

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko–technologická

Stanovení vybraných oxokyselin v suché kapce krve metodou vysokoúčinné
kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Bc. Irena Tůmová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Irena Tůmová**
Osobní číslo: **C16466**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení vybraných oxokyselin v suché kapce krve metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Možnosti stanovení oxokyselin v biologických vzorcích

Derivatizace v kapalinové chromatografii, především pro účely fluorescenční detekce

Experimentální část:

Technika suché kapky krve

Stanovení vybraných oxokyselin metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Testování vhodných derivatizačních činidel pro stanovení oxokyselin metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Optimalizace separace vybraných oxokyselin kapalinovou chromatografií

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Původní práce v recenzovaných časopisech

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Lenka Andrllová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

18. prosince 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/200 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2018

Irena Tůmová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za odborné rady při psaní této práce, ochotu, trpělivost a také za čas, který mi věnoval v průběhu experimentu. Zároveň chci poděkovat konzultantce své diplomové práce Mgr. Lence Andřlové za její rady během práce v laboratoři.

Dále bych chtěla poděkovat všem dobrovolným dárčům krve z Katedry biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice.

Také bych touto cestou velice ráda poděkovala své rodině a všem blízkým, kteří mě podporovali během studia.

ANOTACE

Stanovení aminokyselin a od nich odvozených 2-oxokyselin má klíčovou úlohu v diagnostice vrozených metabolických poruch u dětí v rámci novorozeneckého screeningu. V biochemické laboratoři s klasickým vybavením se pro stanovení 2-oxokyselin využívá jako „zlatý standard“ metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, při které se 2-oxokyseliny derivatizují *ortho*-fenylendiaminem. Jedná se o poměrně citlivou metodu, avšak *ortho*-fenylendiamin je vysoce karcinogenní látka.

Tato práce se zabývá stanovením vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve metodou HPLC s fluorescenční detekcí, s cílem nahradit *ortho*-fenylendiamin za jiné nekarcinogenní derivatizační činidlo a zachovat, či zvýšit citlivost dané metody. Pro derivatizaci vybraných 2-oxokyselin byly zvoleny tři derivatizační činidla, 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen, 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzen a dansylhydrazin. Při použití dansylhydrazinu je nevýhodou to, že tato látka fluoreskuje stejně jako deriváty 2-oxokyselin. U metody využívající 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzen jako derivatizační činidlo se nám nepodařilo ve vzorku suché kapky krve dostatečně separovat deriváty vybraných 2-oxokyselin.

Byla zavedena metoda HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorcích suché kapky krve. Jako derivatizační činidlo byl použit 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen, přičemž vzniklé deriváty mnohem silněji fluoreskovaly v porovnání s metodou využívající pro derivatizaci 2-oxokyselin *ortho*-fenylendiamin. Deriváty 2-oxokyselin byly separovány v systému obrácených fází (analytická kolona LiChroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm, opatřená ochranou kolonou LiChroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm) gradientovou elucí. Mobilní fáze A byla směs acetonitrilu a deionizované vody (25:75; v/v) a mobilní fáze B byl 100% acetonitril. Přesnost v sérii pro stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorcích suché kapky krve byla vyhovující, variační koeficienty se pohybovaly pod 5 %. Kalibrační křivky byly lineární v rozsahu testovaných koncentrací, s výjimkou 2-oxobutyrátu, kde byl průběh z nejasných důvodů kvadratický. Orientační hladiny vybraných 2-oxokyselin u 14 dobrovolných dárců jsou porovnatelné s literárními údaji. Fenylpyruvát byl detegován jen u některých dárců krve.

Klíčová slova

2-Oxokyseliny, suchá krevní kapka, derivatizace, HPLC, fluorescenční detekce

ANNOTATION

The determination of amino acids and keto acids play a key role in the diagnosis of congenital metabolic diseases, which is part of the new-born screening. The HPLC method with fluorescence detection is „golden standard“, which is used for a determination of keto acids in biochemical laboratories with a basic equipment. The HPLC method uses *ortho*-phenylenediamine for the derivatization of keto acids. It is relatively sensitive method, but *ortho*-phenylenediamine is a highly carcinogenic substance.

This thesis deals with the determination of keto acids in dried blood spots by an HPLC with fluorescence detection and replacing *ortho*-phenylenediamine with another non-carcinogenic derivatizing agent to maintain or increase the sensitivity of the method. Three derivatizing agents were chosen for a derivatization of keto acids, 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene and dansylhydrazine. The major disadvantage of dansylhydrazine is that it emits fluorescence as much as derivatives of keto acids. We didn't succeed in a sufficient separation of keto acids in dried blood spots after the derivatization with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene. The HPLC method with fluorescence detection of keto acids in dried blood spots was established. 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene was used as the derivatizing agent. The derivatives of keto acids emit fluorescence much more than the derivatives after the derivatization with *ortho*-phenylenediamine. The derivatives of keto acids were separated by reversed-phase HPLC with gradient elution (an analytical column LiChroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm, connected with guard column LiChroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm). The mobile phase A was a mixture of acetonitrile and deionized water (25:75; v/v) and mobile phase B was 100% acetonitrile. The intra-assay precision of presented HPLC method was satisfactory, the coefficients of variation were under 5 %. The calibration curves were linear over the tested range for keto acids except 2-ketobutyrate, calibration curve was quadratic, the reason is unclear. The orientation levels of selected keto acid in dried blood spots obtained from 14 volunteers are comparable to literature data. We detected phenyl pyruvate only in some blood donors.

Keywords

Keto acids, dried blood spot, derivatization, HPLC, fluorescence detection

OBSAH

0	ÚVOD.....	14
1	TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1	Charakteristika vybraných 2-oxokyselin.....	15
1.1.1	Pyruvát.....	15
1.1.2	Oxalacetát.....	17
1.1.3	2-Oxoglutarát.....	18
1.1.4	Fenylpyruvát.....	18
1.1.5	4-Hydroxyfenylpyruvát.....	20
1.1.6	2-Oxobutyrate.....	20
1.1.7	2-Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem.....	21
2	VYBRANÉ METABOLICKÉ PORUCHY.....	25
2.1	Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu.....	25
2.2	Laktátová acidóza.....	26
2.3	Nemoc javorového sirupu.....	27
2.4	Fenylketonurie.....	29
2.5	Deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu.....	30
2.6	Isovalerová acidemie.....	30
2.7	Hypervalinemie a hyperleucinemie-isoleucinemie.....	31
3	METODY STANOVENÍ 2-OXOKYSELIN.....	32
3.1	Papírová chromatografie.....	32
3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	33
3.2.1	Derivatizace u HPLC metod.....	34
3.2.1.1	Předkolonová derivatizace.....	34
3.2.1.2	Postkolonová derivatizace.....	34
3.2.1.3	Derivatizační činidla používaná při stanovení 2-oxokyselin metodou HPLC.....	35
3.2.1.4	ortho-Fenylendiamin.....	38
3.2.1.5	1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzen.....	38
3.2.1.6	1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzen.....	39
3.3	Plynová chromatografie.....	41
3.4	Elektroforetické stanovení 2-oxokyselin.....	41
3.5	Stanovení aminokyselin.....	42
3.6	Referenční hodnoty vybraných aminokyselin a od nich odvozených 2-oxokyselin.....	44

4	CÍL PRÁCE	45
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
5.1	Materiál	46
5.1.1	Biologický vzorek	46
5.1.1.1	Plná krev	46
5.1.1.2	Suchá krevní skvrna	46
5.1.2	Chemikálie	46
5.1.3	Pomůcky a přístroje	48
5.1.4	Pracovní roztoky	49
5.2	Příprava vzorku suché kapky krve	59
5.3	Příprava směšného standardu 2-oxokyselin v plné krvi	59
5.4	Příprava směšného standardu aminokyselin v plné krvi	60
5.5	Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci <i>ortho</i> -fenyldiaminem	61
5.5.1	Derivatizace jednotlivých standardů 2-oxokyselin a 2-oxokyselin ve směšném standardu	61
5.5.2	Optimalizace množství derivatizačního činidla	61
5.5.3	Lyofilizace roztoku směšného standardu 2-oxokyselin v 1mmol/l kyselině chlorovodíkové	62
5.5.4	Výběr vhodného činidla pro extrakci 2-oxokyselin ze suché kapky krve	62
5.5.5	Chromatografické podmínky	62
5.6	Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem	63
5.6.1	Postup derivatizace směšného standardu 2-oxokyselin a jednotlivých standardů 2-oxokyselin	63
5.6.2	Optimalizace množství derivatizačního činidla	63
5.6.3	Optimalizace podmínek inkubace při derivatizaci 2-oxokyselin 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem (teplota a čas)	64
5.6.4	Stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem	64
5.6.5	Chromatografické podmínky	64
5.7	Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-metyldioxybenzenem	65
5.8	Stanovení vybraných aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	65
5.8.1	Derivatizace aminokyselin ve směšném standardu	65

