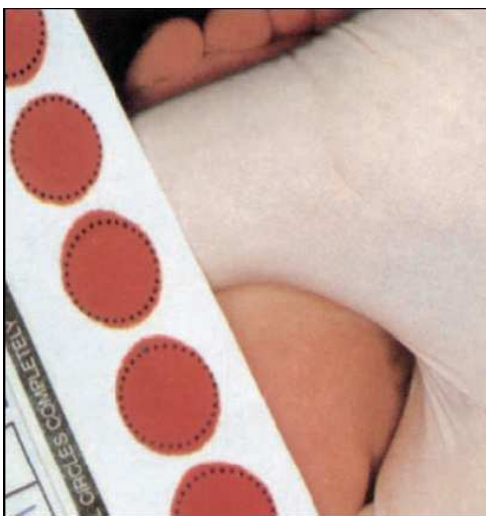
2.2.5.1 Suché krevní skvrny

Odběr plné krve (kapky krve) na speciální filtrační papír je metodou, která se dnes nejvíce používá k vyšetření metabolických poruch, přednostně pomocí Guthrieho testu na vyšetření fenylketonurie. Je to metoda, která je velmi šetrná a jednoduchá na provedení, nijak neohrožující život novorozence. Vzorky lze snadno a přehledně skladovat a je značně usnadněna jejich manipulace. Své využití našla i v mikrobiologii, k vyšetření infekčních onemocnění. Použití metody suché krevní skvrny (DBS, z angl. dried blood spot) je velmi výhodné, jelikož při ní odpadá riziko s použitím injekčních stříkaček a navíc klesá riziko přenosu infekčních onemocnění jak pro laboratorní pracovníky, tak pro pacienty samotné.

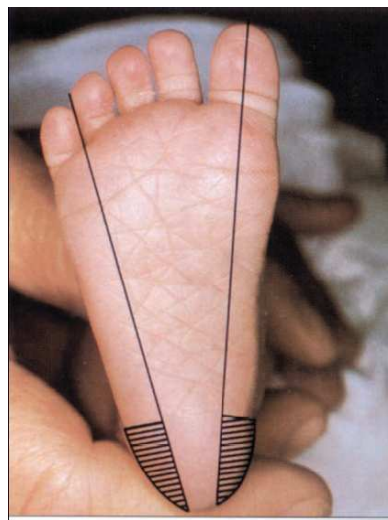
DBS byla v minulosti využívána především u testů, které sloužily při kvalitativní nebo semikvantitativní analýze. Se vzrůstající citlivostí analytických přístrojů se začala DBS uplatňovat i v kvantitativní analýze. Z tohoto důvodu je nutné, abychom znali objem vzorku, který je takto odebrán. Krev se odebírá na speciální druh filtračního papíru s definovanou savostí. Tím je zajištěna reprodukovatelnost výsledků metod, které používají právě tyto vzorky. Standardem v nemocniční praxi se stal S&S 903 Specimen Collection Paper. Na tomto savém papíru jsou předtištěny hranice, které vymezují množství odebírané krve. Dále obsahují kartu s popisem pacienta, popřípadě i žádanku o daná vyšetření [21].

Postup provedení odběru

- 1) Krev se odebírá z nabodnuté patičky pomocí sterilního kopítka s jehlou. Patičku je nutné před nabodnutím zahřát na teplotu 41 °C (například teplou vodou po dobu 5 minut) pro zvýšení prokrvenosti a vydesinfikovat sterilní gázou napuštěnou alkoholem. Odběr se provádí ze speciálního místa (viz obr. 3). Krev se z patičky nevymačkává, ale nechá se volně vytékat (lze jemně stisknout, ale ne silou).
- 2) Jakmile se vytvoří dostatečně velká kapka, přiloží se na ní filtrační papír středem vyznačené zóny. Dbá se na to, aby krev vyplnila celý vyznačený prostor. Na odběrových kartách je zpravidla několik odběrových zón (obr. 2).
- 3) Místo po vpichu se vydesinfikuje a přelepí.
- 4) Krevní skvrny se nechají vyschnout při laboratorní teplotě ve stojanech k tomu určených (4 hodiny). Proces schnutí se nesmí urychlovat ani stáním na slunci ani horkým vzduchem.



Obr. 2: Odběr krevní skvrny z patičky novorozence [21]



Obr. 3: Vhodná zóna k provedení odběru [21]

Takto odebrané, vysušené a náležitě označené vzorky je možné skladovat při -20 °C, nebo je lze poslat k okamžitému vyšetření. Největší výhodou těchto odběrů je fakt, že DBS můžeme k vyšetření zaslat například poštou.

Velká pozornost se musí věnovat správnému odběru. Nedostatečné či nadbytečné množství nebo málo vysušené krevní skvrny jsou nevhodné k provedení analýzy [21,22].

2.2.6 Novorozenecký screening pro dědičné metabolické poruchy

Rutinní novorozenecký screening dědičných metabolických poruch (DMP) byl zahájen v roce 1962, kdy byl poprvé použit Guthrieho test v rámci masového screeningového programu pro detekci fenylketonurie (PKU) v USA. V České republice začal screening fenylketonurie pomocí Guthrieho testu částečně od roku 1969 a celoplošně od roku 1975. Screening PKU se provádí 4. až 5. den po narození. Dnes už je Guthrieho test na ústupu a je vytlačován modernějšími technikami, např. HPLC. Nejmodernější metodou diagnostiky DMP je tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a její modifikace, která umožňuje testování velkého množství analytů ze suché krevní skvrny. MS/MS se používá pro novorozenecký screening řady DMP, především poruch metabolismu aminokyselin (též i MSUD), organických acidurií a poruch beta-oxidace mastných kyselin. Výhoda screeningu DPM metodou MS/MS nespočívá pouze v rozšíření screeningu PKU o další DPM, ale také v tom, že vzorek krve lze odebrat již 3. den po narození. To umožňuje časnější propouštění fyziologických novorozenců a jejich matek z porodnic [23].

2.3 METODY STANOVENÍ OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM

2.3.1 Semikvantitativní stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem

Jedinou prováděnou metodou na stanovení oxokyselin v moči u novorozenců v České republice je orientační test s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Po 5 minutách je hodnocena sraženina. Lehké zakalení může znamenat stopy 2-oxokyselin. Výrazná sraženina, která je žlutá, oranžová nebo červená, znamená pozitivní výsledek. Je to však pouze orientační metoda a nespecifická, jelikož s 2,4-dinitrofenylhydrazinem reagují všechny oxokyseliny obsažené v moči. V případě pozitivní reakce se indikuje další vyšetření, a to kvantitativní stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem

v plazmě pomocí automatického analyzátoru aminokyselin (ionexová chromatografie, ninhydrinová detekce) [5].

2.3.2 Metody pro kvantitativní analýzu oxokyselin s rozvětveným řetězcem

2.3.2.1 GC (Gas chromatography)

Jedna z metod uváděných v literatuře pro identifikaci a kvantifikaci α -ketokyselin v biologickém materiálu je metoda plynové chromatografie.

Před vlastní chromatografickou analýzou derivatizujeme α -ketokyseliny s o-fenylendiaminem pro zvýšení citlivosti. Následovně se přidává pyridin s N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem pro selektivní vazbu α -ketokyselin s kolonou [8,9].

K nejčastěji využívaným typům detektoru u tohoto stanovení patřil plamenový ionizační detektor, který je v dnešní době nahrazen hmotnostním spektroskopem.

GC-MS

Hmotnostní spektrometr umístěný na konci chromatografické kolony umožňuje snímat hmotnostní spektrum analyzované látky, případně měří hmotnost atomů nebo molekul v ionizovaném stavu. K převedení látek na ionty se používá ionizace pomocí elektrospreje.

Pokud použijeme multidimensionální kapilární plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí, lze od každé oxokyseliny stanovit po derivatizaci s methylesterem kyseliny chlormravenčí její enantiomery. K rozdělení enantiomerů se nepoužívá systému obrácených fází, ale chirální stacionární fáze [7].

K vyšetřovanému materiálu se často přidává radioaktivně značený [$1\text{-}^{14}\text{C}$] ketoisokaproát.

Plynová chromatografie je poměrně vhodnou metodou ke stanovení α -ketokyselin s rozvětveným řetězcem. Výhodou je poměrně nízká cena analýzy, dobrá citlivost, selektivita a reprodukovatelnost analýzy.

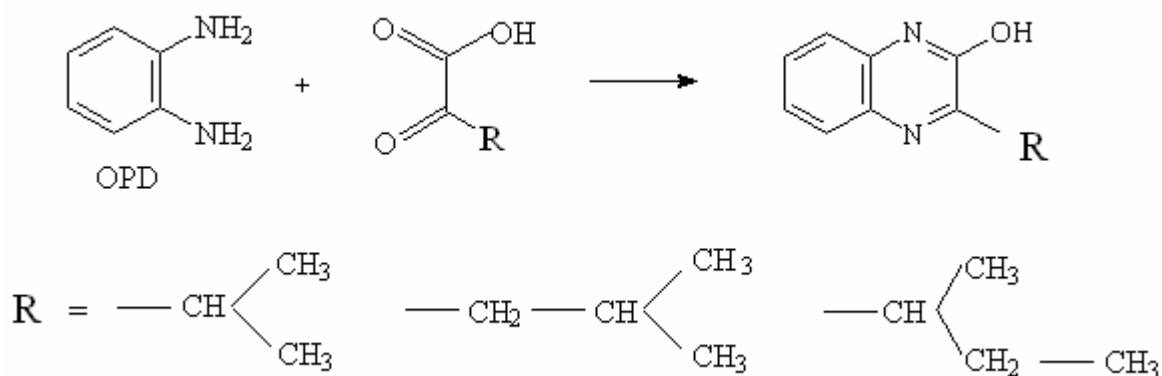
2.3.2.2 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je díky své univerzálnosti široce využívána v nejrůznějších analytických a biochemických oborech. Nejčastějším uspořádáním HPLC je chromatografie na reverzní fázi, kde na nosiči stacionární fáze je navázán nejčastěji oktadecyl. α -Ketokyseliny se eluují podle rostoucího počtu uhlíků postranního řetězce a rozvětvenosti. Pořadí eluovaných α -ketokyselin je následující: KIV, KIC, KC, KMV.

HPLC s fluorescenční detekcí

α -Ketokyseliny jsou látky, jež přirozeně nefluoreskují. K přeměně na fluoreskující látku se přidává derivatizační činidlo o-fenylendiamin (OPD). Vzniklý komplex je detekován při $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{-}355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$ [10,11,12,13,14,15].

Separaci komplexu se zvýší specifita, použitím fluorescenční detekce se navíc zvýší citlivost.



Obr. 4: Vznik fluoreskujících produktů po derivatizaci oxokyselin pomocí OPD [18]

Pro stanovení α -ketokyselin v plazmě a moči může být OPD nahrazen 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem (DDB) [19,20] nebo naftalen-2,3-diaminem [26]. Vzniklé komplexy se taktéž stanoví fluorimetricky (DDB: $\lambda_{\text{ex}} = 365\text{-}368 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$).

DALŠÍ DERIVATIZAČNÍ ČINIDLA

α -Ketokyseliny mohou být derivatizovány i s dalšími činidly. Jedním z nejčastěji používaných je 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) [4], dále pak 4,5-diaminofthalhydraziddihydrochlorid (DPH) [6]. Vzniklý komplex DNPH je stanoven spektrofotometricky při 366 nm a deriváty od DPH jsou stanoveny chemiluminiscenčně po reakci s peroxidem vodíku a hexakvanoželezitanem draselným.

EXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ (SPE)

Literární prameny uvádějí, že při přípravě vzorku z biologického materiálu je po derivatizaci nutná extrakce. Důležitý je výběr vhodného organického rozpouštědla. Nejčastěji využívaným extrakčním činidlem je ethylacetát [12,13,15].

Extrakci rozpouštědlem lze nahradit použitím SPE (solid phase extraction) s acetonitrilem nebo methanolem jako elučním činidlem. Extrakce se provádí na reverzních fázích, stejně jako separace (C18). Využitím SPE se sníží spotřeba organického činidla a vzorku, navíc se zkrátí čas přípravy vzorku [11].

2.3.3 Analýza enzymu oxidační dekarboxylasy

Enzymový komplex oxidativní dekarboxylasy se skládá ze tří podjednotek: E_{1b}, E_{2b}, E_{3b} o molekulové hmotnosti od 38 000 do 55 000 [24]. Určení enzymové aktivity dekarboxylasy by mohlo být vhodné k určení diagnózy MSUD, ačkoli enzymová aktivita však nemusí odpovídat fenotypovým projevům. Měření aktivity se provádí u lymfocytů a fibroblastů. Analýza využívá měření vzniklých produktů, například isovaleryl-koenzymu A. Produkty se separují pomocí HPLC a kvantifikují se spektrofotometricky. Výhodou této metody je, že odpadá práce s radioaktivně značenými ¹⁴C oxokyselinami nebo aminokyselinami s rozvětveným řetězcem [25].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉ POPULACE

Vzorky venózní krve byly získány od dobrovolných dárců krve na oddělení hematologie a krevní transfúze Nemocnice Pardubice.

Vzorky suchých krevních skvrn byly získány od novorozenců z pediatrického oddělení Nemocnice Pardubice.

3.2 MATERIÁL

3.2.1 Vzorky

Plazma

Vzorky krve byly odebrané do 9 ml zkumavek s obsahem protisrážlivého činidla EDTA, následně byly odstředěny (1 700 g, 15 minut, 8 °C) za účelem získání plazmy. Plazmu jsme před analýzou uskladnili v mrazícím boxu při teplotě -80 °C. Doba skladování nepřesáhla 2 měsíce.

Suché krevní skvrny

Krev byla od novorozenců odebírána na filtrační papíry (S&S 903). Po provedeném odběru byly skvrny sušeny při laboratorní teplotě. Takto odebrané vzorky byly skladovány, až do doby společného zpracování (jeden měsíc), při teplotě 4 °C. Pro analýzu jsme vyráželi skvrny o průměru 6 mm ze středu suchých krevních skvrn, což odpovídá přibližně 10 µl krve.

3.2.2 Chemikálie

Kyselina 3-methyl-2-oxobutanová, sodná sůl ($C_5H_7NaO_3$, Mr 138,13) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina 4-methyl-2-oxopentanová, sodná sůl ($C_6H_9NaO_3$, Mr 152,13) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina 3-methyl-2-oxopentanová, sodná sůl ($C_6H_9NaO_3$, Mr 152,13) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina 2-oxohexanová, sodná sůl ($C_6H_9NaO_3$, Mr 152,13) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chlorovodíková (HCl, $\rho = 1,18$, $w = 36,6\%$, Mr 36,45) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chloristá ($HClO_4$, $\rho = 1,664$, $w = 70\%$, Mr 100,46) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina 5-sulfosalicylová, dihydrát ($C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$, Mr 254,2) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina metafosforečná (HPO_3 , Mr 79,98) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Methanol gradient grade pro chromatografii LiChrosolv (R) (CH_4O , Mr 32,04) (Merck KGaA, Německo)

Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu S$)

o-fenylendiamin, dihydrochlorid ($C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$, Mr 181,1) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Chlorid sodný (NaCl, Mr 58,44) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2.3 Pomůcky a přístroje

Vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10 AD_{VP} (Shimadzu, Japonsko)

Autosampler SIL-10 AD_{VP} (Shimadzu, Japonsko)

Chromatografická kolona LiChroCart 125-4 Purospher Star RP-18endcapped, 5 μm , opatřená ochrannou kolonkou LiChroCart 4-4 Purospher Star RP-18encapped, 5 μm (Merck, Německo)

Termostat kolon CTO-10 AC_{VP} (Shimadzu, Japonsko)

Fluorescenční detektor RF-10 A_{XL} (Shimadzu, Japonsko)

Řídící systém SCL-10 A_{VP} (Shimadzu, Japonsko)

Vyhodnocovací software: Clarity (DataApex, Česká republika)

Analytické váhy LB-1050/2 (LABERTE, Maďarsko)

Digitální předvážky Sartorius 2000P (Sartorius, Německo)

Ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Slovensko)

Ultrazvuková vana K12 (Kraintek, Slovensko)

Mrazící box MDF-U3086S (Sanyo electric Co., Ltd., Japonsko)
Třepačka s nástavcem pro mikrozkušavky (Heidolph RELAX top, Německo)
Chlazená centrifuga MR 23 (Jouan, Francie)
Centrifuga Sorvall TC 6 (Du Pont, USA)
Filtrační aparatura Supelco (Supelco, USA)
Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 μm (Supelco, USA)
Polyethylenové mikrozkušavky s víčkem typu Eppendorf (1,5 ml)
Nylonové filtry pro filtrování vzorku, porozita 0,20 μm (Supelco, USA)
Kolonky SPE (Chromsystems, Německo)
Automatické pipety (Finnpipette, Finsko)
Multidávkoč (Eppendorf, Německo)
Skleněné vialky se šroubovacím víčkem
Kádinky, odměrné válce, odměrné baňky
Odběrové kartičky S&S 903 W-041, savost vody: 4,44 g/100 cm^2 (Schleicher a Schuell Bioscience, Německo)
Odběrové zkumavky Vacuette 9 ml (Greiner bio-one, Rakousko)
Statistický software QC Expert (TriloByte, Česká republika)

3.2.4 Pracovní roztoky

Zásobní roztok KIV (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0691 g KIV deionizovanou vodou nebo fyziologickým roztokem ve 100 ml odměrné baňce a přidáním 80 μl koncentrované HCl (11,91 mol/l).