5.8.2	Stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce krve	65
5.8.3	Chromatografické podmínky	66
5.9	Analytické parametry metody	66
5.9.1	Linearita kalibrační křivky.....	66
5.9.2	Přesnost analytické metody	67
5.10	Zpracování výsledků	67
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	68
6.1	Příprava kalibračních standardů pro účely stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve	68
6.2	Stanovení 2-oxokyselin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí po derivatizaci <i>ortho</i> -fenylendiaminem.....	69
6.2.1	Výběr vhodného extrakčního činidla a způsob extrakce 2-oxokyselin z terčíku suché kapky krve	69
6.2.2	Optimalizace separace derivátů 2-oxokyselin	70
6.2.3	Analytické parametry metody.....	71
6.3	Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem	72
6.3.1	Optimalizace derivatizačního kroku	72
6.3.2	Stabilita derivátů 2-oxokyselin po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem.....	76
6.3.3	Analytické parametry metody.....	76
6.4	Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenem	78
6.5	Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci dansylhydrazinem	79
6.6	Určení orientačních hladin vybraných 2-oxokyselin v krvi dobrovolných dárců, korelace těchto hladin s hladinami odpovídajících aminokyselin.....	79
7	ZÁVĚR.....	81
8	SEZNAM LITERATURY.....	82
9	PŘÍLOHY	91

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorec pyruvátu	15
Obrázek 2	Vznik pyruvátu z fosfoenolpyruvátu v posledním kroku glykolýzy	16
Obrázek 3	Anaerobní glykolýza (redukce pyruvátu na laktát)	17
Obrázek 4	Strukturní vzorec oxalacetátu.....	17
Obrázek 5	Reakce oxalacetátu s acetyl-CoA za vzniku citrátu.....	17
Obrázek 6	Strukturní vzorec 2-oxoglutarátu	18
Obrázek 7	Strukturní vzorec fenylpyruvátu	19
Obrázek 8	Metabolismus fenylalaninu	19
Obrázek 9	Strukturní vzorec 4-hydroxyfenylpyruvátu	20
Obrázek 10	Strukturní vzorec 2-oxobutyrátu.....	21
Obrázek 11	Strukturní vzorce 2-oxoisovalerátu (KIV), 2-oxoisokapronátu (KIC) a 2-oxo-3-methylvalerátu (KMV)	21
Obrázek 12	Katabolismus valinu, leucinu a isoleucinu I	23
Obrázek 13	Katabolismus valinu, leucinu a isoleucinu II.	24
Obrázek 14	Multienzymový komplex dehydrogenasy větvených aminokyselin	27
Obrázek 15	Reakce 2,4-dinitrofenylhydrazinu s 2-oxokyselinou.....	32
Obrázek 16	Reakce ortho-fenylendiaminu (OPD) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu	38
Obrázek 17	Reakce 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenu (DDB) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu	39
Obrázek 18	Reakce 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenu (DMB) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu	40
Obrázek 19	Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 40 °C.....	74
Obrázek 20	Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 70 °C	74
Obrázek 21	Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 100 °C	75
Obrázek 22	Kalibrační křivka pro stanovení 2-oxobutyrátu ve vzorcích suché kapky krve....	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Doporučené denní příjmy aminokyselin s rozvětveným řetězcem a proteinů.....	29
-----------	---	----

Tabulka 2 <i>Přehled derivatizačních činidel pro HPLC I</i>	36
Tabulka 3 <i>Přehled derivatizačních činidel pro HPLC II</i>	37
Tabulka 4 <i>Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plné krvi</i>	44
Tabulka 5 <i>Referenční hodnoty vybraných aminokyselin v plné krvi</i>	44
Tabulka 6 <i>Koncentrace jednotlivých 2-oxokyselin ve směsných standardech</i>	59
Tabulka 7 <i>Příprava směsných standardů pro sestrojení kalibrační křivky</i>	60
Tabulka 8 <i>Koncentrace jednotlivých aminokyselin ve směsných standardech</i>	60
Tabulka 9 <i>Příprava směsných standardů pro sestrojení kalibrační křivky</i>	61
Tabulka 10 <i>Průměrné plochy píků derivátů 2-oxokyselin po extrakci testovanými činidly</i>	70
Tabulka 11 <i>Parametry kalibračních křivek pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci ortho-fenylendiaminem</i>	71
Tabulka 12 <i>Přesnost metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci ortho-fenylendiaminem pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve</i>	72
Tabulka 13 <i>Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 40 °C</i>	73
Tabulka 14 <i>Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 70 °C</i>	73
Tabulka 15 <i>Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 100 °C</i>	73
Tabulka 16 <i>Optimalizace množství derivatizačního činidla v reakční směsi</i>	75
Tabulka 17 <i>Stabilita derivátů 2-oxokyselin po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při laboratorní teplotě</i>	76
Tabulka 18 <i>Parametry kalibračních křivek pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem</i>	77
Tabulka 19 <i>Přesnost metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve</i>	78
Tabulka 20 <i>Orientační hladiny vybraných 2-oxokyselin a aminokyselin v krvi (vzorky suché kapky krve) 14 dobrovolných dárců</i>	80
Tabulka 21 <i>Závislost hladin aminokyselin na hladinách odpovídajících 2-oxokyselin</i>	80

SEZNAM ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
AVG	Průměrná hodnota
BCAA	Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (z angl. branched-chain amino acids)
BCAT	Aminotferasa rozvětvených aminokyselin (z angl. branched-chain amino acid aminotferase)
CV	Variační koeficient
DBS	Suchá kapka krve (z angl. dried blood spot)
DDB	4,5-Dimethoxy-1,2-diaminobenzen
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzen
DNPH	2,4-Dinitrofenylhydrazin
DNSH	Dansylhydrazin
FAD	Flavinadenindinukleotid
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-performance liquid chromatography)
4-OH-PPYR	4-Hydroxyfenylpyruvát
2-KG	2-Oxoglutarát
2-KH	2-Oxohexanová kyselina
KIC	2-Oxoisokapronát
KIV	2-Oxoisovalerát
KMV	2-Oxo-3-methylvalerát
MSUD	Nemoc javorového sirupu (z angl. maple syrup urine disease)
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaná forma
2-OB	2-Oxobutyát
OPD	<i>ortho</i> -Fenylendiamin
PPYR	Fenylpyruvát
PYR	Pyruvát
SD	Směrodatná odchylka
TPP	Thiaminpyrofosfát

0 ÚVOD

Vrozené metabolické poruchy jsou různorodá skupina vzácných onemocnění, která vedou k předčasné smrti novorozenců, nebo je jejich život doprovázen speciální dietou. Z tohoto důvodu se klade důraz na novorozenecký screening. V České republice spadá pod toto vyšetření 18 onemocnění postihující jak metabolismus aminokyselin, tak sacharidů nebo lipidů.

2-Oxokyseliny vznikají jako meziprodukty odbourávání výše zmíněných látek. V této práci jsme se zaměřili na stanovení 2-oxokyselin odvozených od aminokyselin. Příkladem vrozených poruch související s poruchou metabolismu aminokyselin jsou například fenyلكetonurie, isovalerová acidemie nebo nemoc javorového sirupu, které jsou diagnostikovány při novorozeneckém screeningu. Při těchto onemocněních se zvyšují hladiny 2-oxokyselin a dalších metabolitů aminokyselin v tělních tekutinách, což se může projevit opožděným vývojem nebo dokonce mentální retardací. Jejich stanovení v biologických vzorcích je tedy důležité pro rychlou a včasnou diagnostiku, než se projeví první příznaky onemocnění i následnou účinnou léčbu.