Zásobní roztok KIC (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0761 g KIC deionizovanou vodou nebo fyziologickým roztokem ve 100 ml odměrné baňce a přidáním 80 μl koncentrované HCl (11,91 mol/l).

Zásobní roztok KMV (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0761 g KMV deionizovanou vodou nebo fyziologickým roztokem ve 100 ml odměrné baňce a přidáním 80 μ l koncentrované HCl (11,91 mol/l).

Zásobní roztok vnitřního standardu – ketokaproátu (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0761 g KC deionizovanou vodou ve 100 ml odměrné baňce a přidáním 80 μ l koncentrované HCl (11,91 mol/l).

Pracovní roztok vnitřního standardu (asi 500 μ mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 100 μ l zásobního roztoku KC 900 μ l deionizované vody.

Kyselina chlorovodíková, 200 ml (asi 2 mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 33 ml koncentrované HCl na konečný objem 200 ml. Roztok byl uchováván v chladničce.

Eluční činidlo s vnitřním standardem

Ke 100 ml deionizované vody bylo přidáno 50 μ l HCl (2 mol/l) a 100 μ l (asi 5 mmol/l) I.S.

Fyziologický roztok, 1 l (asi 0,85%)

Navážka 8,51 g NaCl byla rozpuštěna v 1 l deionizované vody.

Roztok kyseliny chloristé, 10 ml (asi 1 mol/l)

Do 10 ml odměrné baňky bylo přidáno k 5 ml deionizované vody 0,9 ml HClO₄. Poté byl objem doplněn deionizovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván v chladničce.

Roztok kyseliny 5-sulfosalicylové, 10 ml (asi 30%)

Navážka 3 g byla rozpuštěna v 7 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce.

Roztok kyseliny metafosforečné, 10 ml (asi 5%)

Navážka 0,5 g byla rozpuštěna v 9,5 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce.

Roztok o-fenylendiaminu (OPD)

Navážka 0,1021 g byla rozpuštěna přesně v 20 ml 2 mol/l HCl. Roztok jsme uchovávali maximálně 4 dny při teplotě 4 °C.

Mobilní fáze A1: 55% methanol

K 1100 ml methanolu bylo přidáno 900 ml vody. Mobilní fáze byla přefiltrována přes nylonový filtr (0,20 µm) a odvzdušněna pomocí ultrazvuku.

Mobilní fáze A2: 50% methanol

K 1000 ml methanolu bylo přidáno 1000 ml vody. Mobilní fáze byla přefiltrována přes nylonový filtr (0,20 µm) a odvzdušněna pomocí ultrazvuku.

Mobilní fáze B: 100% methanol

Mobilní fáze byla připravena odměřením 1000 ml methanolu, který byl přefiltrován přes nylonový filtr (0,20 µm) a odvzdušněn v ultrazvuku.

Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu\text{S}$)

Deionizovaná voda byla přefiltrována přes nylonový filtr (0,20 µm).

3.3 POSTUP STANOVENÍ OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETĚZCEM POMOCÍ HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ

Stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem bylo provedeno v plazmě, která byla získána od dobrovolných dárců krve, a ze suchých krevních skvrn od novorozenců.

3.3.1 Příprava vzorku

3.3.1.1 Příprava vzorků plazmy

Plazma byla získána po odstředění krve v odběrové zkumavce obsahující EDTA. K 200 μ l plazmy bylo přidáno 200 μ l deproteinačního činidla (1 mol/l HClO_4) a 20 μ l pracovního roztoku vnitřního standardu (α -ketokaproát). Směs byla promíchána na třepačce, inkubována 10 minut v chladničce a po promíchání byla centrifugována (22 000 g, 4 $^\circ\text{C}$, 10 minut). Dvě stě mikrolitrů supernatantu bylo odtáhnuto do čisté polyethylenové mikrozkušavky.

3.3.1.2 Příprava vzorků suchých krevních skvrn (DBS)

Z kartiček od novorozenců obsahující suché krevní skvrny byly vyraženy terčíky o průměru 6 mm. Takto získaný terčík byl umístěn do mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 200 μ l elučního činidla s I.S. Po 30-ti minutovém intenzivním třepání bylo ke směsi přidáno 10 μ l deproteinačního činidla (11,59 mol/l HClO_4). Směs byla promíchána na třepačce, inkubována (10 minut v chladničce) a po promíchání byla centrifugována (22 000 g, 4 $^\circ\text{C}$, 10 minut). Sto padesát mikrolitrů supernatantu bylo odtáhnuto do čisté polyethylenové mikrozkušavky.

3.3.1.3 Derivatizace s o-fenylendiaminem

K jednomu dílu supernatantu byl přidán jeden díl derivatizačního činidla (200 μ l OPD pro plazmu a 150 μ l OPD pro DBS). Po důkladném promíchání byly vzorky inkubovány 30 minut při 50 $^{\circ}$ C. Poté byly vzorky ochlazeny v chladni čce (10 minut) a přefiltrovány. Filtrace byla prováděna v centrifuze (22 000 g, 4 $^{\circ}$ C, 5 minut). Filtrát byl přepipetován do skleněných vialek pro autosampler.

3.3.2 Chromatografická analýza

Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem byly stanoveny metodou HPLC v systému obrácených fází s fluorescenční detekcí.

3.3.2.1 HPLC parametry

HPLC sestava: čerpadlo, autosampler (chlazený na 8 $^{\circ}$ C), kolona termostatována na 30 $^{\circ}$ C (LiChroCart 125-4 Purospher Star RP-18endcapped, 5 μ m, opatřená ochrannou kolonkou LiChroCart 4-4 Purospher Star RP-18encapped, 5 μ m), fluorescenční detektor, řídicí systém

HPLC podmínky pro plazmu:

Mobilní fáze A: methanol – voda [55:45, v/v]

Mobilní fáze B: 100% methanol

Časový program gradientové eluce:	0,01 min	5%	B
	22,00 min	5%	B
	22,01 min	100%	B
	27,00 min	100%	B
	27,01 min	5%	B
	30,00 min	STOP	

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Dávkovaný objem: 20 μ l (2 μ l/s)

3.3.3 Kalibrační křivka pro stanovení v plazmě

Pro kvantifikaci oxokyselin s rozvětveným řetězcem v plazmě bylo použito metody kalibrační křivky. Pro konstrukci kalibrační křivky byly naředěním zásobních roztoků oxokyselin (asi 5 mmol/l) deionizovanou vodou připraveny standardy (o koncentraci 0 až 100 $\mu\text{mol/l}$). Rovnice kalibračních křivek byla získána proložení závislosti poměru ploch píků (plocha píku jednotlivé oxokyseliny/plocha píku vnitřního standardu) na koncentraci metodou nejmenších čtverců.

3.3.4 Kalibrační křivka pro stanovení v suchých krevních skvrnách

Pro kvantifikaci oxokyselin s rozvětveným řetězcem v suchých krevních skvrnách bylo použito metody kalibrační křivky. Pro její konstrukci byly naředěním zásobních roztoků oxokyselin (oxokyseliny ve fyziologickém roztoku asi 5 mmol/l) fyziologickým roztokem připraveny standardy (o koncentraci 0 až 2000 $\mu\text{mol/l}$). Z těchto standardů bylo vždy odpipetováno 50 μl (od KIV, od KIC a od KMV) a doplněno 850 μl plné krve na konečný objem 1 ml. Tím byla získána „krevní kalibrace“ (o koncentraci 0 až 100 $\mu\text{mol/l}$). Takto vytvořená „krevní kalibrace“ byla rozpipetována po 30 μl na filtrační savé papíry (S&S 903). Po rozpipetování byla „krevní kalibrace“ sušena při laboratorní teplotě a skladována, až do doby společného zpracování se vzorky, při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Pro analýzu se vyrážely skvrny o průměru 6 mm ze středu suchých krevních skvrn, což odpovídá přibližně 10 μl krve. „Krevní kalibrace na skvrnách“ byla dále zpracována stejně jako vzorky suchých krevních skvrn. Rovnice kalibračních křivek byla získána proložení závislosti poměru ploch píků (plocha píku jednotlivé oxokyseliny/plocha píku vnitřního standardu) na koncentraci metodou nejmenších čtverců.

3.3.5 Analytické parametry

3.3.5.1 Přesnost v sérii

Přesnost stanovení oxokyselin v sérii (intra-assay) byla určena analýzou 10 stejných vzorků (plazma a suché krevní skvrny). Vzorky byly analyzovány během jednoho dne. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient (CV%):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n-1}}$$

$$CV\% = \frac{SD}{AVG} * 100$$

SD je směrodatná odchylka, **x_i** je koncentrace vždy jednoho ze vzorků v sérii, **AVG** je průměrná hodnota koncentrací všech vzorků v sérii a **n** je počet vzorků v sérii.

3.3.5.2 Recovery test

Výtěžnost metody (recovery) byla zjištěna pomocí přidavků známého množství jednotlivých oxokyselin ke vzorkům. Přidavky byly voleny tak, aby se konečná koncentrace pohybovala v rozmezí daném rozsahem kalibrační křivky.

Hodnoty výtěžnosti metody (recovery) byly vypočítány jako stonásobek poměru mezi nalezeným množstvím jednotlivých oxokyselin a přidaným množstvím jednotlivých oxokyselin:

$$recovery(\%) = 100 * \frac{x_i - x_0}{y},$$

kde **x_i** je koncentrace vzorku s přidavkem, **x_0** je endogenní koncentrace a **y** je přidané množství analytu.

3.4 ÚPRAVA VZORKŮ PŘED HPLC ANALÝZOU

3.4.1 Srovnání deproteinačních roztoků

Byla testována 4 deproteinační činidla ve vzorcích plazmy: 1 mol/l HClO_4 , 30% kyselina sulfosalicylová, 5% kyselina metafosforečná a 100% methanol. Vzorky byly upraveny výše uvedeným postupem (3.3.1.1).

3.4.2 Srovnání úpravy vzorku s použitím SPE a bez použití SPE

Byl testován vzorek plazmy, který byl po derivatizaci aplikován na kolonku SPE za účelem odstranění nečistot. Na kolonku SPE bylo nanášeno 400 μl vzorku, podrobena centrifugaci (2000 ot./min, 2 minuty) a efluent byl vyhozen. Následovalo promytí eluentem E1 (400 μl , methanol - voda, 1:4, v/v), E2 (400 μl , aceton - voda, 1:9, v/v) při (2000 ot./min, 2 minuty) a oba efluenty byly vyhozeny. Nakonec byl vzorek vymyt eluentem E3 (400 μl , metanol - voda, 4:1, v/v). Eluent E3 byl přefiltrován v centrifuze (22 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 minut) a následně nastříknut na kolonu. Kolonky byly regenerované 1 ml hexanu, 1 ml 2-propanolu, 1 ml methanolu a kondicionovány pro další vzorek 1 ml deionizované vody.

3.4.3 Porovnání elučních činidel

Byly porovnávány vzorky DBS, na které byly ještě před odběrem nakapány 2 μl I.S. a které byly eluovány přímo deproteinačním činidlem (1 mol/l HClO_4) a vzorky DBS, které byly eluovány elučním činidlem s I.S.

3.4.4 Test stability

3.4.4.1 Stabilita vnitřního standardu – OPD

V průběhu 56 hodin (po 11,2 hodinách) byla sledována stabilita derivátu vnitřní standard-OPD uchovávaného při 4 °C. Vzorek byl připraven výše uvedeným postupem. Derivát byl získán derivatizací vzorku suché krevní skvrny.

3.5 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro statistické zpracování dat byl použit program MS Excel a program poskytovaný systémem QC Expert (TriloByte, ČR). Statistické zpracování bylo provedeno na hladině významnosti 0,05.

4 VÝSLEDKY

4.1 CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA

Přílohy 1, 2 a 3 zobrazují stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem pomocí HPLC s fluorescenční detekcí v systému obrácenných fází. V Příloze 1 je záznam chromatogramu standardů jednotlivých oxokyselin. V Příloze 2 je záznam chromatogramu oxokyselin v plazmě a v Příloze 3 je záznam chromatogramu oxokyselin v suchých krevních skvrnách.

4.1.1 Nastavení vhodné citlivosti fluorescenčního detektoru

Senzitivitu (sens) je možné nastavit na tři úrovně. Úroveň vysoká - 1, střední - 2 a nízká - 3. Nastavením střední senzitivity je docíleno 32x a vysoké senzitivity 1024x vyšší citlivosti než na úrovni 1. Také zesílení (gain) disponuje třemi stupni. Zde je nejmenší zesílení 1 a největší zesílení je 3. Vzájemnou kombinací senzitivity a zesílení lze dosáhnout různého stupně citlivosti detektoru (Tab. 4). Pro stanovení oxokyselin v plazmě byla citlivost detektoru zvýšena 512x a pro stanovení oxokyselin v DBS byla citlivost zvýšena 1024x. Tím bylo dosaženo 2x větší citlivosti detektoru. Celková citlivost u DBS se zvětšila 4x, jelikož jsme dávkovali dvojnásobné množství (40 μ l) oproti plazmě (20 μ l).

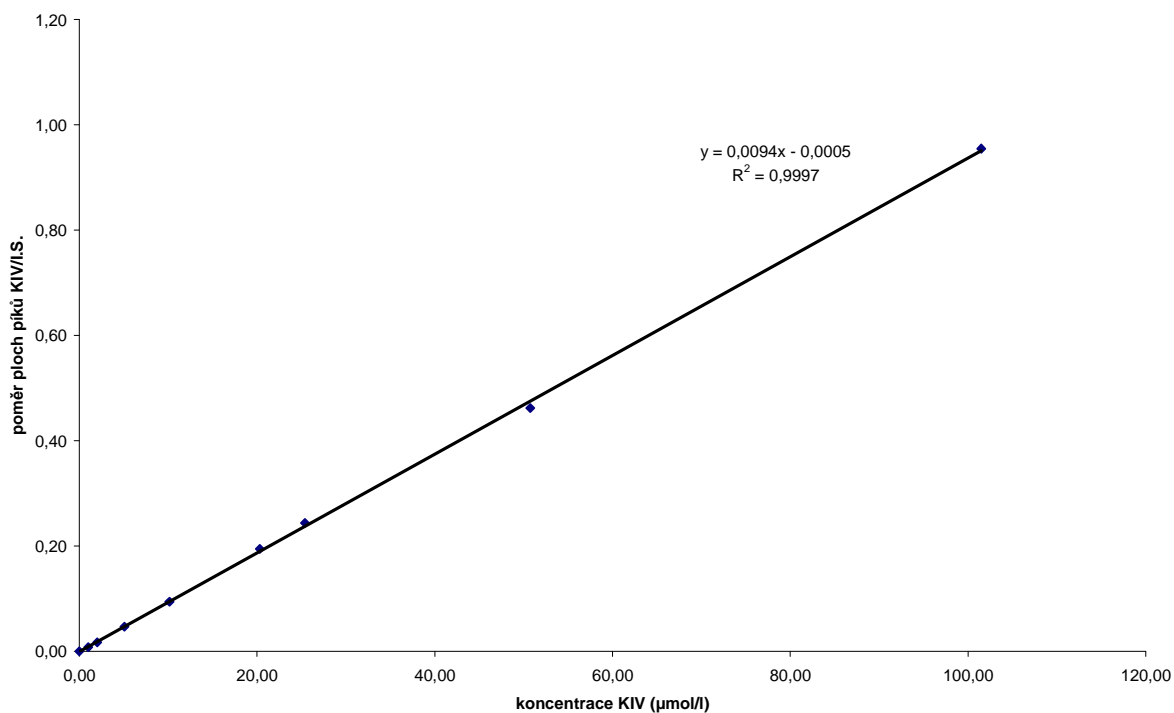
Tab. 4: Možnosti nastavení citlivosti fluorescenčního detektoru

senzitivita	zesílení	Zvětšení citlivosti detektoru
3 (nízká)	1(x1)	x1
3 (nízká)	2(x4)	x4
3 (nízká)	3(x16)	x16
2 (střední)	1(x1)	x32
2 (střední)	2(x4)	x128
2 (střední)	3(x16)	x512
1(vysoká)	1(x1)	x1024
1(vysoká)	2(x4)	x4096
1(vysoká)	3(x16)	x16384

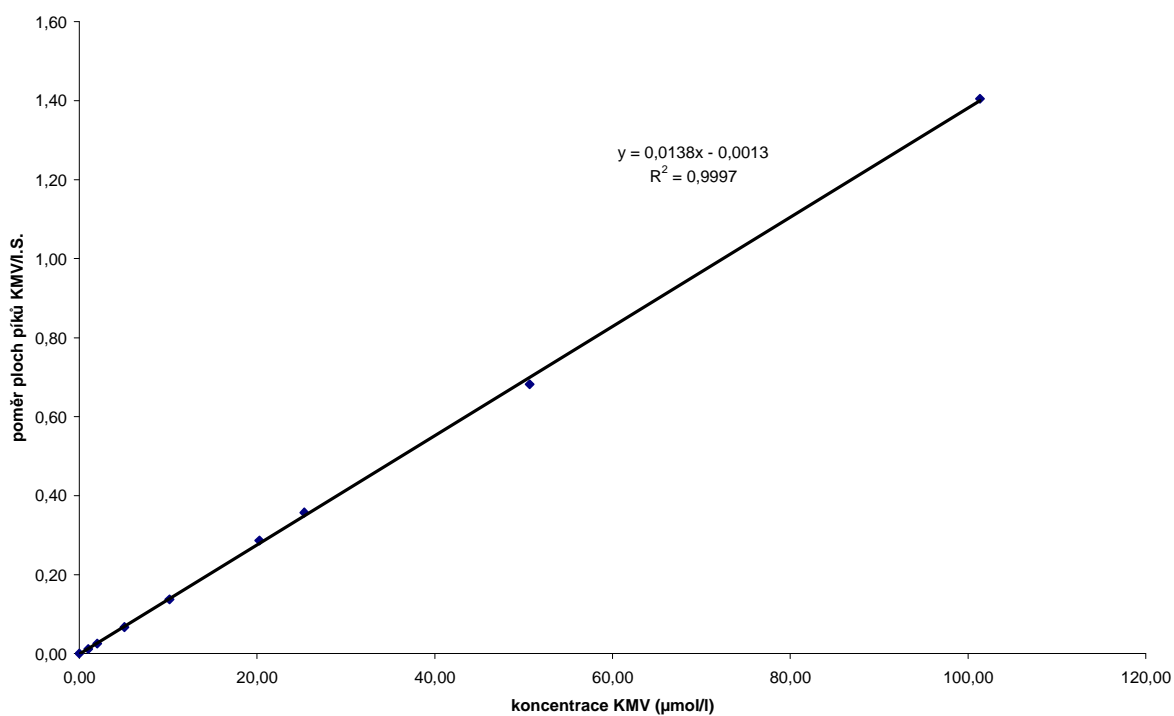
4.1.2 Kalibrační křivka pro stanovení v plazmě

Kalibrační závislost poměru plochy píků KIV a KMV k vnitřnímu standardu na koncentraci je znázorněna na obrázku 5 a 6. Křivky vykazují lineární průběh v celém rozsahu použitých koncentrací, a to asi od 0 do 101,5 $\mu\text{mol/l}$ pro KIV a od 0 do 101,4 $\mu\text{mol/l}$ pro KMV.

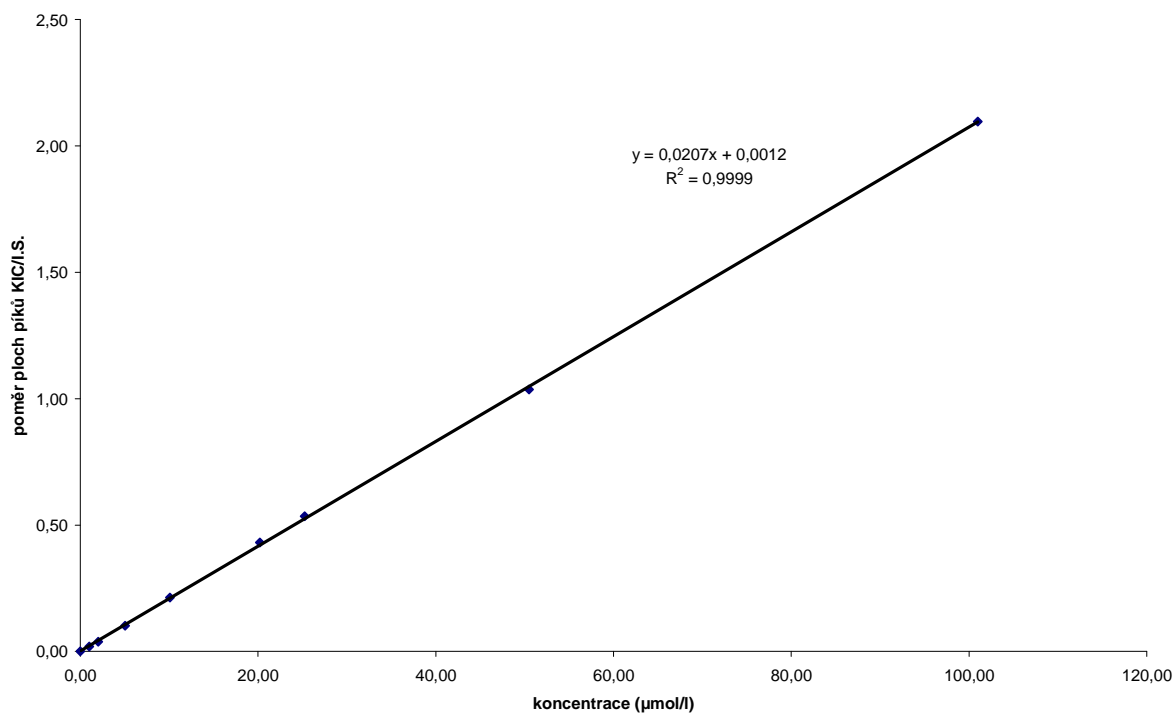
Kalibrační závislost poměru plochy píku KIC k vnitřnímu standardu na koncentraci je znázorněna na obrázku 7. Křivka vykazuje lineární průběh v celém rozsahu použitých koncentrací, a to asi od 0 do 101 $\mu\text{mol/l}$. Na obrázku 8 je znázorněn průběh kalibrační závislosti KIC a je viditelné, kde linearita není už zachována.



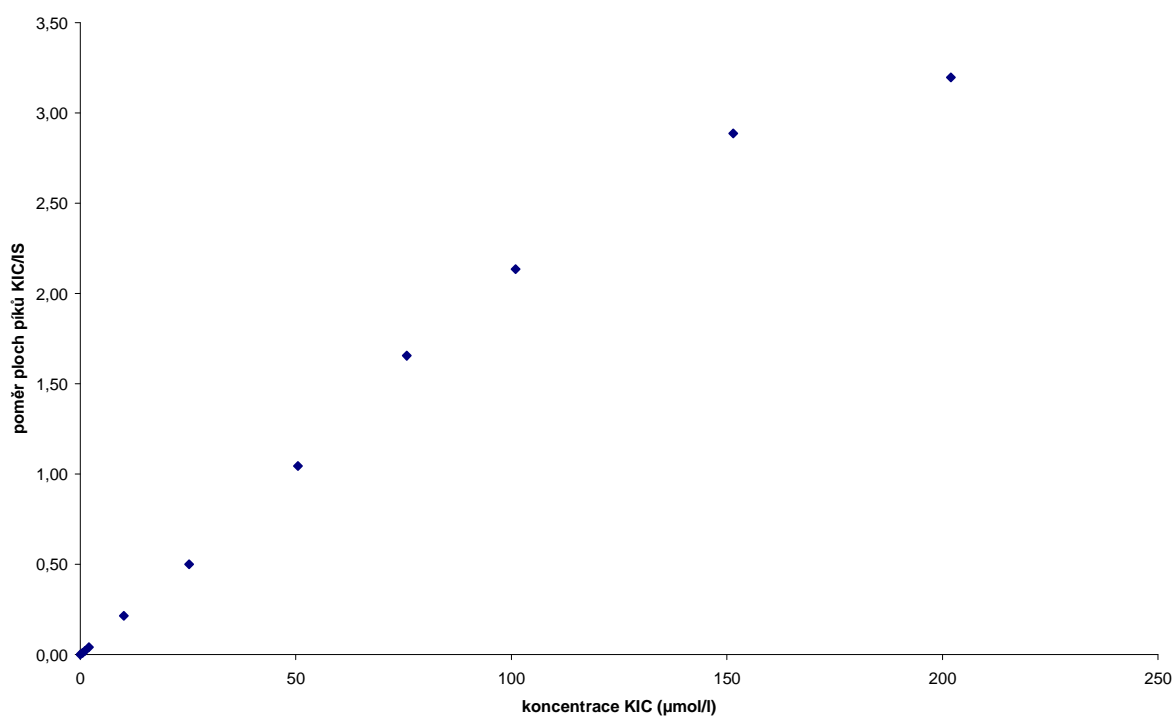
Obr. 5: Kalibrační křivka pro stanovení ketoisovalerátu v plazmě



Obr. 6: Kalibrační křivka pro stanovení ketomethylvalerátu v plazmě



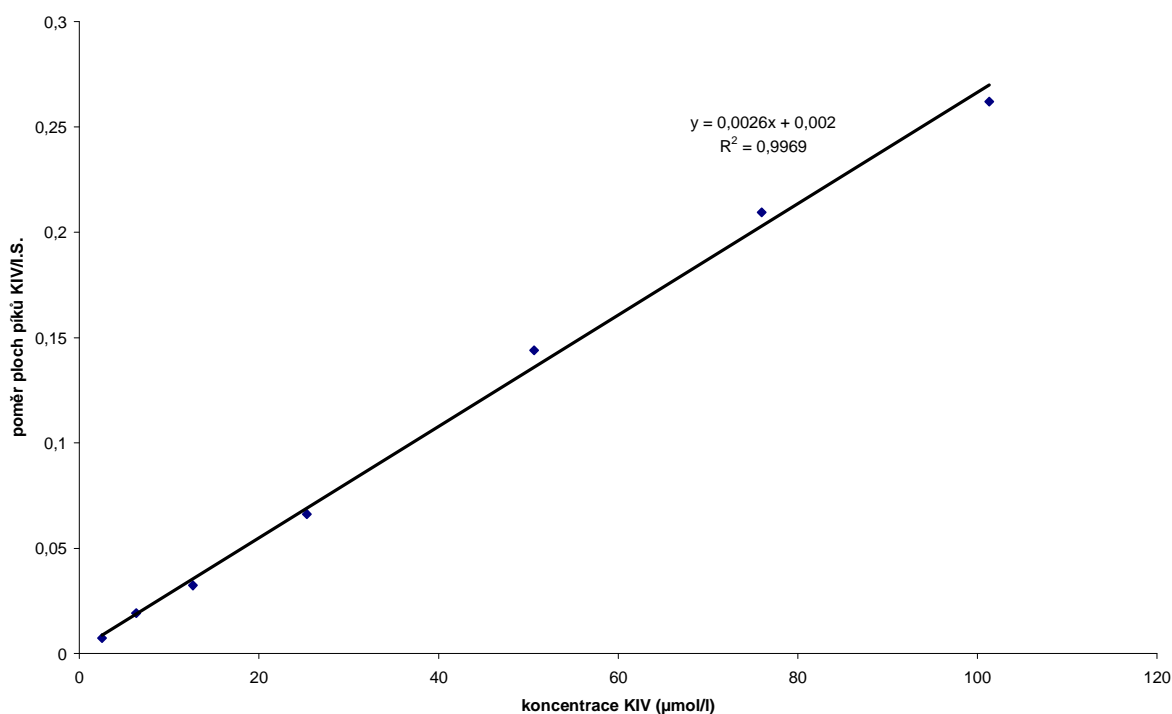
Obr. 7: Kalibrační křivka pro stanovení ketoisokaproátu v plazmě



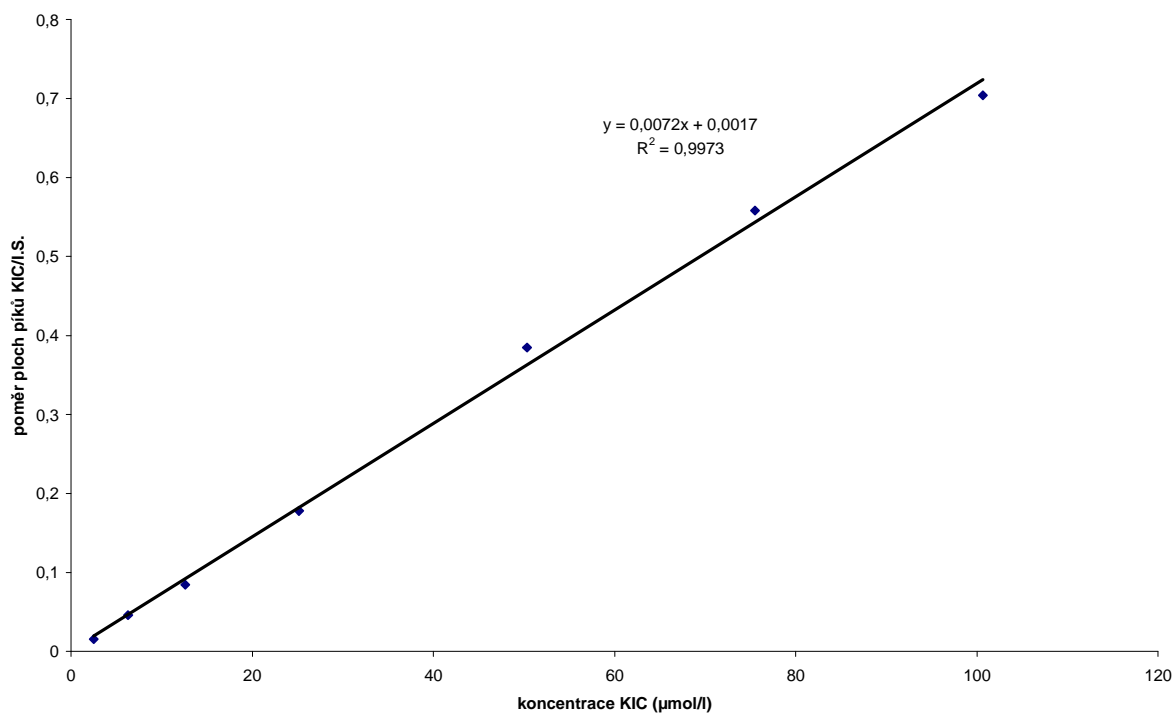
Obr. 8: Kalibrační křivka pro stanovení ketoisokaproátu v plazmě, kde je již patrná nelineární oblast