Historicky první popsaná metoda stanovení 2-oxokyselin byla papírová chromatografie, která se již v dnešní době nevyužívá. Nyní se do popředí dostává vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční nebo UV detekcí. Další používaná metoda pro stanovení 2-oxokyselin je plynová chromatografie s využitím hmotnostní nebo plamenově ionizační detekce. Aby bylo možné 2-oxokyseliny analyzovat výše uvedenými chromatografickými metodami, musí být derivatizovány, jelikož se jedná o látky, které nejsou těkavé, neabsorbují UV záření ani nefluoreskují.

Při HPLC metodě s fluorescenční detekcí se pro derivatizaci 2-oxokyselin nejčastěji používá *ortho*-fenylendiamin, který reakcí s 2-oxokyselinami poskytuje vysoce fluoreskující deriváty. Na druhou stranu se jedná o vysoce karcinogenní látku. Cílem této práce je zavést dostatečně selektivní a citlivou metodu HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve a pro derivatizaci využít vhodné derivatizační činidlo, u něhož nebyla prokázána karcinogenita.

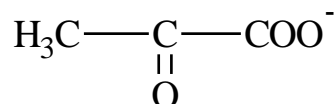
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Charakteristika vybraných 2-oxokyselin

2-Oxokyseliny jsou významné meziprodukty v různých metabolických drahách. Vznikají během katabolismu aminokyselin, karboxylových kyselin a sacharidů. Zájem o jejich stanovení se zvýšil díky jejich klíčové úloze u takových onemocnění, jako jsou fenylketonurie, deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu, nemoc javorového sirupu, laktátová acidóza nebo isovalerová acidemie. Z tohoto důvodu je kvantitativní analýza podstatná jak pro diagnostiku, tak následnou léčbu. U výše zmíněných onemocnění jsou v séru a moči pozorovány abnormální hladiny těchto látek. 2-Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem mohou také poskytnout další informace týkající se zhoršené funkce orgánů, např. při popáleninách, sepsích, jaterních poruchách nebo multiorgánovém selhání [1, 2, 3].

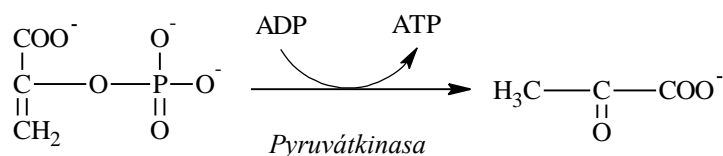
1.1.1 Pyruvát

Pyruvát, systematickým názvem kyselina 2-oxopropanová (obrázek 1), je konečným produktem glykolýzy. Také vzniká při odbourávání uhlíkatých koster některých aminokyselin (cystein, serin, glycin, threonin a tryptofan) a také transaminací neesenciální aminokyseliny alaninu za katalýzy alaninaminotransferasy. Jeho molární hmotnost je 87,054 g/mol.



Obrázek 1 *Strukturní vzorec pyruvátu*

Při glykolýze, probíhající v cytosolu buňky, z jedné molekuly glukosy vznikají dvě molekuly pyruvátu. V posledním kroku glykolýzy (obrázek 2) vzniká pyruvát z fosfoenolpyruvátu za katalýzy pyruvátkinasy, tato reakce je nevratná. Tento enzym potřebuje ke své funkci Mg^{2+} a K^+ ionty. Je aktivován fruktosa-1,6-bisfosfátem a insulinem, naopak je inhibován glukagonem, adrenalinem, noradrenalinem a adenosintrifosfátem (ATP). Během reakce se získává z jedné molekuly adenosindifosfátu (ADP) jedna molekula adenosintrifosfátu (ATP). Za fyziologických podmínek se pyruvát v těle nehromadí, ale je transportován symportem s H^+ ionty z cytosolu do matrix mitochondrií. Poté je tato 2-oxokyselina využita pro tvorbu řady dalších látek.



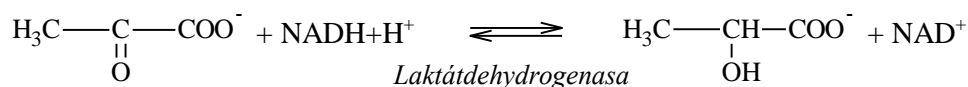
Obrázek 2 Vznik pyruvátu z fosfoenolpyruvátu v posledním kroku glykolýzy

V matrix mitochondrií probíhá oxidativní dekarboxylace, při které dochází k přeměně pyruvátu na acetyl-CoA. Tento proces je katalyzovaný tzv. pyruvátdehydrogenasovým komplexem. Skládá se ze tří enzymů, pyruvátdehydrogenasy, dihydrolipoyltransacetylasy a dihydrolipoyldehydrogenasy. Oxidativní dekarboxylace se také účastní 5 kofaktorů, thiamindifosfát, lipoát, koenzym A, flavinadenindinukleotid (FAD) a oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺). Vzniklý acetyl-CoA je pak oxidován v citrátovém cyklu za zisku 12 molekul ATP.

Pyruvát je v buňce také využit při glukoneogenezi, pokud nemáme dostatečný příjem sacharidů ve stravě. Jedná se prakticky o obrácený proces glykolýzy. Během glukoneogeneze je potřeba z pyruvátu získat zpětně fosfoenolpyruvát. Jelikož vznik pyruvátu, katalyzovaný pyruvátkinázou, je nevratný proces, je nutné, aby se tato reakce obešla. Pyruvát nemůže přejít z mitochondrie do cytosolu, proto musí být v matrix mitochondrií karboxylován na oxalacetát v přítomnosti biotinu, ATP a CO₂. Ten je pak za katalýzy aspartátaminotransferasou přeměněn na aspartát, který se přes tzv. aspartát-malátové kyvadlo dostane do cytosolu. Za katalýzy stejného enzymu vzniká opět oxalacetát. Následnou reakcí se z oxalacetátu za katalýzy fosfoenolpyruvátkarboxykinasou vytvoří fosfoenolpyruvát. Následující reakce glukoneogeneze jsou katalyzovány stejnými enzymy jako u glykolýzy, jen reakce probíhají opačným směrem, kromě vzniku fruktosa-6-fosfátu z fruktosa-1,6-bisfosfátu a glukosy z glukosa-6-fosfátu. Tyto reakce jsou katalyzované enzymy fruktosa-1,6-bisfosfatasou a glukosa-6-fosfatasou. Dalšími substráty pro glukoneogenezi jsou glycerol, glukogenní aminokyseliny, jejichž odbouráváním vznikají meziprodukty citrátového cyklu, oxalacetát, 2-oxoglutarát, fumarát, sukcinyl-CoA. Substrátem může být také laktát.

Laktát vzniká redukcí pyruvátu při anaerobní glykolýze. Reakce je katalyzována enzymem laktátdehydrogenasou (obrázek 3). Při anaerobním odbourávání pyruvátu již nevznikají žádné molekuly ATP. Dochází k regeneraci redukováných kofaktorů NADH+H⁺ zpět na oxidovanou formu NAD⁺. Díky tomu pak může glykolýza dále pokračovat za nepřítomnosti kyslíku. Nejčastěji laktát vzniká v erytrocytech, svalových buňkách, také kůži a střevní sliznici. Laktát je vychytáván z krve játry a je z něj syntetizována glukosa. Jedná se

o tzv. Coriho cyklus. Při nadměrné svalové práci, při nedostatečném zásobování kyslíkem, způsobují zvýšené hladiny laktátu acidózu, čímž dochází ke křečím.

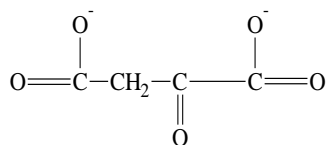


Obrázek 3 Anaerobní glykolýza (redukce pyruvátu na laktát)

Abnormální poměr koncentrace laktát/pyruvát se nachází u dědičných metabolických poruch, jako jsou dýchacího řetězce a deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu.

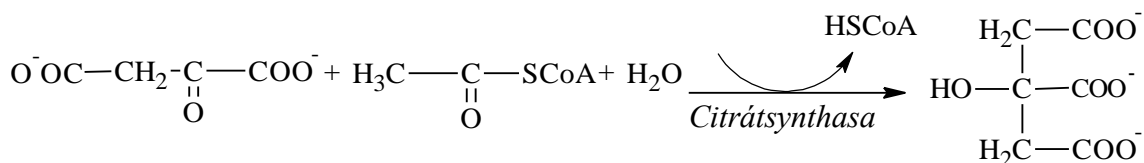
1.1.2 Oxalacetát

Oxalacetát (obrázek 4), nebo-li 2-oxobutandiová kyselina je meziproduct citrátového cyklu. Jeho molární hmotnost je 130,055 g/mol. Účastní se procesu glukoneogeneze. Také vzniká při odbourávání uhlíkatých koster aminokyselin aspartátu a asparaginu. Zbylé glukogenní aminokyseliny se metabolizují na produkty, které se mohou na oxalacetát přeměnit, pokud je potřeba.



Obrázek 4 Strukturální vzorec oxalacetátu

V citrátovém cyklu vzniká oxalacetát dehydrogenací malátu. Tato reakce je katalyzována enzymem malátdehydrogenasou za vzniku jedné molekuly $\text{NADH}+\text{H}^+$. Acetyl-CoA, vzniklý oxidativní dekarboxylací, reaguje s oxalacetátem za vzniku citrátu (obrázek 5). Reakce je nevratná a je katalyzována citrátsynthasou. Poté proběhne sled reakcí vedoucí opět ke vzniku oxalacetátu a úplnému zoxidování acetyl-CoA. Vzniklý oxalacetát může poté kondenzovat s další molekulou acetyl-CoA.



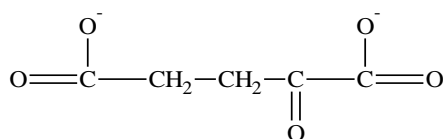
Obrázek 5 Reakce oxalacetátu s acetyl-CoA za vzniku citrátu

Transaminací oxalacetátu vzniká aspartát, který v ornithinovém cyklu kondenzuje s citrulinem za vzniku argininosukcinátu. Reakce je katalyzována

argininosukcinátsynthetasou za spotřeby jedné molekuly ATP. Dále z oxalacetátu vzniká 2-oxoglutarát, významná 2-oxokyselina účastnící se transaminačních reakcí.

1.1.3 2-Oxoglutarát

2-Oxoglutarát (obrázek 6), známý také pod názvem α -ketoglutarát je meziprodukt citrátového cyklu. Systematický název této 2-oxokyseliny je 2-oxopent-1,5-diová kyselina. Její molární hmotnost je 146,11 g/mol. Vzniká také při odbourávání uhlíkatých koster aminokyselin prolinu, histidinu a argininu.



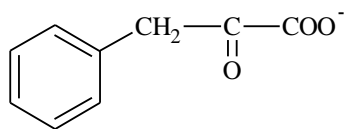
Obrázek 6 *Strukturní vzorec 2-oxoglutarátu*

Účastní se transaminačních reakcí, které jsou důležité při odbourávání aminokyselin. Při transaminaci dochází k přenosu aminoskupiny z aminokyseliny na 2-oxokyselinu, za katalýzy specifických aminotransferas. Tímto způsobem z aminokyseliny vzniká nová 2-oxokyselina, zatímco z původní 2-oxokyseliny vzniká aminokyselina. Reakce je reverzibilní a kofaktorem je pyridoxalfosfát. Nejčastěji bývá aminoskupina přenesena na 2-oxoglutarát, ale akceptorem aminoskupiny může být také oxalacetát nebo pyruvát.

Pokud je aminoskupina přenesena na 2-oxoglutarát vzniká aminokyselina glutamát. Následně může být glutamát za katalýzy enzymem glutamátdehydrogenasou přeměněn zpět na 2-oxoglutarát. Tento enzym vyžaduje jak koenzym NAD^+ , tak i nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP^+). Při oxidaci glutamátu na 2-oxoglutarát využívá NAD^+ , naopak při redukci 2-oxoglutarátu na glutamát $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Při této reakci se uvolňuje amoniak, ze kterého je v ornithinovém cyklu syntetizován karbamoylfosfát. Díky ornithinovému cyklu se tělo zbavuje toxického amoniaku ve formě močoviny.

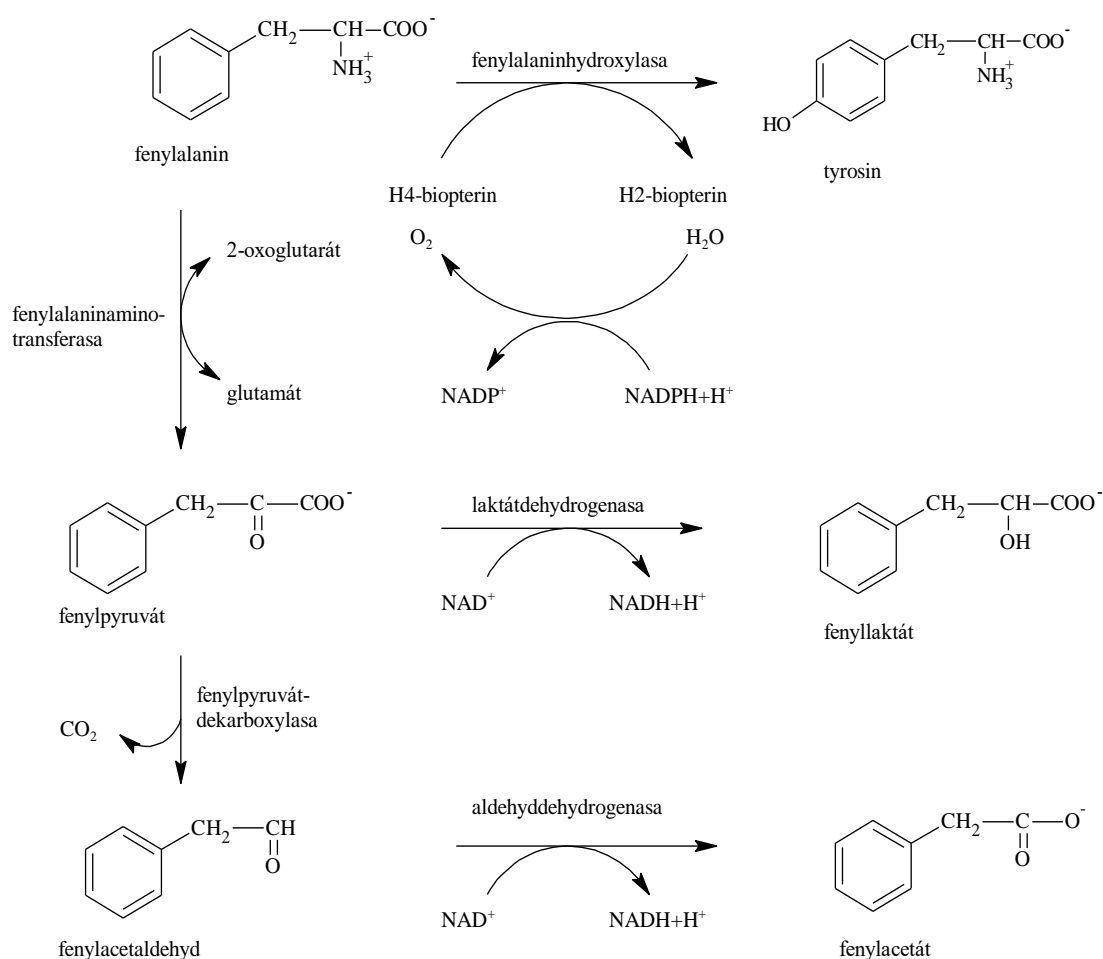
1.1.4 Fenylypyruvát

Fenylypyruvát (obrázek 7) má systematický název 2-oxo-3-fenylpropanová kyselina. Jeho molární hmotnost je 164,16 g/mol. Hladina této oxokyseliny v krvi a moči je za fyziologických podmínek nízká.