4.1.3 Kalibrační křivka pro stanovení v suchých krevních skvrnách

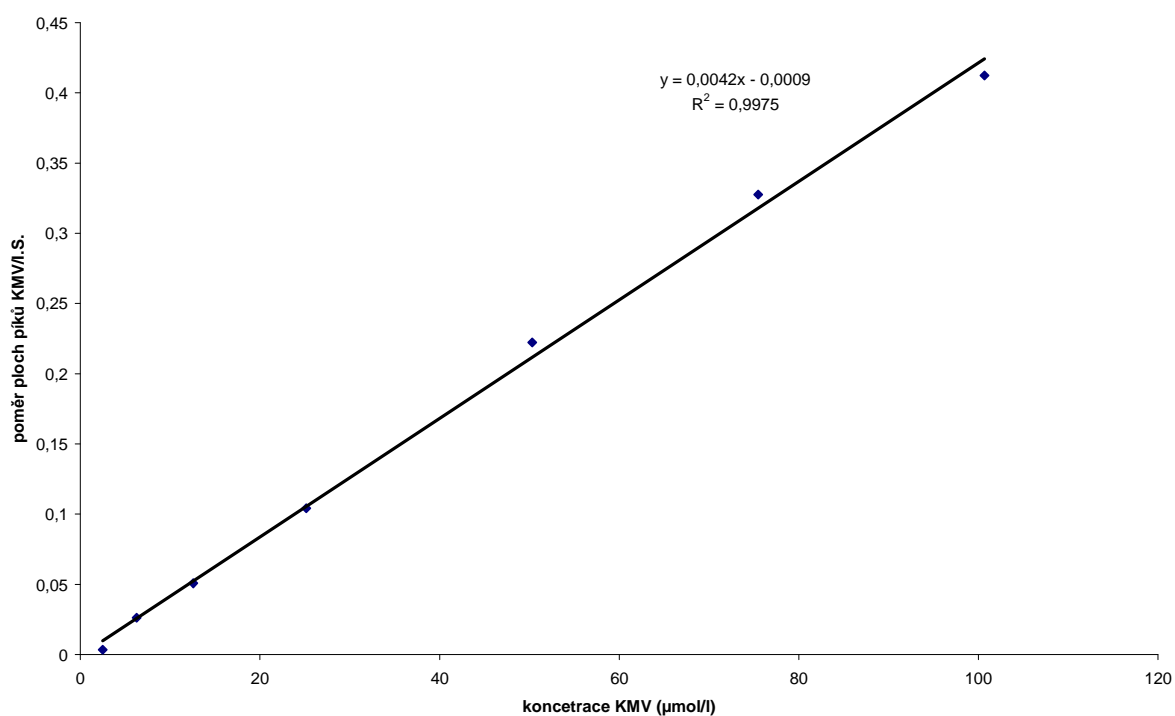
Kalibrační závislost poměru plochy píků KIV, KIC a KMV k vnitřnímu standardu na koncentraci je znázorněna na obrázku 9, 10 a 11. Jelikož jako matrice k této kalibraci sloužila krev, poměr ploch píků nulového bodu nebyla nulová hodnota. Proto byl každý poměr plochy píků jednotlivých bodů kalibrace odečten od poměru plochy píků nulového bodu. Křivky vykazují lineární průběh v celém rozsahu použitých koncentrací, a to asi od 0 do 101,3 $\mu\text{mol/l}$ pro KIV a od 0 do 100,7 $\mu\text{mol/l}$ pro KIC, KMV.



Obr. 9: Kalibrační křivka získaná z DBS pro stanovení ketoisovalerátu v DBS



Obr. 10: Kalibrační křivka získaná z DBS pro stanovení ketoisokaproátu v DBS



Obr. 11: Kalibrační křivka získaná z DBS pro stanovení ketomethylvalerátu v DBS

4.1.4 Analytické parametry

4.1.4.1 Přesnost v sérii

Přesnost stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem v sérii (intra-assay) je uvedena v následujících tabulkách.

Tab. 5: Přesnost stanovení oxokyselin ve vzorcích plazmy

Analyt	Počet měření	Průměr (AVG) ($\mu\text{mol/l}$)	Směrodatná odchylka (SD) ($\mu\text{mol/l}$)	Variační koeficient (CV%)
KIV	10	13,37	0,57	4,26
KIC	10	41,55	1,70	4,10
KMV	10	17,21	0,60	3,50

Tab. 6: Přesnost stanovení oxokyselin ve vzorcích suchých krevních skvrn

Analyt	Počet měření	Průměr (AVG) ($\mu\text{mol/l}$)	Směrodatná odchylka (SD) ($\mu\text{mol/l}$)	Variační koeficient (CV%)
KIV	10	11,31	0,42	3,67
KIC	10	25,02	0,90	3,58
KMV	10	17,05	0,54	3,18

4.1.4.2 Výtěžnost (recovery test)

Pomocí recovery testu byla otestována správnost stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tab. 7: *Správnost stanovení oxokyselin ve vzorcích plazmy*

KIV		KIC		KMV	
Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)	Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)	Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)
2,05	92,20	2,11	92,89	1,98	106,06
4,10	92,93	4,22	89,10	3,96	91,92
10,25	100,98	10,55	96,02	9,90	93,03
25,63	93,99	26,38	91,02	24,75	93,01
Průměrná výtěžnost (%)	95,02	Průměrná výtěžnost (%)	92,26	Průměrná výtěžnost (%)	96,01
Směrodatná odchylka (SD)	3,50	(SD)	2,55	(SD)	5,82
CV (%)	3,68	CV (%)	2,77	CV (%)	6,07

Tab. 8: *Správnost stanovení oxokyselin ve vzorcích suchých krevních skvrn*

KIV		KIC		KMV	
Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)	Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)	Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)
12,66	101,97	12,58	103,97	12,58	103,97
25,33	104,97	25,16	98,01	25,16	95,99
50,65	105,98	50,33	108,01	50,33	99,01
75,98	106,99	75,49	105,99	75,49	108,99
Průměrná výtěžnost (%)	104,98	Průměrná výtěžnost (%)	104,00	Průměrná výtěžnost (%)	101,99
Směrodatná odchylka (SD)	1,88	(SD)	3,74	(SD)	4,95
CV (%)	1,79	CV (%)	3,59	CV (%)	4,85

4.2 ÚPRAVA VZORKU PŘED HPLC ANALÝZOU

4.2.1 Srovnání deproteinačních roztoků

Porovnávaly se chromatografické záznamy plazmy upravené různými deproteinačními činidly (1 mol/l HClO_4 , 30% kyselina sulfosalicylová, 5% kyselina metafosforečná a 100% methanol). Deproteinace neprobíhala skoro vůbec v prostředí 5% kyseliny metafosforečné. Taktéž deproteinace se 100% methanolem neprobíhala příliš dobře, problém se vyskytl v dalším zkušebním postupu (v odpařování supernatantu pod dusíkem). Deproteinace s 30% kyselinou sulfosalicylovou a s 1 mol/l HClO_4 probíhaly přibližně stejně. U 30% kyseliny sulfosalicylové se však v prvních minutách objevoval široký pík obsahující neznámé látky, díky němuž se dlouho ustavovala základní linie (Příloha 4). Z tohoto důvodu se jako nejvhodnější deproteinační činidlo zvolila 1 mol/l HClO_4 (Příloha 5).

4.2.2 Srovnání úpravy vzorku s použitím SPE a bez použití SPE

Porovnával se vzorek plazmy, který byl několikrát aplikován na stejnou kolonku SPE za účelem odstranění nečistot na začátku chromatografického záznamu. Obsah nečistot se znatelně snížil. Kritická se však ukázala výtěžnost kolonek SPE (Příloha 6). Z tohoto důvodu nebyla extrakce na pevné fázi dále používána.

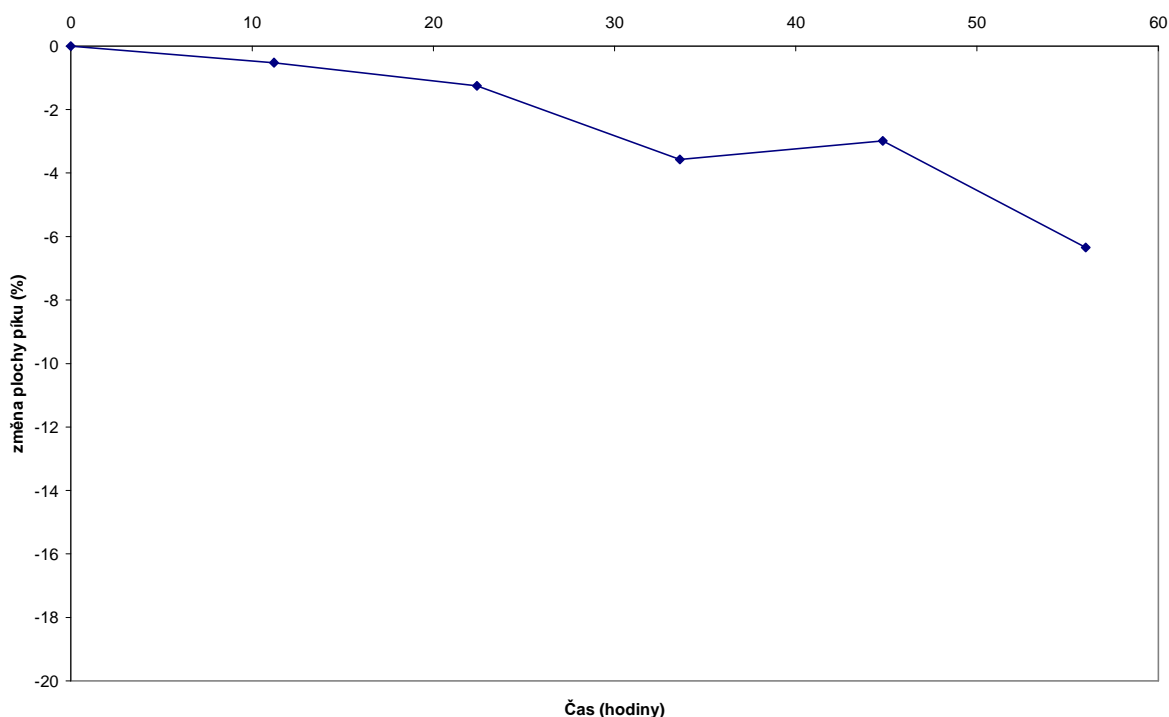
4.2.3 Porovnání elučních činidel z DBS

Pokud byl použit postup, že I.S. byl nakapán nejdříve na odběrové kartičky a až poté byl na ně aplikován vzorek a který byl eluován přímo deproteinačním činidlem, tak se ukázalo, že tato metoda je velmi nepřesná. Mnohem větší přesnost byla zjištěna u vzorku, který byl eluován elučním činidlem s vnitřním standardem.

4.2.4 Test stability

4.2.4.1 Stabilita vnitřního standardu – OPD

Obrázek 12 znázorňuje procentuální stabilitu rozdílu plochy píku I.S. oproti ploše píku I.S. v čase 0 v průběhu 56 hodin. Z tohoto grafu je patrné, že plochy píku I.S. výrazně nekolísají, což ukazuje na vysokou stabilitu derivátu vnitřního standardu. Pokud by se změnila stabilita jednotlivých oxokyselin, korespondovala by s tím i stabilita I.S. Pozorování bylo tudíž zvoleno z toho důvodu, že I.S. má největší plochu píku (mV.s). Pokud bychom uvedli i změny v ploše píků u KIV a KMV, byly by tyto hodnoty velice zavádějící, jelikož jejich plochy jsou znatelně menší s výjimkou KIC. Změna I.S. v ploše píku o 1% odpovídá změně v ploše píku o 26,98 (mV.s). Naproti tomu například změna v ploše píku o 1% u KIV odpovídá už změně v ploše píku o 0,647 (mV.s). Z toho důvodu obrázek č. 12 uvádí jen stabilitu I.S.



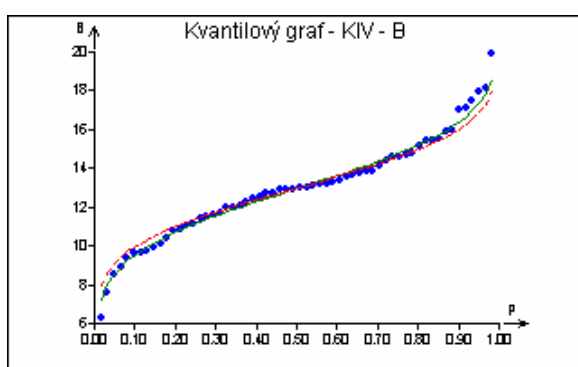
Obr. 12: Stabilita derivátu vnitřního standardu sledovaná během 56 hodin

4.3 DISTRIBUCE HLADIN OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETEZCEM V SOUBORU DOBROVOLNÝCH DÁRCŮ KRVE

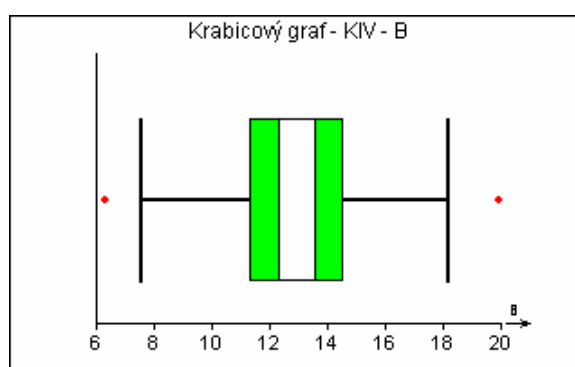
Vzorky venózní krve byly získány od dobrovolných dárců krve na oddělení hematologie a krevní transfúze Nemocnice Pardubice. Soubor zahrnoval 30 mužů a 30 žen ve věku 19 až 61 let (průměrný věk 33 let).

4.3.1 Hladiny ketoisovalerátu

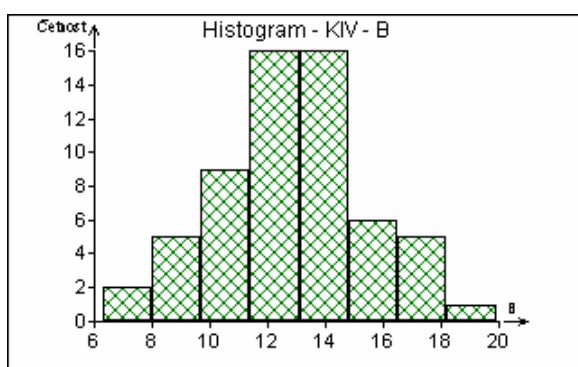
Hodnoty ketoisovalerátu se v plazmě pohybovaly v rozmezí $12,94 \pm 2,64 \mu\text{mol/l}$. Průměr není věrohodný, medián je statisticky významnější ($12,98 \mu\text{mol/l}$). Předpoklad normality testovaného souboru byl přijat, předpoklad homogenity přijat. Jako optimální rozdělení bylo navrženo rozdělení Laplaceovo (korelační koeficient linearity, p-p = 0,9962).