Obrázek 7 *Strukturní vzorec fenylpyruvátu*

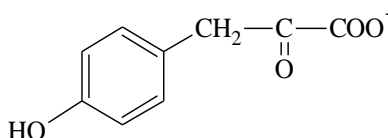
Vzniká jako meziprodukt vedlejší cesty odbourávání aminokyseliny fenylalaninu. Pokud je v játrech blokována hlavní metabolická dráha přeměny fenylalaninu na tyrosin (obrázek 8), dochází k hromadění fenylalaninu v krvi a tkáních. Nezbyvá tedy nic jiného, než aby se fenylalanin za katalýzy specifické aminotransferasy přeměnil na fenylpyruvát. Při fenylketonurii se fenylpyruvát objevuje v moči. Jeho zvýšená hladina je způsobená defektem enzymu fenylalaninhydroxylasy, která katalyzuje výše zmíněnou přeměnu fenylalaninu na tyrosin. Redukcí fenylpyruvátu vzniká fenyllaktát a jeho oxidativní dekarboxylací fenylacetát. Fenylacetát zapříčiňuje typický zápach po „myšince“ u pacientů s neléčenou fenylketonurií.



Obrázek 8 *Metabolismus fenylalaninu*

1.1.5 4-Hydroxyfenylpyruvát

4-Hydroxyfenylpyruvát (obrázek 9), systematickým názvem 3-(4-hydroxyfenyl)-2-oxopropanoát má molekulovou hmotnost 179,151 g/mol. Vzniká jako meziprodukt transaminace tyrosinu, reakce je katalyzovaná enzymem tyrosinaminotransferasou. Neesenciální aminokyselina tyrosin vzniká hydroxylací esenciální aminokyseliny fenylalaninu (obrázek 8). Tyrosin slouží jako prekurzor syntézy katecholaminů, melaninů a hormonů štítné žlázy. 4-Hydroxyfenylpyruvát je dále oxidován a dekarboxylován na homogentisát, reakce je katalyzovaná enzymem 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasou. Oxidací homogentisátu vznikají konečné produkty odbourávání tyrosinu, fumarát a acetoacetát. Tato reakce je katalyzována enzymem homogentisát-dioxygenasou. Fumarát poté vstupuje do citrátového cyklu a acetoacetát je využit na syntézu mastných kyselin.



Obrázek 9 *Strukturní vzorec 4-hydroxyfenylpyruvátu*

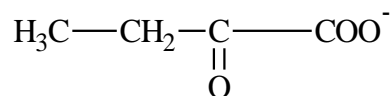
Enzym 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasa je kódován genem, který je lokalizován na chromosomu 12q24. Mutace tohoto genu vede k nedostatečné tvorbě 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy, což způsobuje onemocnění zvané tyrosinemie III. typu. Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění, které je charakterizované zvýšenou hladinou tyrosinu v krvi a jeho metabolitů v moči. Další onemocnění, které také souvisí s tímto enzymem, se nazývá Hawkinsinurie, což je autosomálně dominantní onemocnění, které je způsobeno mutací stejného genu [63].

Nedostatek homogentisát-dioxygenasy vede k tzv. alkaptonurii. Jedná se o onemocnění, které je charakterizované přítomností homogentisátu v moči. Ten je poté oxidován na produkt podobný melaninu, tzv. alkapton (oxidovaná homogentisová kyselina), který způsobuje tmavé zbarvení moče. Pacienti také trpí artritidou kloubů nebo páteře a ochronózou (modročerná pigmentace pojivové tkáně)[64].

1.1.6 2-Oxobutyryát

2-Oxobutyryát (obrázek 10), systematickým názvem 2-oxobutanová kyselina, má molární hmotnost 102,09 g/mol. 2-Oxobutyryát je meziprodukt odbourávání methioninu. V následných reakcích vzniká cystathionin, který je deaminován a štěpen na cystein a 2-oxobutyryát. 2-oxobutyryát je dále dekarboxylován na propionyl-CoA. Ten je dalšími reakcemi

přeměněn na sukcinyl-CoA, který je součástí citrátového cyklu. Dále může být aminokyselina threonin odbourána přes 2-oxobutyrát a propionyl-CoA až na sukcinyl-CoA.

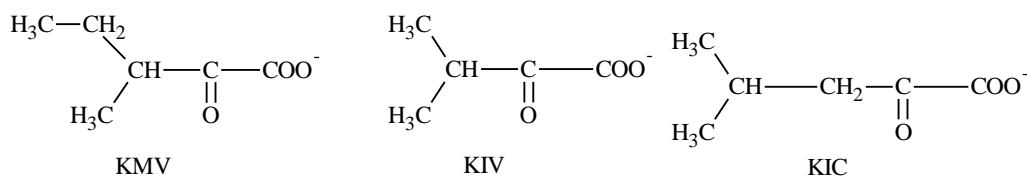


Obrázek 10 *Strukturní vzorec 2-oxobutyrátu*

1.1.7 2-Oxokyseliny s rozvětveným řetězcem

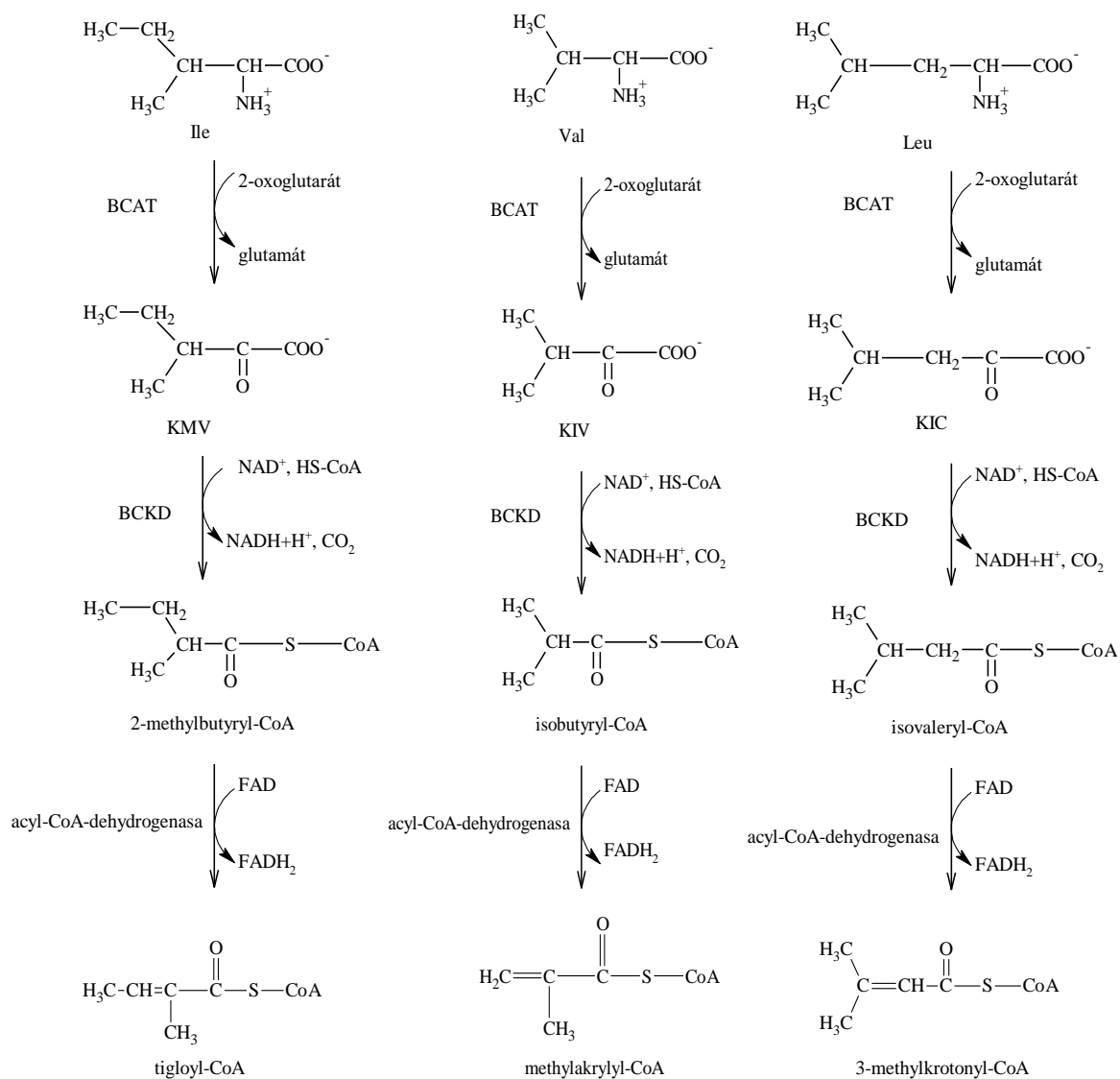
Mezi 2-oxokyseliny s rozvětveným řetězcem patří 2-oxoisovalerát (KIV, z angl. 2-ketoisovalerate), 2-oxomethylvalerát (KMV, z angl. 2-ketomethylvalerate) a 2-oxoisokapronát (KIC, z angl. 2-ketoisocaproate), které jsou odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Mezi aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA, z angl. branched-chain amino acids) řadíme valin, isoleucin a leucin. Jsou to esenciální aminokyseliny, tudíž je buňky našeho těla nedokáží syntetizovat, a proto je musíme přijímat potravou. Jedná se o alifatické, nepolární a hydrofobní sloučeniny. Ačkoliv jsou si tyto aminokyseliny podobné, liší se délkou a tvarem svého postranního řetězce. Zajímavostí je, že tyto aminokyseliny nejsou vychytávány játry, ale jsou využívány především v mozkové tkáni a svalových buňkách. Ve svalech vzniká při transaminaci těchto aminokyselin z 2-oxoglutarátu glutamát, který dále reaguje s amoniakem za tvorby glutaminu. Díky této reakci se také reguluje množství amoniaku v organismu.

KIV systematickým názvem 2-oxo-3-methylbutanová kyselina má molární hmotnost 116,15 g/mol. KMV má systematický název 2-oxo-3-methylpentanová kyselina s molární hmotností 130,13 g/mol. Poslední 2-oxokyselinou je KIC, jejíž systematický název je 2-oxo-4-methylpentanová kyselina s molekulovou hmotností 130,13 g/mol (obrázek 11).



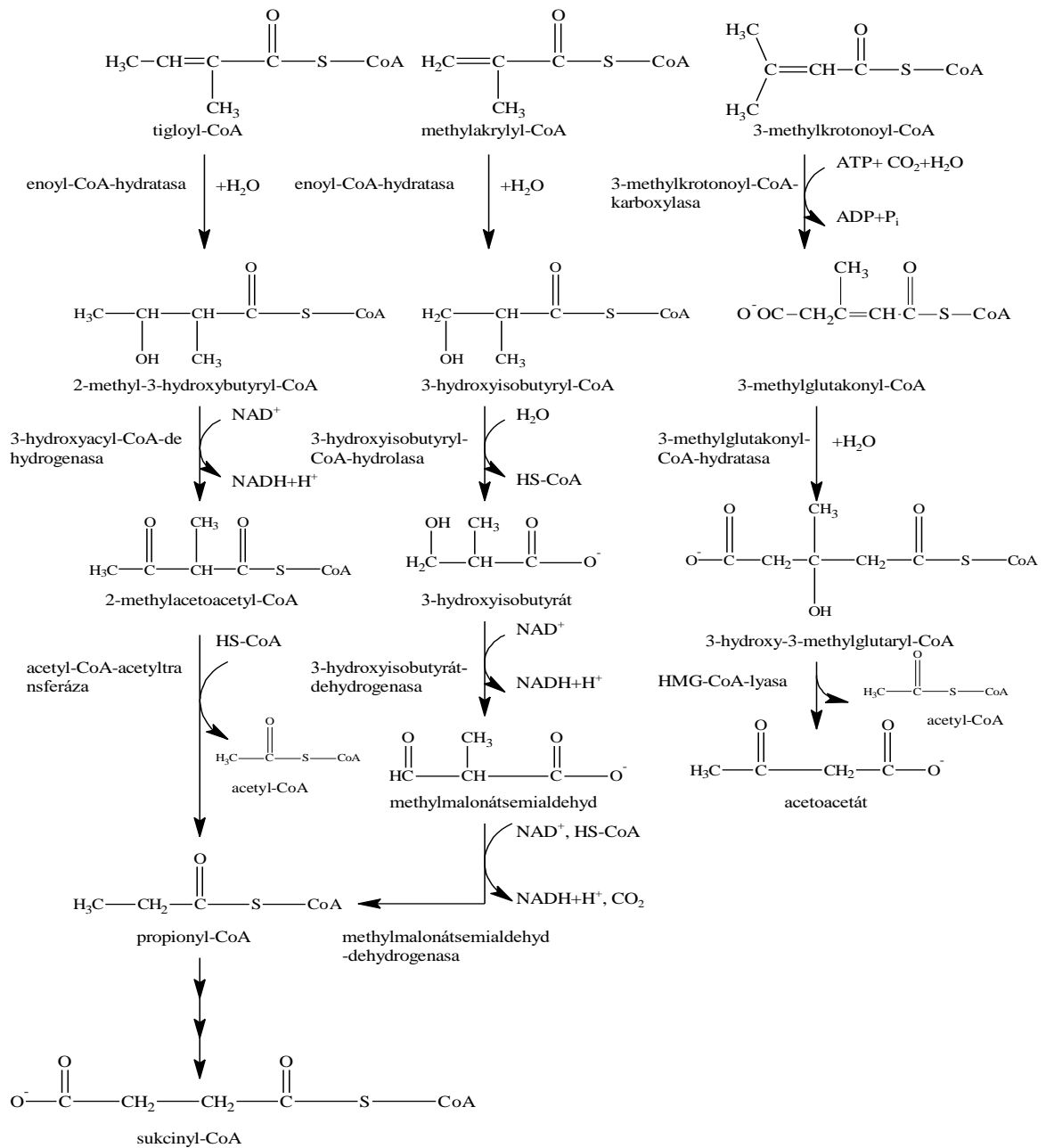
Obrázek 11 *Strukturní vzorce 2-oxoisovalerátu (KIV), 2-oxoisokapronátu (KIC) a 2-oxo-3-methylvalerátu (KMV)*

Odbourávání těchto aminokyselin (obrázek 12 a 13) probíhá v prvních třech krocích společně. Jedná se o transaminaci, oxidativní dekarboxylaci a dehydrogenaci. Při transaminaci vznikají odpovídající 2-oxokyseliny (KIC, KIV a KMV) a glutamát. Hlavním úkolem těchto 2-oxokyselin je zbavit zejména sval toxického amoniaku, jehož hromadění zpomaluje proteosyntézu a způsobuje svalovou únavu. Nejúčinnější z nich je KIC. Reakce je reverzibilní a je katalyzována aminotransferasami rozvětvených aminokyselin (BCAT, z angl. branched-chain amino acid aminotransferase). Tyto aminotransferasy se vyskytují ve dvou isoformách, mitochondriální a cytoplazmatické. Na transaminaci navazuje oxidativní dekarboxylace, která je katalyzována multienzymovým komplexem dehydrogenas, vyskytující se na povrchu mitochondriální membrány a využívající kofaktor NAD^+ . Jedná se o nevratnou reakci, které se také účastní koenzym A. Vznikají příslušné thioestery acyl-CoA. Pokud se objeví defekt tohoto enzymatického komplexu, projeví se syndrom javorového sirupu. Poslední společnou reakcí je dehydrogenace, při které vzniká dvojná vazba mezi uhlíky thioesterů acyl-CoA. Reakce je katalyzována acyl-CoA dehydrogenasou, využívající kofaktor FAD. Poté jsou vzniklé nenasyčené thioestery acyl-CoA metabolizovány specifickými metabolickými dráhami. Z valinu následnými reakcemi vzniká sukcinyl-CoA. Leucin se metabolizuje na β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA, z kterého vzniká acetyl-CoA a acetoacetát. Isoleucin je degradován na propionyl-CoA a acetyl-CoA. Tyto látky jsou poté využity pro syntézu sacharidů nebo lipidů.



Obrázek 12 Katabolismus valinu, leucinu a isoleucinu I

BCAT, aminotransferasa aminokyselin s rozvětveným řetězcem; BCKD, dehydrogenasa oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem; KIV, 2-oxoisovalerát; KIC, 2-oxoisokapronát; KMV, 2-oxo-3-methylvalerát; NAD⁺, nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaná forma; NADH+H⁺, nikotinamidadenindinukleotid, redukována forma; FAD, flavinadenindinukleotid, oxidovaná forma, FADH₂, flavinadenindinukleotid, redukována forma



Obrázek 13 Katabolismus valinu, leucinu a isoleucinu II

NAD^+ , nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaná forma; $NADH+H^+$, nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma; HMG, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; $HS-CoA$, koenzym A.