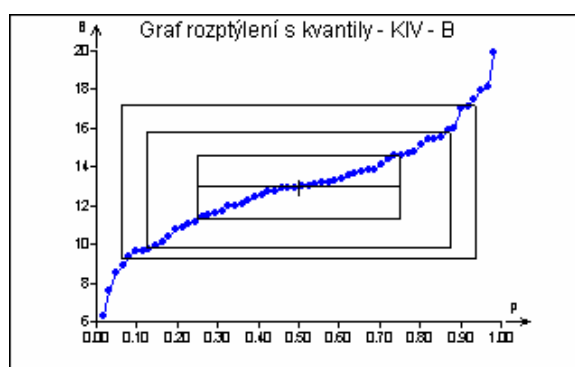
Obr. 13: Kvantilový graf



Obr. 14: Krabicový graf



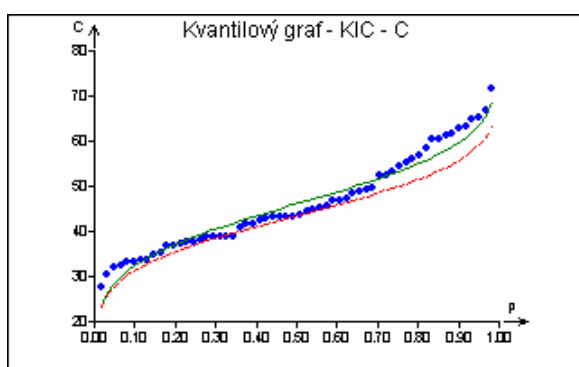
Obr. 15: Histogram



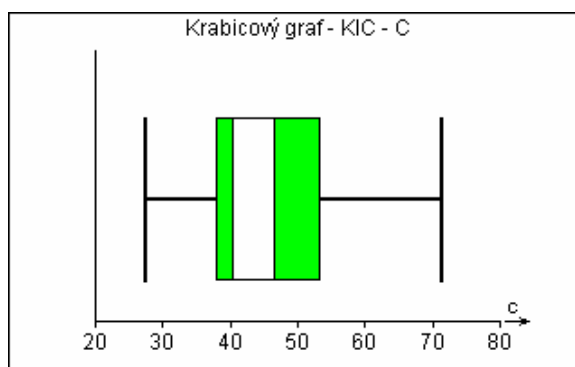
Obr. 16: Graf rozptýlení s kvantily

4.3.2 Hladiny ketoisokaproátu

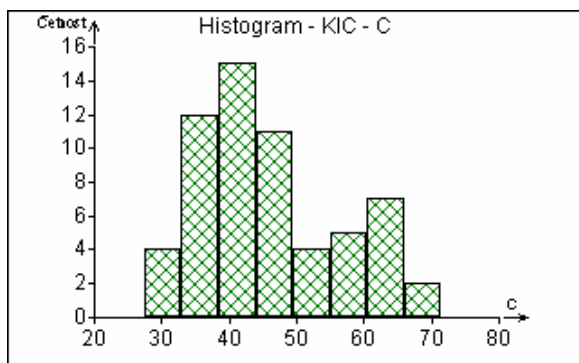
Hodnoty ketoisokaproátu se v plazmě pohybovaly v rozmezí $46,06 \pm 10,63 \mu\text{mol/l}$. Průměr není věrohodný, medián je statisticky významnější ($43,49 \mu\text{mol/l}$). Předpoklad normality testovaného souboru byl přijat, předpoklad homogenity přijat. Jako optimální rozdělení bylo navrženo rozdělení Lognormální (korelační koeficient linearity, p-p = 0,9926).



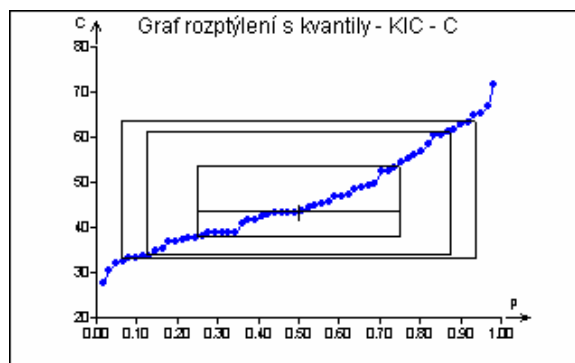
Obr. 17: Kvantilový graf



Obr. 18: Krabicový graf



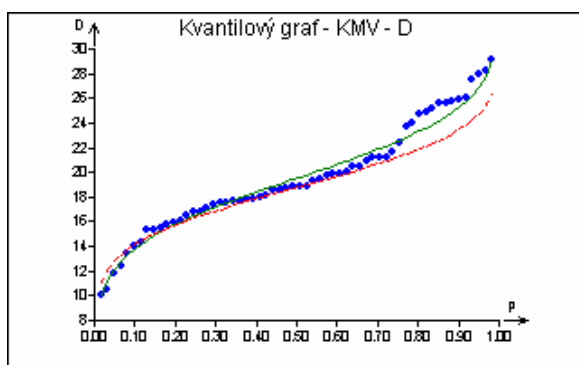
Obr. 19: Histogram



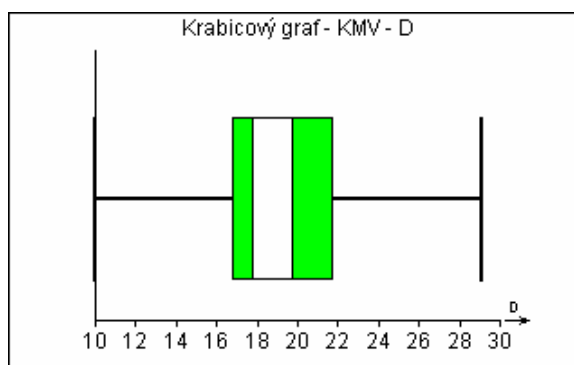
Obr. 20: Graf rozptýlení s kvantily

4.3.3 Hladiny ketomethylvalerátu

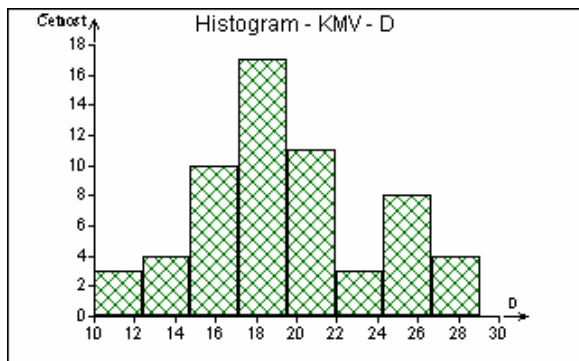
Hodnoty ketomethylvalerátu se v plazmě pohybovaly v rozmezí $19,52 \pm 4,47 \mu\text{mol/l}$. Průměr není věrohodný, medián je statisticky významnější ($18,79 \mu\text{mol/l}$). Předpoklad normality testovaného souboru byl přijat, předpoklad homogenity přijat. Jako optimální rozdělení bylo navrženo rozdělení Laplaceovo (korelační koeficient linearit, p-p = 0,9913).



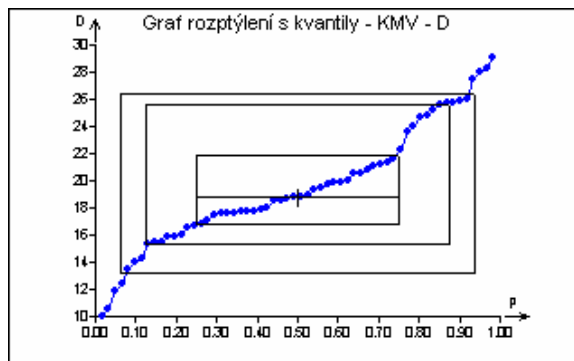
Obr. 21: Kvantilový graf



Obr. 22: Krabicový graf



Obr. 23: Histogram



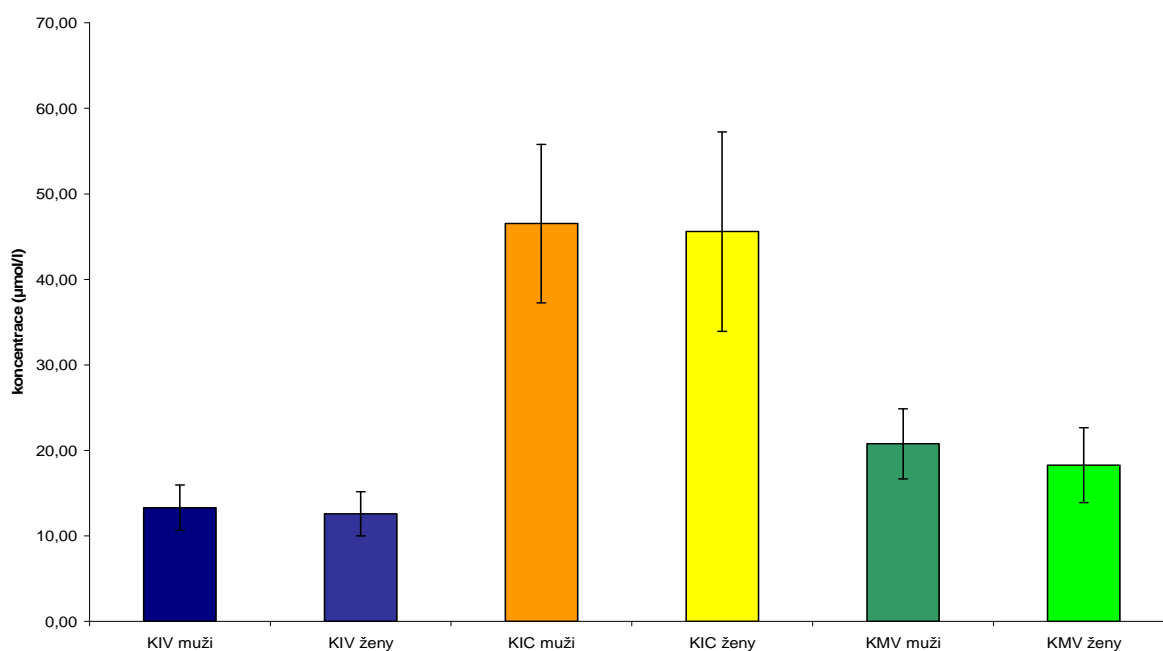
Obr. 24: Graf rozptýlení s kvantily

4.3.4 Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV

Tabulka 9 a obrázek 25 zobrazuje vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV. Hladiny KIV a KIC naměřené u mužů a žen se statisticky významně neliší (test shody: $p_{KIV} = 0,3067$, $p_{KIC} = 0,7316$). Hladiny KMV naměřené u mužů jsou statisticky významně vyšší (test shody: $p_{KMV} = 0,0295$).

Tab. 9: Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV

Analyt	n	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	95% spolehlivost		Medián ($\mu\text{mol/l}$)	
				Spodní mez ($\mu\text{mol/l}$)	Horní mez ($\mu\text{mol/l}$)		
KIV	muži	30	13,30	2,70	12,29	14,31	13,03
	ženy	30	12,59	2,63	11,60	13,57	12,84
KIC	muži	30	46,53	9,42	43,02	50,05	44,18
	ženy	30	45,58	11,86	41,15	50,01	42,95
KMV	muži	30	20,76	4,18	19,20	22,32	19,10
	ženy	30	18,27	4,46	16,61	19,94	17,92



Obr. 25: Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV

Graf zobrazuje průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami

4.3.5 Korelace mezi hladinami oxokyselin s rozvětveným řetězcem a hladinami aminokyselin s rozvětveným řetězcem v plazmě

Metodou lineární regresní diagnostiky a korelační analýzou jsme zjišťovali možné korelace mezi hladinami BCKA a BCAA v souboru dobrovolných dárců krve. BCAA byly změřeny pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci s o-ftaldialdehydem [28]. V souboru dobrovolných dárců krve jsme zjistili statisticky významné korelace mezi hladinami BCKA a BCAA s výjimkou KIV a Valinu, kde korelace nebyla zjištěna.

Tab. 10: *Korelace hladin BCAA oproti BCKA v souboru dobrovolných dárců krve*

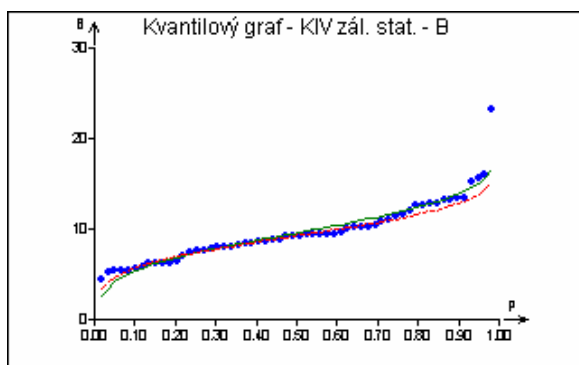
Analyt v plazmě	R ² (koeficient determinace)	p (Fisher - Snedecorův test)	Spearmanova korelace	korelace
KIV a Valin	0,0602	0,0587	0,2586	NE
KIC a Leucin	0,1609	0,0015	0,4393	ANO
KMV a Isoleucin	0,1444	0,0027	0,3773	ANO

4.4 DISTRIBUCE HLADIN OXOKYSELIN S ROZVĚTVENÝM ŘETEZCEM U NOVOROZENCŮ

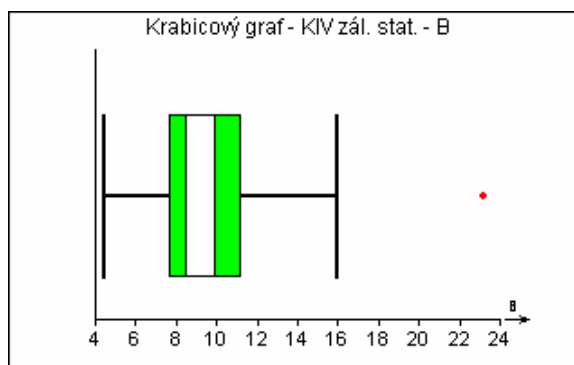
Vzorky suchých krevních skvrn byly získány od novorozenců z pediatrického oddělení Nemocnice Pardubice. Soubor zahrnoval 30 děvčat a 28 chlapců (ve věku 3-5 dnů).

4.4.1 Hladiny ketoisovalerátu u novorozenců

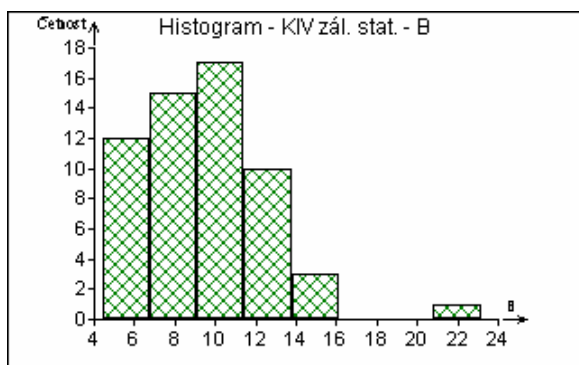
Hodnoty ketoisovalerátu v DBS u novorozenců se pohybovaly v rozmezí $9,57 \pm 3,33 \mu\text{mol/l}$. Podle základní statistiky je pravděpodobný jeden odlehlý bod. Průměr není věrohodný, medián je statisticky významnější ($9,25 \mu\text{mol/l}$). Test normality a homogenity byl zamítnut, což nasvědčuje, že data nejsou homogenní. Jako odlehlý bod byl stanoven bod číslo 16 ($23,1 \mu\text{mol/l}$). Opravený průměr po Box-Coxově transformaci byl $9,05 \mu\text{mol/l}$. Jako optimální rozložení bylo navrženo rozdělení Lognormální (korelační koeficient linearity, $p-p = 0,9912$).