2 VYBRANÉ METABOLICKÉ PORUCHY

U všech novorozenců narozených na území České republiky doporučuje Ministerstvo zdravotnictví provedení novorozeneckého laboratorního screeningu vrozených onemocnění. V dnešní době se v rámci screeningu vyšetřuje 18 onemocnění. Patří mezi ně například nemoc javorového sirupu, isovalerová acidemie a fenylketonurie. V roce 2016 se v České republice podařilo diagnostikovat 19 novorozenců s fenylketonurií a 1 dítě s isovalerovou acidémií. Nenarodilo se žádné dítě s nemocí javorového sirupu (MSUD, z angl. maple syrup urine disease). Od roku 2010 se podařilo zachytit celkem 144 pacientů s fenylketonurií (s prevalencí 1:5378), 1 pacienta s MSUD (s prevalencí 1:774 486) a 4 pacienty s isovalerovou acidémií (s prevalencí 1:193 622) [4]. Další metabolické poruchy, které jsou popsány níže, nejsou primárním cílem novorozeneckého screeningu.

2.1 Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu

Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu je genetická porucha [5]. Jedná se o závažné vrozené metabolické onemocnění, které postihuje především nervový systém [6]. Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu spočívá ve snížené aktivitě enzymu pyruvát dehydrogenasy v buňkách. Příčinou snížené aktivity jsou mutace, které se mohou vyskytovat u čtyř podjednotek pyruvátdehydrogenasového komplexu [7]. Pyruvátdehydrogenasový komplex katalyzuje krok omezující rychlost aerobní oxidace glukosy [5]. Pro nervový systém je tento komplex nepostradatelný, protože energii získává právě z aerobní oxidace glukosy. V důsledku snížení aktivity tohoto komplexu dochází k akumulaci pyruvátu a laktátu [8].

Komplex se skládá z více kopií tří enzymatických podjednotek: pyruvátdehydrogenasy (E1), dihydrolipoamidtransacetylasy (E2) a dihydrolipoamiddehydrogenasy (E3) s E3 vázajícím proteinem. Gen kódující E1 podjednotku je umístěn na chromosomu X. Regulace komplexu spočívá v reversibilní fosforylaci podjednotky E1 α , která je zprostředkována kinasami a fosfatasami [5].

Závažnost onemocnění závisí na dané mutaci. Ve většině případů defekt zahrnuje podjednotku E1 α , která je kódována genem PDHA1 na chromosomu X [6]. Bodová mutace u podjednotky E1 β narušuje katalytickou aktivitu enzymu [7]. Mutace se může objevit i u genu PDHA2, který kóduje podjednotku E2. Tato forma se objevuje zřídka [6]. U pacientů se neprojevuje laktátová acidóza a aktivita pyruvátdehydrogenasy se pohybuje okolo 30-50 %

[7]. Vzácněji se mutace projevuje i u proteinu E3BP (z angl. E3 binding protein), přenáší se autosomálně recesivním způsobem [6].

Příznaky deficitu pyruvátdehydrogenasového komplexu jsou laktátová acidóza, zvýšené hladiny pyruvátu a ataxie. Později se projevuje opožděný vývoj, psychomotorická retardace a snížená kognitivní schopnost. Tyto příznaky ukazují, že nervový systém je citlivý na nedostatečnou aktivitu pyruvátdehydrogenasy [7]. Deficit se také projevuje neuromuskulární degenerací a obvykle končí smrtí během dětství [5].

2.2 Laktátová acidóza

Laktátová acidóza je metabolická porucha, která vzniká jako důsledek akumulace laktátu v tělních tekutinách, která je způsobena jeho nadprodukcí nebo nedostatečným využitím [9]. Na vznik laktátové acidózy mohou mít vliv i jiné faktory jako je například zvýšená koncentrace pyruvátu [10].

Laktát je konečným produktem anaerobní glykolýzy. Laktát vzniklý z glukosy v kosterním svalu a erytrocytech je transportován do jater a ledvin, kde je opět přeměněn na glukosu. Glukosa se díky krevnímu oběhu může dostat do dalších tkání, kde podléhá oxidaci. Toto se označuje jako Coriho cyklus [11, 12].

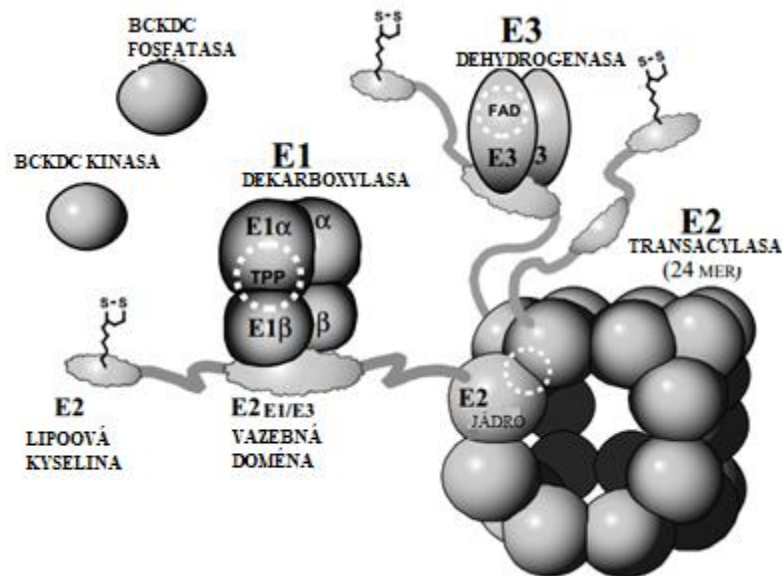
Cohen a Woods [13] dělí laktátovou acidózu do dvou kategorií, A a B. Typ A je spojován se špatným zásobováním tkání okysličenou krví vlivem hypotenze, cyanózy a hypoxie. Příčinou nadprodukce laktátu je také porucha krevního oběhu. Dalšími příčinami jsou jaterní onemocnění, inhibice glukoneogeneze nebo nedostatek thiaminu. Typ B je rozdělen do dalších tří subtypů. Typ B1 se projevuje u selhání ledvin a jater, diabetu a malignity. Typ B2 je způsoben léky a toxiny, včetně alkoholu, salicylátů a biguanidů. Typ B3 je charakterizován vrozenou metabolickou poruchou.

Laktátová acidóza je také spojována s nedostatkem enzymu dihydrolipoyldehydrogenasy. Jak bylo popsáno u MSUD, jedná se o třetí složku pyruvátdehydrogenasového komplexu. Bylo zjištěno, že dihydrolipoyldehydrogenasu sdílí jak pyruvátdehydrogenasový komplex, tak 2-oxoglutarátdehydrogenasový komplex. Tato metabolická porucha není tedy spojována pouze se zvýšenou hladinou laktátu, ale také 2-oxoglutarátu a aminokyselin s rozvětveným řetězcem. *Postmortem* zjišťovaná aktivita dehydrogenas katalyzujících přeměnu aminokyselin s rozvětveným řetězcem se pohybovala mezi 0 a 10 % [14]. U pacientů s touto poruchou se projevil opožděný vývoj, měli zvýšenou hladinu pyruvátu, laktátu a alaninu a sníženou aktivitu pyruvátdehydrogenasy [7].

2.3 Nemoc javorového sirupu

V roce 1954 Menkes, Hurst a Craig uvedli čtyři případy novorozenců s neurologickým degenerativním onemocněním. Toto onemocnění se vyznačovalo edémem mozku, záchvaty, spasticitou dýchacích cest, nebo zástavou dýchání. Projevila se také u nich ketoacidóza, při které se objevil další příznak, a to charakteristický zápach připomínající javorový sirup [15, 16].

U dětí postižených MSUD nedochází k dekarboxylaci větvených 2-oxokyselin odvozených od leucinu, isoleucinu a valinu [17]. Toto onemocnění je způsobeno nedostatkem mitochondriálního enzymu dehydrogenasy větvených 2-oxokyselin [15, 18]. Jedná se o multienzymatický komplex (obrázek 14), který je u savců složený ze tří katalytických složek, dekarboxylasy (E1, složené ze dvou podjednotek α a dvou podjednotek β), dihydrolipoamidtransacylasy (E2) a dihydrolipoamiddehydrogenasy (E3) a také ze dvou regulačních enzymů, kinasy a fosforylasy [15]. Dekarboxylace těchto tří oxokyselin je zprostředkována thiaminpyrofosfátem. Kyselina lipová u složky E2 usnadňuje přenos acylových zbytků s rozvětveným řetězcem ze složky E1 na koenzym A za vzniku acyl-CoA s rozvětveným řetězcem. Součástí E3 je flavopterin, který umožňuje oxidaci kyseliny dihydrolipoové na lipovou, NAD^+ je konečný akceptor elektronů [17].