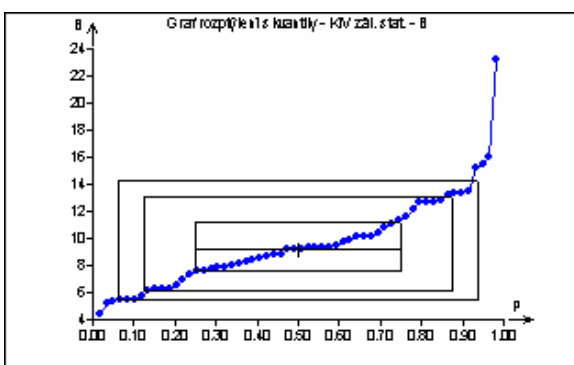
Obr. 26: Kvantilový graf



Obr. 27: Krabicový graf



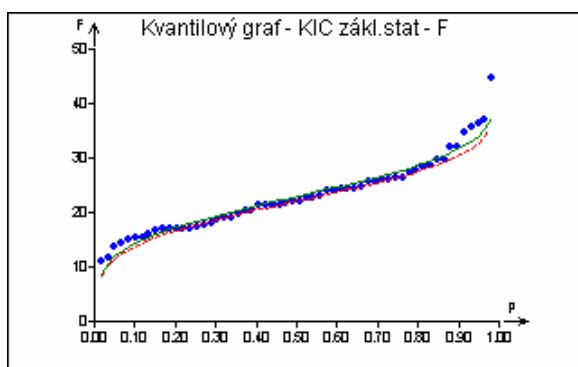
Obr. 28: Histogram



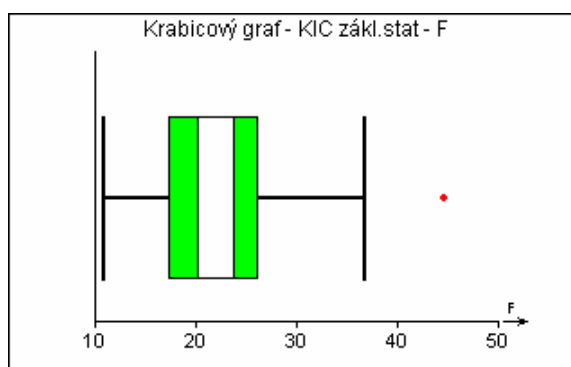
Obr. 29: Graf rozptýlení s kvantily

4.4.2 Hladiny ketoisokaproátu u novorozenců

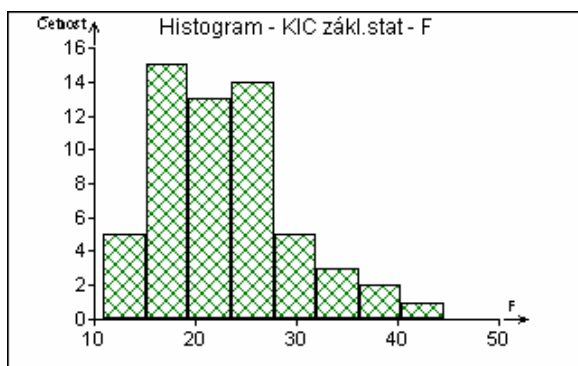
Hodnoty ketoisokaproátu v DBS u novorozenců se pohybovaly v rozmezí $22,92 \pm 6,76 \mu\text{mol/l}$. Průměr není věrohodný, medián je statisticky významnější ($22,08 \mu\text{mol/l}$). Předpoklad normality testovaného souboru byl přijat, předpoklad homogenity přijat. Jako optimální rozdělení bylo navrženo rozdělení Lognormální (korelační koeficient linearity, p-p = 0,9956).



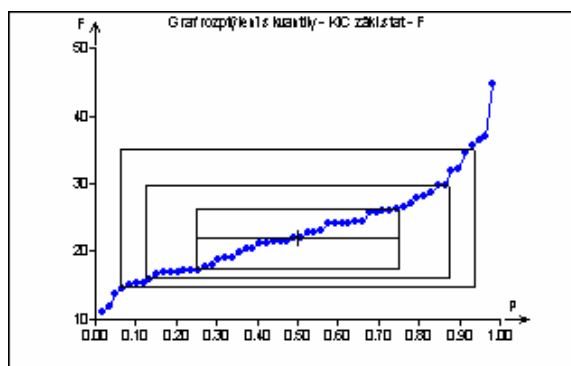
Obr. 30: Kvantilový graf



Obr. 31: Krabicový graf



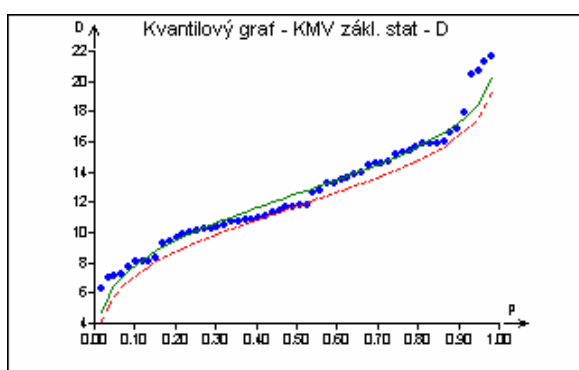
Obr. 32: Histogram



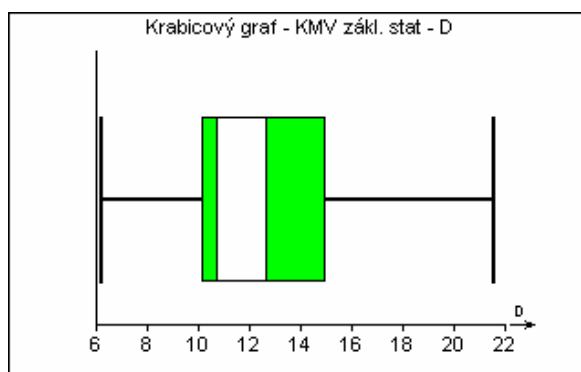
Obr. 33: Graf rozptýlení s kvantily

4.4.3 Hladiny ketomethylvalerátu u novorozenců

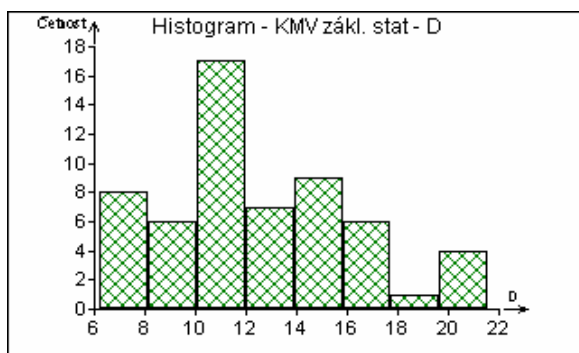
Hodnoty ketomethylvalerátu v DBS u novorozenců se pohybovaly v rozmezí $12,54 \pm 3,68 \mu\text{mol/l}$. Průměr není věrohodný, medián je statisticky významnější ($11,74 \mu\text{mol/l}$). Předpoklad normality testovaného souboru byl přijat, předpoklad homogenity přijat. Jako optimální rozdělení bylo navrženo rozdělení Lognormální (korelační koeficient linearity, p-p = 0,9919).



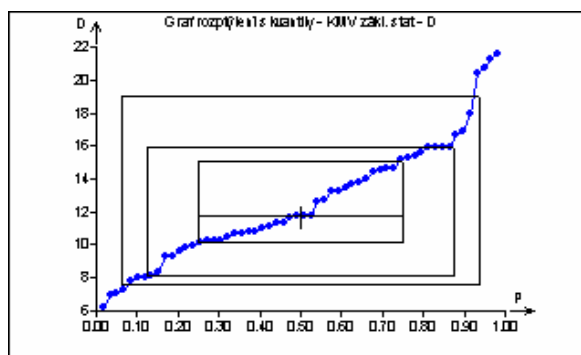
Obr. 34: Kvantilový graf



Obr. 35: Krabicový graf



Obr. 36: Histogram



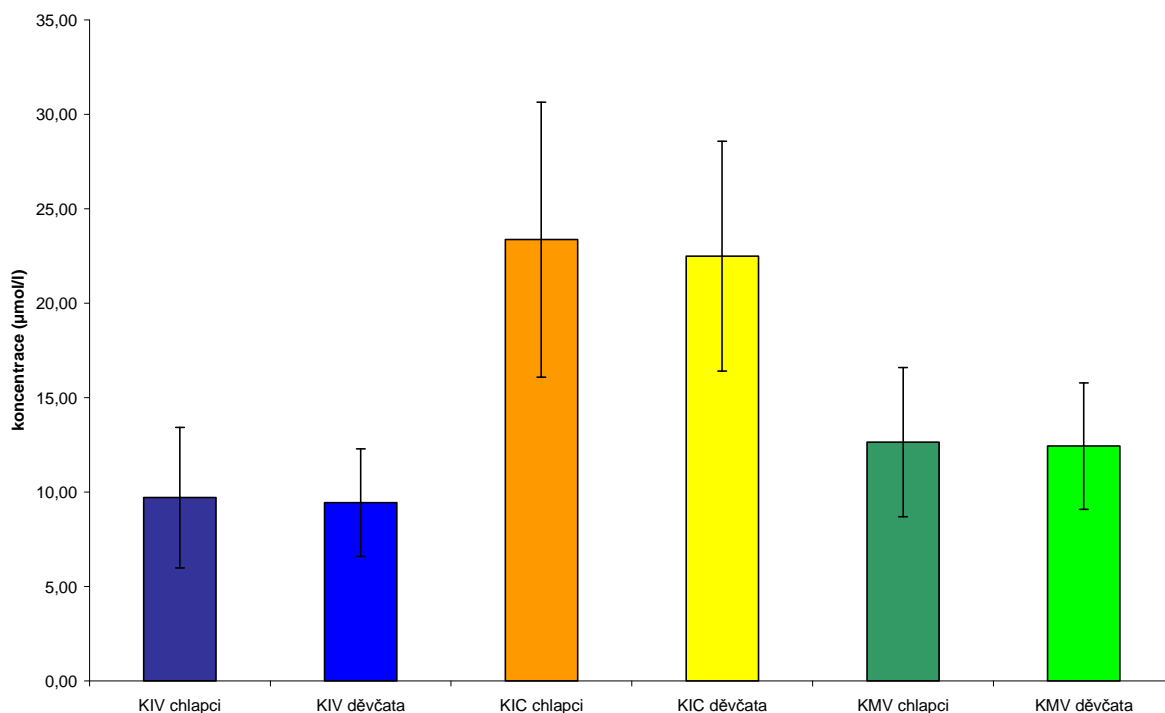
Obr. 37: Graf rozptýlení s kvantily

4.4.4 Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV u novorozenců

Tabulka 11 a obrázek 38 zobrazuje vliv pohlaví na hladinu KIV, KIC, KMV. Hladiny příslušných oxokyselin naměřené u chlapců a děvčat se statisticky významně neliší (test shody: $p_{KIV} = 0,7686$, $p_{KIC} = 0,6264$, $p_{KMV} = 0,8302$).

Tab. 11: Vliv pohlaví na hladinu KIV, KIC, KMV

Analyt	n	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	95% spolehlivost		Medián ($\mu\text{mol/l}$)	
				Spodní mez ($\mu\text{mol/l}$)	Horní mez ($\mu\text{mol/l}$)		
KIV	chlapci	28	9,70	3,78	8,24	11,17	8,99
	děvčata	30	9,44	2,90	8,36	10,52	9,41
KIC	chlapci	28	23,38	7,41	20,50	26,25	21,81
	děvčata	30	22,50	6,19	20,19	24,81	22,43
KMV	chlapci	28	12,65	4,02	11,09	14,21	11,55
	děvčata	30	12,44	3,40	11,17	13,71	12,20



Obr. 38: Vliv pohlaví na hladiny KIV, KIC, KMV u novorozenců

Graf zobrazuje průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami

4.4.5 Korelace mezi hladinami oxokyselin s rozvětveným řetězcem a hladinami aminokyselin s rozvětveným řetězcem v suchých krevních skvrnách

Metodou lineární regresní diagnostiky a korelační analýzou jsme zjišťovali možné korelace mezi hladinami BCKA a BCAA u novorozenců. BCAA byly změřeny pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci s o-ftaldialdehydem [28]. U novorozenců jsme zjistili statisticky významné korelace mezi hladinami BCKA a BCAA.

Tab. 12: *Korelace hladin BCAA oproti BCKA u novorozenců*

	R ² (koeficient determinace)	p (Fisher - Snedecorův test)	Spearmanova korelace	korelace
KIV a Valin	0,1116	0,0104	0,2606	ANO
KIC a Leucin	0,0788	0,0328	0,2046	ANO
KMV a Isoleucin	0,1399	0,0038	0,3559	ANO

5 DISKUZE

Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem jsou meziprodukty vznikající při odbourávání aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Je známo, že pokud se zvýší hladina aminokyselin i oxokyselin s rozvětveným řetězcem, může to vést k mnohým klinickým syndromům. Jedním z nejzávažnějších je nemoc javorového sirupu. MSUD se projevuje u novorozenců, kteří přijmou potravu ve formě mateřského mléka, jež je bohaté na BCAA. Stanovení hladin BCAA se dnes již provádí rutinně na specializovaných pracovištích pomocí MS/MS. V naší studii jsme se však zabývali stanovením hladin BCKA, které by mohly být vhodné jako další diagnostický marker k určení nemoci javorového sirupu.

Ke stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem jsme používali HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci s OPD. Derivatizace byla nutná, jelikož BCKA jsou látky, které přirozeně nefluoreskují. Pro detekci bylo použito excitační záření o vlnové délce 350 nm a bylo detekováno emisní záření o vlnové délce 410 nm. Pro separaci BCKA byla vybrána chromatografická kolona LiChroCart 125-4 Purospher Star RP-18encapped, 5 µm, opatřená ochrannou kolonkou LiChroCart 4-4 Purospher Star RP-18encapped, 5 µm.

Zaměřili jsme se na stanovení uvedených BCKA, i když v chromatografickém záznamu jsou patrné i jiné píky. Jedná se o látky vzniklé derivatizací s OPD (látky obsahující ketoskupinu). Ketoskupinu obsahuje i fenylpyruvát, který jsme se v počátku naší práce snažili stanovit navíc. Jeho separace byla velice obtížná, jelikož se špatně odděloval od KIC a zároveň se choval velice nestandardně. Při ověřování přesnosti se velikost píky nesouměrně zvětšovala a zmenšovala. Z tohoto poznatku jsme vyvodili závěr, že fenylpyruvát se nemůže separovat samostatně, ale je možné, že se v něm separuje i další látka. Tento závěr bychom potvrdili jen tím způsobem, že bychom uvedené vzorky stanovili pomocí hmotnostní spektrometrie. Hyashi a kol. [14] dokonce uvádějí, že při těchto podmínkách nelze fenylpyruvát detekovat.

Naším hlavním problémem bylo najít vhodnou kalibrační techniku, která by odpovídala screeningovému stanovení v suchých krevních skvrnách. Zkoušeli jsme

různé způsoby, kterým udělat vhodnou kalibraci. Nejdříve jsme zkoušeli rozpouštět jednotlivé standardy ve vodě, nakapat je na speciální filtrační papíry, nechat zaschnout a z nich vyrazit stejné terčíky jako při přípravě vzorků. Jednotlivé oxokyseliny se eluovaly ovšem velmi nesouměrně a špatně. Hodnota spolehlivosti linearity (R^2) byla velice špatná. Z tohoto důvodu bylo od tohoto postupu upuštěno. Pokud by byla použita vodná kalibrace jako při stanovení v plazmě, bylo by toto měření nesprávné, hodnoty by byly zavádějící, jelikož by nebyla použita stejná matrice. Worthman M.C. a kol. [27] uvádějí, že při přípravě standardů používali jako matrici červené krvinky proprané ve fyziologickém roztoku. Takto připravené standardy rozpipetovali na speciální filtrační papíry. I když se jednalo o stanovení hormonů, principiálně jsme tuto metodu modifikovali a aplikovali na BCKA, pouze s tím rozdílem, že namísto červených krvinek jsme používali plnou krev. Výsledky takto připravené kalibrace poskytly velmi dobré hodnoty spolehlivosti linearity ($R^2 > 0,99$). Pro screeningové vyšetření jsou plně vyhovující. Další výhodou takto připravených kalibrací na speciální filtrační papíry je, že je lze uchovávat při chladničkové teplotě nebo při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ velmi dlouhou dobu [27]. Tudíž se mohou po užití kdykoliv, kdy by bylo třeba změřit vzorky.

Při fluorescenčním stanovení BCKA v DBS nastal problém v detekovatelnosti jednotlivých derivátů oproti plazmě. Velikost rozdílu jednotlivých signálů byla způsobena zpracováním menšího množství vzorku v DBS a mnohem většího naředění oproti plazmě. Citlivost fluorescenčního detektoru byla proto dvakrát zvýšena.

Pro přípravu vzorku plazmy byla testována 4 deproteinační činidla. V literatuře nejčastěji uváděná deproteinační činidlo s 30% kyselinou sulfosalicylovou [10,13] byla porovnávána s 1 mol/l HClO_4 , 5% kyselinou metafosforečnou a 100% methanolem. Deproteinační činidlo s 5% kyselinou metafosforečnou neproběhla vůbec a se 100% methanolem probíhala velice špatně. U deproteinační činidla s 30% kyselinou sulfosalicylovou se objevoval široký pík obsahující neznámé látky, díky němuž se dlouho ustanovovala základní linie. Jako neoptimálnější deproteinační činidlo byl tudíž zvolen roztok 1 mol/l HClO_4 .

Literární prameny uvádějí, že při přípravě vzorku před HPLC analýzou se zařazuje krok extrakce za účelem odstranění nečistot. Používá se buď extrakce kapalina-kapalina [10,12,13,15] nebo extrakce na pevné fázi [11]. Radeck W. a kol. [11] uvádějí, že SPE vyžaduje minimum času a je velice vhodná. Proto byly otestovány vzorky, které byly aplikovány na kolonky SPE. Námi zjištěné výsledky však ukázaly, že kolonky SPE vykazují velice nízkou a nepřesnou výtěžnost.

Dále byly srovnávány dvě eluční činidla při analýze vzorků z DBS. První postup byl takový, že ještě před odběrem suché krevní skvrny byl na speciální filtrační papír nakapán I.S. a skvrna byla pak eluována přímo deproteinačním činidlem (1 mol/l HClO₄). Eluce tímto způsobem nebyla až natolik vhodná. Mnohem závažnějším problémem toho postupu se ukázala nereprodukovatelná eluce I.S. Proto bylo zvoleno jemnější eluční činidlo (okyselená voda, 1 mmol/l HCl), které obsahovalo I.S. Krok deproteinační následoval až po eluci.

Walser M. a kol. [28] konstatovali, že deriváty oxokyselin jsou stabilní pouze 2-5 hodin. Radeck a kol. [11] nezaznamenali žádnou nestabilitu derivátu v průběhu 6 hodin. My jsme sledovali procentuální stabilitu derivátu I.S. v průběhu 56 hodin. Během této doby se stabilita derivátu I.S. příliš neměnila.

Metoda je vhodná jak pro stanovení BCKA v plazmě při již probíhajícím onemocnění, kdy by se mohla kontrolovat dietní terapie, tak hlavně pro screeningové vyšetření v suchých krevních skvrnách. Screeningová metoda je rychlá a šetrná.

Metody popsané v literatuře udávají hodnoty variačních koeficientů přesnosti v sérii okolo 1-5 % v plazmě [10,11,14]. Správnost definovaná průměrnou výtěžností metody se pohybuje od 85-95% v plazmě [14].

Hladiny KIV v plazmě u dobrovolných dárců krve se pohybovaly v rozmezí $12,94 \pm 2,64$ $\mu\text{mol/l}$ a jsou srovnatelné s HPLC s fluorescenční detekcí získané podobným analytickým postupem ($13,2 \pm 3,2$ $\mu\text{mol/l}$ [10], $14,1 \pm 3,9$ $\mu\text{mol/l}$ [13]). Taktéž hladiny KMV naměřené v plazmě $19,52 \pm 4,47$ $\mu\text{mol/l}$ byly srovnatelné s údaji v literatuře ($22,5 \pm 5,4$ $\mu\text{mol/l}$ [15], $19,1 \pm 4,4$ $\mu\text{mol/l}$ [13]). Hladiny KIC v plazmě u dobrovolných dárců krve $46,06 \pm 10,63$ $\mu\text{mol/l}$ jsou spíše v horní hranici

publikovaných hodnot ($33,9 \pm 9,7 \mu\text{mol/l}$ [13], $35,5 \pm 7,7 \mu\text{mol/l}$ [15]). Hladiny KIV a KIC naměřené u mužů se výrazně neliší od hladin naměřených u žen (KIV u mužů $13,3 \pm 2,7 \mu\text{mol/l}$, u žen $12,59 \pm 2,63 \mu\text{mol/l}$, KIC u mužů $46,53 \pm 9,42 \mu\text{mol/l}$, u žen $45,58 \pm 11,86 \mu\text{mol/l}$). Zajímavý výsledek však přinesla statistická analýza u měřené hladiny KMV, kdy muži mají mírně vyšší hodnotu KMV (KMV muži $20,76 \pm 4,18 \mu\text{mol/l}$, ženy $18,27 \pm 4,46 \mu\text{mol/l}$). Hodnoty všech tří BCKA jsou srovnatelné v různých věkových skupinách. Korelací hladin BCKA a BCAA jsme zjistili statisticky významné korelace mezi hladinou KIC oproti leucinu a KMV oproti isoleucinu. Mezi hladinami KIV oproti valinu jsme však statisticky významnou korelaci nezjistili.

Určili jsme orientační hodnoty u novorozenců, kde hladina KIV byla $9,57 \pm 3,33 \mu\text{mol/l}$, KIC $22,92 \pm 6,76 \mu\text{mol/l}$ a KMV $12,54 \pm 3,68 \mu\text{mol/l}$. Hladiny BCKA naměřené u chlapců a děvčat se statisticky významně nelišily. Hladiny BCKA a BCAA u novorozenců jsme též podrobily statistické korelaci. U novorozenců byly zjištěny statisticky významné korelace u všech tří oxokyselin a aminokyselin, stejně jako uvádí Langenbeck a kol. [30].

6 ZÁVĚR

Cílem této metody bylo vypracovat vhodnou metodiku pro stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem a stanovit orientační hodnoty oxokyselin u dobrovolných dárců krve.

Popsaná metoda je vhodná jak pro stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem v plazmě, tak především pro stanovení v suchých krevních skvrnách. Reprodukovatelnost jednotlivých analýz i výtěžnost této metody je poměrně dobrá.

U novorozenců nebyla zaznamenána žádná vazba mezi hladinou oxokyselin a pohlavím.

U dobrovolných dárců krve výsledky ukazují, že hladiny ketoisovalerátu a ketoisokaproátu se u mužů a žen významně neliší. Pouze hladiny ketomethylvalerátu u mužů jsou statisticky významně vyšší.

Stanovení oxokyselin s rozvětveným řetězcem v suchých krevních skvrnách by mohlo být vhodné jako další doplňující screeningové vyšetření při diagnostice nemoci javorového sirupu.

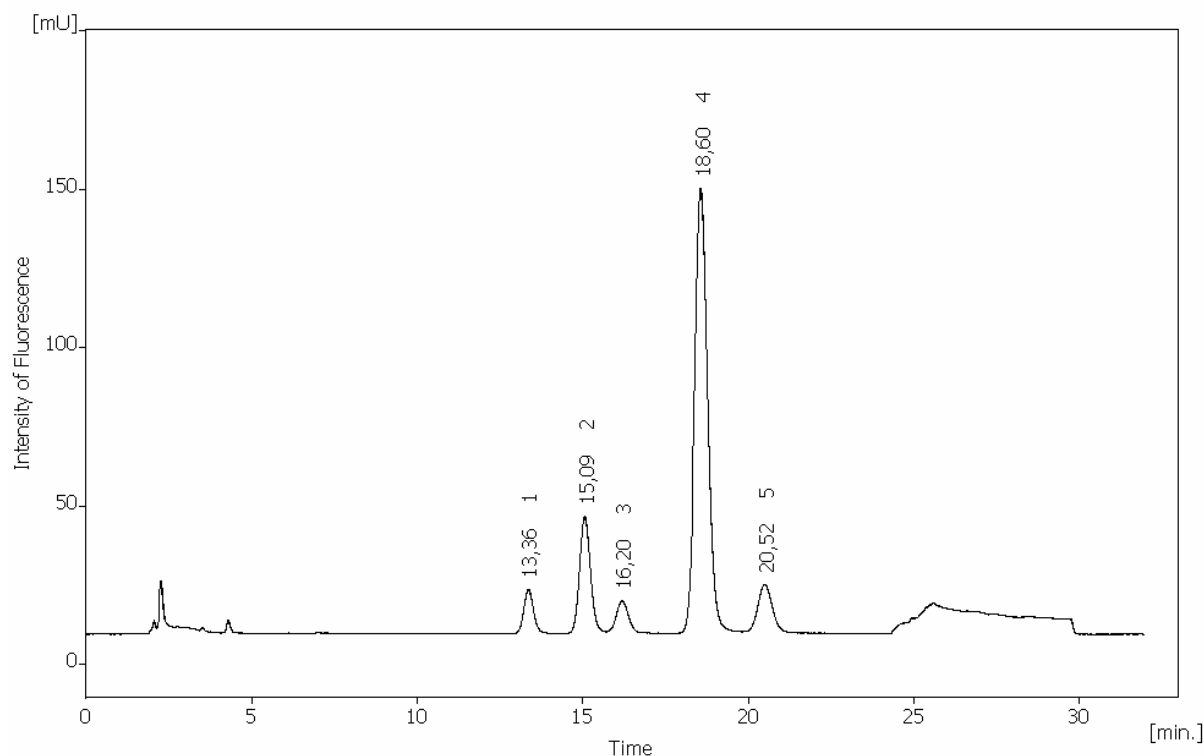
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. KARLSON P., GEROK W., CROSS W.: Pathobiochemie. *Academia*, Praha, 1987, 102-105
2. MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W.: Harperova biochemie. *Nakladatelství H & H*, 4, 2002, 335
3. MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W.: Harperova biochemie. *Nakladatelství H & H*, 4, 2002, 337-339
4. HEMMING B.C., GUBLER C.J.: High-pressure liquid chromatography of α -keto acid 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Anal Biochem*, 92, 1979, 31-40
5. HOFFMANN G.F., NYHAN W.L., ZSCHOCKE J., KAHLER S.G., MAYATEPEK E.: Dědičné metabolické poruchy. *Grada publishing*, Praha, 2006, 112
6. NAKAHARA T., ISHIDA J., YAMAGUCHI M., NAKAMURA M.: Determination of α -keto acids including phenylpyruvic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Anal biochem*, 190, 1990, 309-313
7. PODEBRAD F., HEIL M., GEIER B., BECK T., MOSANDL A.: Analytical approach in diagnosis of inherited metabolic diseases: Maple syrup urine disease (MSUD) - simultaneous analysis of metabolites in urine by enantioselective multidimensional capillary gas chromatography-mass spectrometry (enantio-MDGC-MS). *J High Resol Chromatography*, 20, 1997, 355-362
8. CREE T.C., HUTSON S.M., HARPER A.E.: Gas-liquid chromatography of α -keto acids: Quantification of the branched-chain α -keto acids from physiological sources. *Anal biochem*, 92, 1979, 156-163
9. SCHWARZ H.P., KARL I.E., BIER D.M.: The α -keto acids of branched chain amino acids: Simplified derivatization for physiological samples and complete separation as quinoxalinols by packed column gas chromatography. *Anal biochem*, 108, 1980, 360-366
10. QUERESHI G.A.: High performance liquid chromatographic methods with fluorescence detection for the determination of branched-chain amino acids

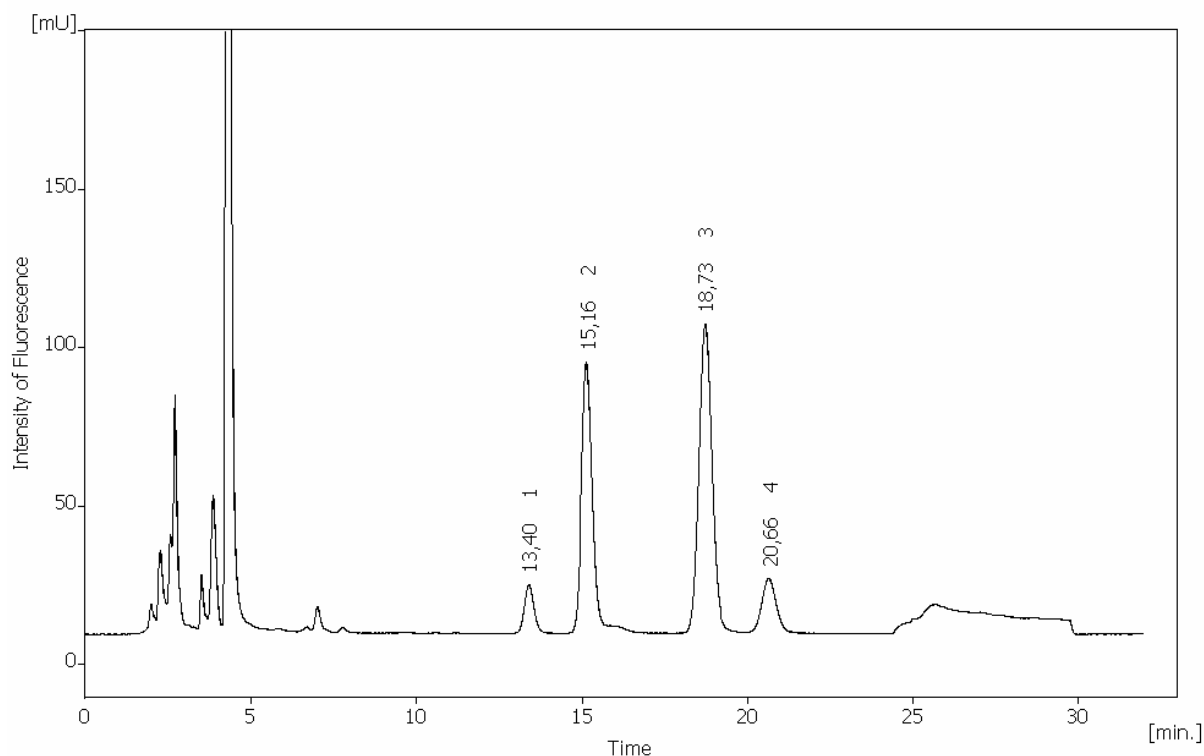
- and their alpha-keto analogues in plasma samples of healthy subjects and ureamic patients. *J Chromatogr*, 400, 1987, 91-99
11. RADECK W., BECK K., STAIB W.: Simple method for rapid quantification of branched-chain 2-oxo acids in physiological fluids as quinoxalinol derivatives by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 432, 1988, 297-301
 12. RIEDEL E., HAMPL H., NÜNDEL M., FARSHIDFAR G.: Essential branched-chain amino acids and α -ketoanalogues in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 4, 1992, 117-120
 13. PAILLA K., BLONDE-CYNOBER F., AUSSEL C., DE BANDT J.P., CYNOBER L.: Branched-chain keto-acids and pyruvate in blood: Measurement by HPLC with fluorimetric detection and changes in older subjects. *Clin Chem*, 46:6, 2000, 848-853
 14. HYASHI T., TSUCHIYA H., NARUSE H.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in plasma with fluorimetric detection. *J Chromatogr*, 273, 1983, 245-252
 15. KOIKE K., KOIKE M.: Fluorescent analysis of α -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 141, 1984, 481-487
 16. NISSEN S.L., VAN HUYSEN C., HAYMOND M.W.: Measurement of branched chain amino acids and branched chain α -ketoacids in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 232, 1982, 170-175
 17. HYASHI T., TODORIKI H., NARUSE H.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids. *J Chromatogr*, 224, 1981, 197-204
 18. HYASHI T., TODORIKI H., NARUSE H., TSUCHIYA H.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in human urine and plasma. *Anal Biochem*, 122, 1982, 173-179
 19. HARA S., TAKEMORI Y., YAMAGUCHI M., NAKAMURA M.: Determination of α -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*, 344, 1985, 33-39
 20. WANG Z.J., ZAITSU K., OHKURA Y.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in human serum and urine

- using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a precolumn fluorescence derivatization reagent. *J Chromatogr*, 430, 1988, 223-331
21. Návod společnosti Schleicher a Schuell- BioScience: Neonatal screening- Blood Specimen Collection and Handling Procedure.
22. Návod společnosti Schleicher a Schuell- BioScience: Simple spot check- Valid and invalid specimens.
23. CHRASTINA P., ŠTASTNÁ S., MYŠKOVÁ H., KOŠAŘOVÁ M., ELLDER M., ZEMAN J.: Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch metodou tandemové hmotnostní spektrometrie. *Klin Biochem Metab*, 13 (34); 2005; 77-80.
24. HARPER A.E., MILLER R.H., BLOCK K.P.: Branched-chain amino acids metabolism. *Ann Rev Nutr*, 4, 1984, 409-54
25. TAJIMA G., YOFUNE H., BAHAGIA FEBRIANI A.D., NISHIMURA Y., ONO H., SAKURA N.: A simple and rapid enzymatic assay for the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex using high-performance liquid chromatography. *J Inherit Metab Dis*, 27, 2004, 633-639
26. HAYASHI T., SUGIURA T., TERADA H., KAWAI S., OHNO T.: High-speed liquid chromatographic determination of phenylpyruvic acid, *J Chromatogr*, 118, 1976, 403-408
27. WORTHMAN C.M., STALLINGS J.F.: Hormone measures in finger-prick blood spot samples: New field methods for reproductive endocrinology. *Am J Phys Anthropol*, 104, 1997, 1-21
28. WALSER M., SWAIN L.M., ALEXANDER V.: Measurement of branched-chain ketoacids in plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 164, 1987, 287-291
29. SLADKÁ M.: Stanovení aminokyselin s rozvětveným řetězcem pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. *Diplomová práce*, Univerzita Pardubice, 2008
30. LANGENBECK U., WENDEL U., MENCH-HOINOWSKI A., KUSCHEL D., BECKER K., PRZYREMBEL H., BREMER H.J.: Correlations between branched-chain amino acids and branched-chain alpha-keto acids in blood in maple syrup urine disease. *Clin Chim Acta*, 88, 1978, 283-291
31. Obrázky nakreslené v programu ChemWindow3

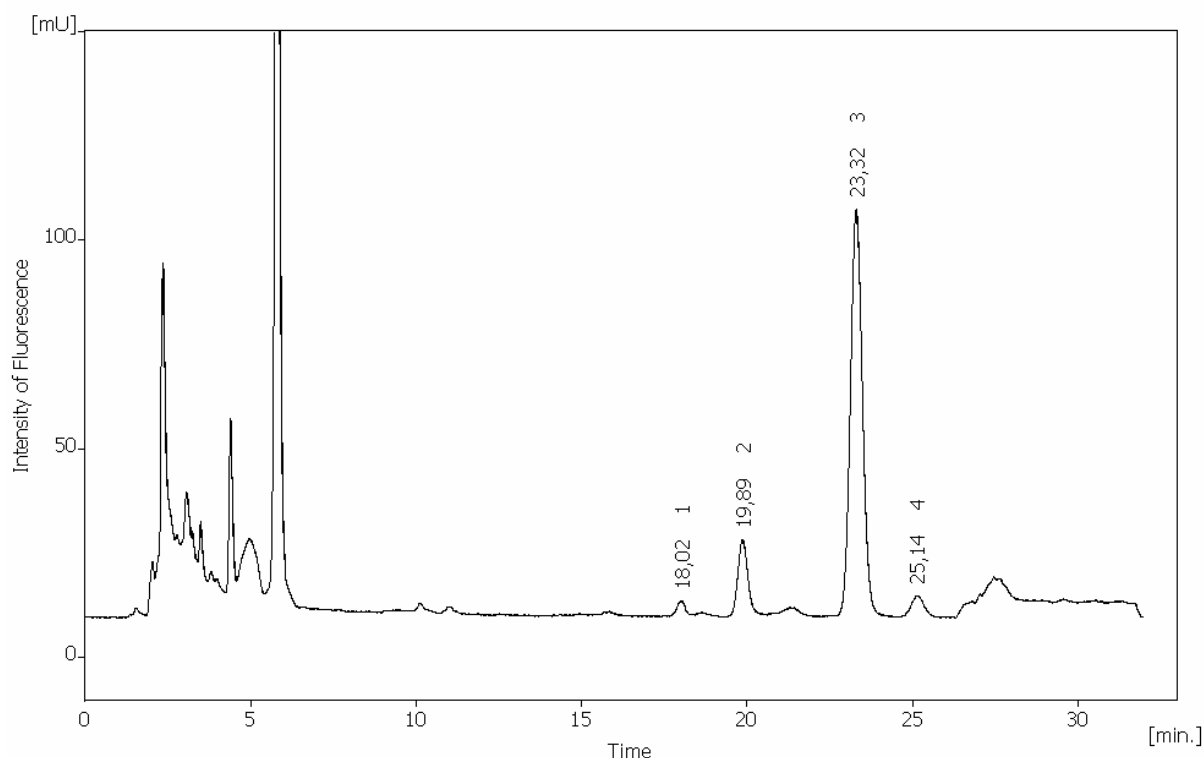
PŘÍLOHY



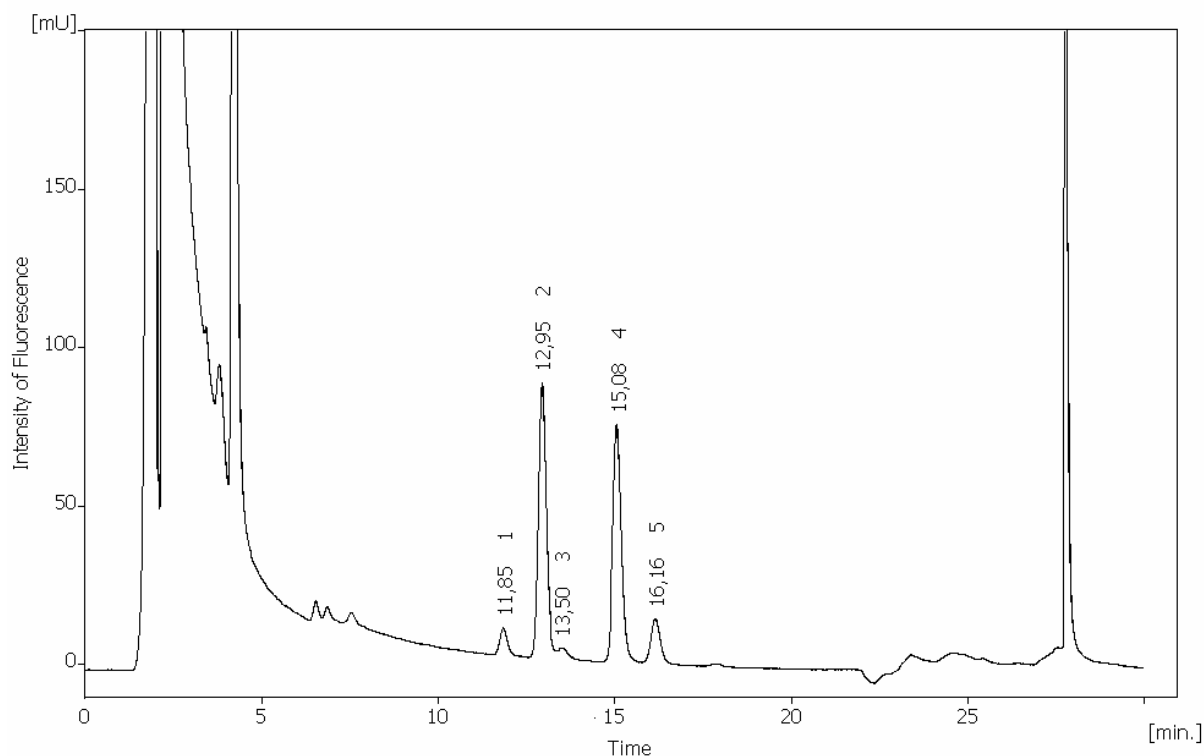
Příloha 1: Chromatografický záznam standardu S4 pro stanovení v plazmě. Pík ve 13,36 min odpovídá KIV (10,15 $\mu\text{mol/l}$), pík v 15,09 min odpovídá KIC (10,10 $\mu\text{mol/l}$), pík v 16,20 min odpovídá směsi látek včetně fenylypyruvátu, pík v 18,60 min odpovídá I.S. (23,80 $\mu\text{mol/l}$) a pík v 20,52 min odpovídá KMV (10,14 $\mu\text{mol/l}$). HPLC podmínky: M.F. A: 55% methanol, M.F. B: 100% methanol, gradientová eluce, 0-22 min 5% B, 22-27 min 100% B, 27-30 min 5% B, průtok M.F. byl 0,5 ml/min při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$, detekce fluorimetrická ($\lambda_{\text{excitační}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 410 \text{ nm}$, sens 2, gain 3), nástřik 20 μl vzorku.



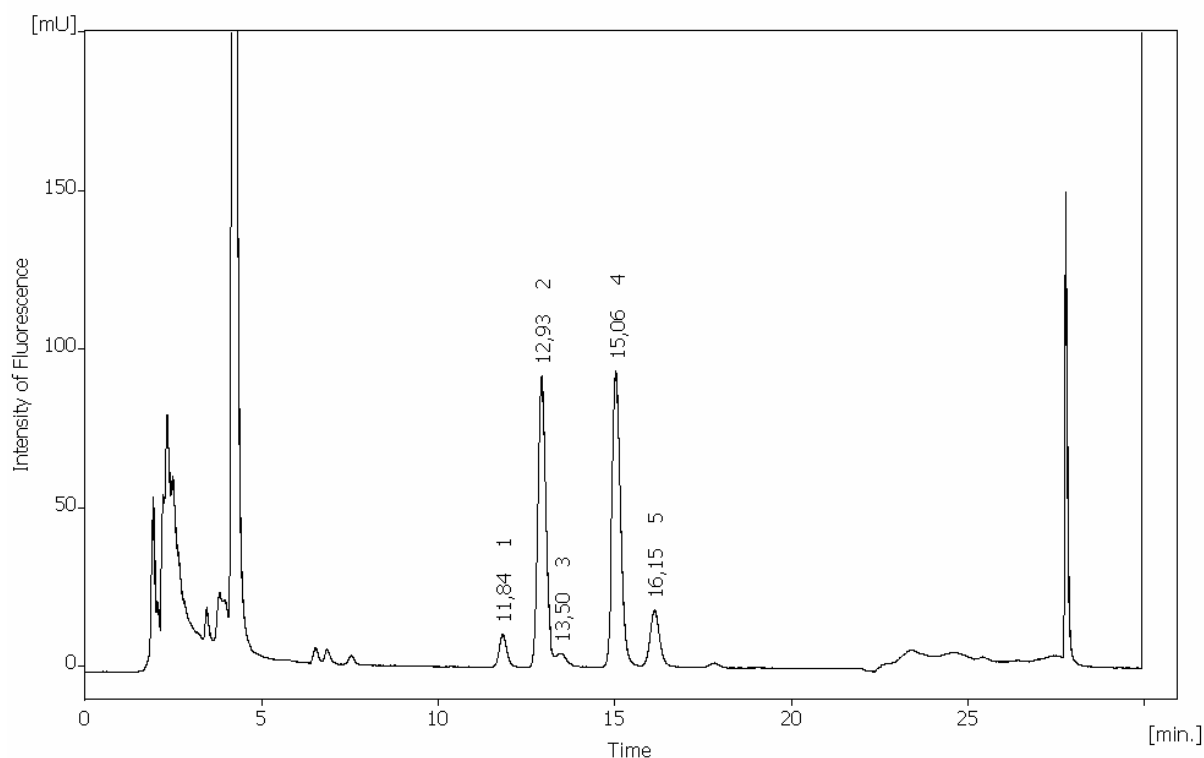
Příloha 2: Chromatografický záznam dárce plazmy č. 22., 13,40 min KIV (14,75 $\mu\text{mol/l}$), 15,16 min KIC (34,64 $\mu\text{mol/l}$), 18,73 min I.S. (23,80 $\mu\text{mol/l}$), 20,66 min KMV (15,37 $\mu\text{mol/l}$). HPLC podmínky stejné jako Příloha 1.



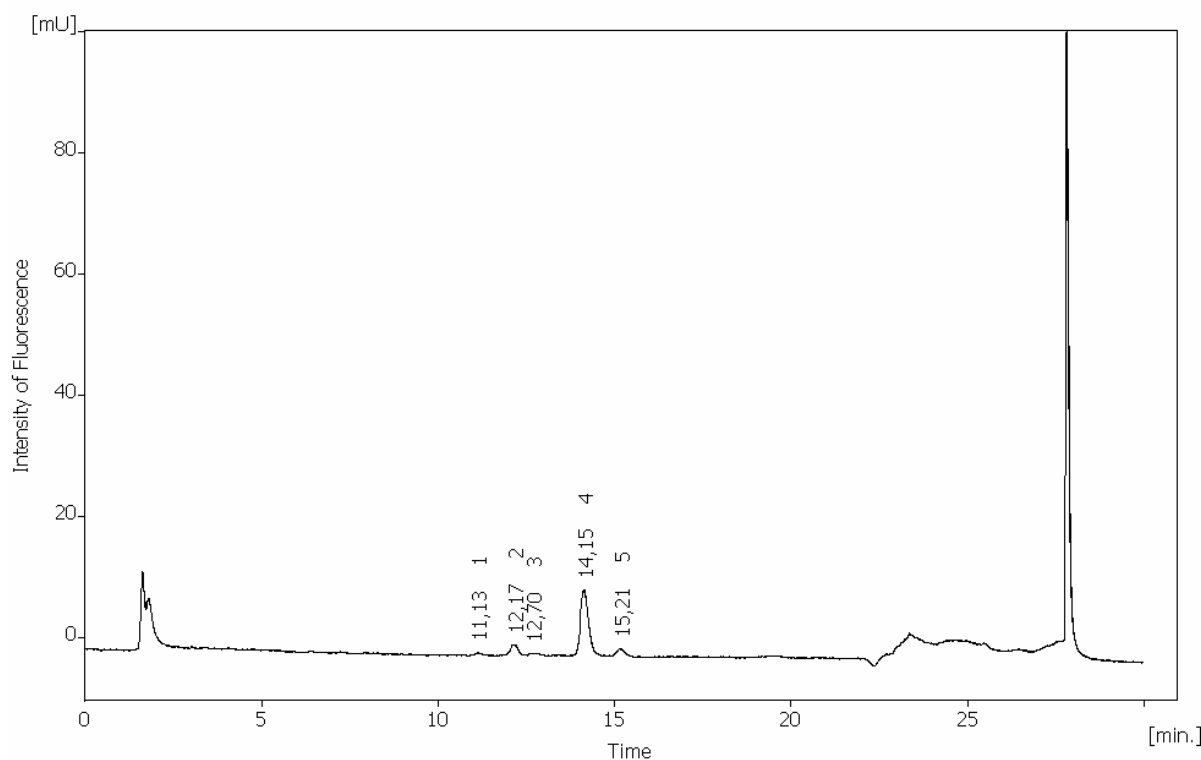
Příloha 3: Chromatografický záznam DBS u novorozence č. 27., 18,02 min KIV (11,33 $\mu\text{mol/l}$), 19,89 min KIC (24,18 $\mu\text{mol/l}$), 23,32 min I.S. (50 $\mu\text{mol/l}$), 25,14 min KMV (14,58 $\mu\text{mol/l}$). HPLC podmínky: M.F. A: 50% methanol, M.F. B: 100% methanol, gradientová eluce, 15-24 min 20% B, 24-29 min 100% B, průtok M.F. byl 0,5 ml/min při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$, detekce fluorimetrická ($\lambda_{\text{excitační}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 410 \text{ nm}$, sens 1, gain 1), nástřik 40 μl vzorku.



Příloha 4: Chromatografický záznam vzorku plazmy po deproteinaci s 30% kyselinou sulfosalicylovou, 11,85 min KIV, 12,95 min KIC, 13,50 min směs látek včetně fenylpyruvátu, 15,08 min I.S., 16,16 min KMV. HPLC podmínky: M.F. A: 60% methanol, M.F. B: 100% methanol, isokratický mód, průtok M.F. byl 0,5 ml/min při teplotě 30 °C, detekce fluorimetrická ($\lambda_{\text{excitační}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 410 \text{ nm}$, sens 2, gain 3), nástřik 20 μl vzorku.



Příloha 5: Chromatografický záznam vzorku plazmy po deproteinaci s 1 mol/l HClO₄, 11,84 min KIV, 12,93 min KIC, 15,06 min I.S., 16,15 min KMV. HPLC podmínky stejné jako Příloha 4.



Příloha 6: Chromatografický záznam vzorku plazmy po aplikaci SPE, 11,13 min KIV, 12,17 min KIC, 12,70 min směs látek včetně fenylpyruvátu, 14,15 min I.S., 15,21 min KMV. HPLC podmínky: HPLC podmínky: M.F. A: 60% methanol, M.F. B: 100% methanol, gradientová eluce, 20 min 25% B, 20,01-25 min 100% B, průtok M.F. byl 0,5 ml/min při teplotě 30 °C, detekce fluorimetrická ($\lambda_{\text{excitační}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 410 \text{ nm}$, sens 2, gain 3), nástřik 20 μl vzorku.