Obrázek 14 Multienzymový komplex dehydrogenasy větvených aminokyselin. BCKDC, dehydrogenasa oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem; TPP, thiaminpyrofosfát; FAD, flavinadenindinukleotid, oxidovaná forma. Upraveno dle [17].

Nahromaděné metabolity aminokyselin s větveným řetězcem jsou neurotoxické [15]. V dnešní době rozlišujeme 5 fenotypů tohoto onemocnění: klasická, mírná, intermitentní, thiamin responzivní a E3 deficitní MSUD [16].

Při klasické MSUD se zpočátku, po narození, děti jeví zdravě, ale do konce prvního týdne života se začínají projevovat první symptomy, letargie, nechutenství (zřídka zvracení), mají úbytek na váze, střídá se u nich období hypertonie a hypotonie, mají křeče, nepravidelné dýchání až apnoi [16]. Dále se projevují záchvaty, ketoacidóza, svalový tonus. Aktivita dekarboxylasy je u této formy 0–2 % [15]. Zápach po javorovém sirupu nemusí být z počátku přítomen [16]. Klasická MSUD, pokud není léčená, vede k nevratnému poškození mozku [15], následované kómatem a smrtí [16].

U mírné MSUD je aktivita tohoto enzymu snížena na 3–40 %. Průběh tohoto onemocnění je mírnější. Projevuje se opožděný vývoj a mentální retardace, což je hlavní klinický rys, kterého si lze všimnout během prvního roku života. Také se objevuje hypotonie a zápach po javorovém sirupu [15, 16].

Pacienti s intermitentní MSUD mají normální vzrůst a vývoj. Nemoc se u nich projevuje ataxií a ketoacidózou [15]. Pacienti jsou ohroženi akutní metabolickou dekompenzací během stresových situací. Klinické příznaky jsou zřetelné od dvou měsíců při infekcích, po očkování, operacích nebo při náhlém zvýšeném příjmu proteinů. Toto období nemoci je charakterizované zápachem po javorovém sirupu, podrážděností a ataxií. Tyto epizody se mohou objevit několikrát během života. Pacienti mají upravenou dietu [16].

U některých pacientů se vyskytuje tzv. thiamin responzivní MSUD s mírným průběhem, při níž po podání thiaminu může dojít ke zmírnění příznaků [15].

Pacienti s deficiencí E3 mají poměrně klidné první měsíce života. Poté mezi druhým a šestým měsícem života se u nich vyvíjí perzistentní laktátová acidóza a neurologické zhoršení, hypotonie, opožděný vývoj a pohybové abnormality [16].

Koncentrace leucinu v plazmě u dětí mladších 5 let by se měly pohybovat v rozmezí 75-200 $\mu\text{mol/l}$ a v rozmezí 75-300 $\mu\text{mol/l}$ u dětí starších 5 let [19]. Koncentrace valinu a isoleucinu v plazmě by měly být v rozmezí 200-400 $\mu\text{mol/l}$ [20].

Cílem celoživotní dietní terapie (tabulka 1) je snížit hladinu toxických metabolitů a dosáhnout koncentrací aminokyselin s větveným řetězcem v plazmě v určitém rozmezí. Monitorování hladin aminokyselin do jednoho roku života probíhá každý týden, popř. každý druhý týden. S rostoucím věkem se monitorování neprovádí tak často, avšak s ohledem na individuální situaci [19].

Tabulka 1 Doporučené denní příjmy aminokyselin s rozvětveným řetězcem a proteinů v závislosti na věku [19]

Věk	Leu[mg/kg]	Ile [mg/kg]	Val [mg/kg]	Proteiny [g/kg]
0-6 měsíců	40-100	30-90	40-95	2,5-3,5
7-12 měsíců	40-75	30-70	30-80	2,5-3
1-3 roky	40-70	20-70	30-70	1,5-2,5
4-8 let	35-65	20-30	30-50	1,3-2
9-13 let	30-60	20-30	25-40	1,2-1,8
14-18 let	15-50	10-30	15-30	1,-1,8
>19 let +	15-50	10-30	15-30	1,1-1,7
nekojící ženy				

2.4 Fenylylketonurie

Fenylylketonurie byla poprvé popsána Follingem v roce 1934, kdy byl zjištěn fenylylpyruvát v moči u dvou sourozenců, u kterých se projevila mentální retardace. Termín fenylylketonurie zůstává nejpoužívanějším názvem pro hyperfenylalaninemii, která je způsobená nedostatečnou aktivitou jaterního enzymu fenylylalaninhydroxylasy [21]. Pacienti trpící fenylylketonurií mají v plazmě a moči zvýšenou hladinu fenylylpyruvátu a dalších metabolitů fenylylalaninu, jako je například fenylylaktát a fenylylacetát, který způsobuje charakteristický zápach po myšíně [11]. Zvýšená hladina fenylylpyruvátu u dětí působí toxicky na centrální nervový systém [2].

Fenylylketonurie je nejčastější autosomálně recesivní onemocnění, které je způsobené poruchou v metabolismu aminokyselin. Neschopnost přeměnit fenylylalanin na tyrosin vede k hromadění fenylylalaninu v krvi. Zvýšená hladina fenylylalaninu má inhibiční efekt na transport aminokyselin v mozku, což má za následek nezvratné neurologické poškození, které se projevuje mentální retardací (IQ < 50) téměř u všech pacientů, u kterých ihned po narození nebyla zavedena speciální dieta [11, 21-23]. Vyšetření potvrzuje také zvýšené napětí svalů, třes a mikrocefalii. Běžné jsou EEG abnormality. U dalších případů byla pozorována hypopigmentace vlasů, kůže a duhovky v důsledku snížené syntézy melaninu, který je tvořen právě z tyrosinu. Nedostatek tyrosinu se také projevuje na snížené syntéze proteinů a neurotransmiterů [11, 21]. U neléčených pacientů se vyskytuje také porucha chůze. V některých případech se projevují záchvaty nebo poruchy chování, jako jsou hyperaktivita, agrese a stavy úzkosti [21].

Aby se zabránilo mentálnímu postižení u dětí, je nastolena speciální dieta s nízkým obsahem fenylalaninu. Tato dieta může být ukončena v šestém roce života, jelikož vysoké hladiny fenylalaninu a jeho derivátů již nepoškozují mozek [11].

Ve většině vyspělých zemí je fenylketonurie diagnostikována prostřednictvím novorozeneckého screeningu [21].

2.5 Deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu

Deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu je autosomálně recesivní onemocnění [24]. Tento komplex se skládá také ze tří enzymů, 2-oxoglutarátdekarboxylasy (E1), lipoátsukcinyltransferasy (E2) a lipoamiddehydrogenasy (E3). Tyto enzymy katalyzují oxidativní dekarboxylaci 2-oxoglutarátu za vzniku sukcinyl-CoA a NADH v citrátovém cyklu. Deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasy spolu s deficitem pyruvátdehydrogenasy a deficitem dekarboxylasy katalyzující přeměnu aminokyselin s rozvětveným řetězcem, se označuje souhrnně jako E3 deficit, jelikož výše zmíněné komplexy mají E3 složku společnou [25].

U většiny pacientů se v moči prokazuje zvýšená hladina 2-oxoglutarové kyseliny, ačkoliv nález 2-oxoglutarové acidurie se nemusí projevit pokaždé. Symptomy tohoto onemocnění jsou hypotonie, opožděný vývoj, spasticita, hepatomegalie nebo metabolická acidóza. U některých pacientů byly zvýšeny další meziprodukty citrátového cyklu, u jiných byla pozorována i zvýšená hladina glutaminu a glutamové kyseliny v plazmě. Toto onemocnění končí smrtí v dětském věku [24, 25].

2.6 Isovalerová acidemie

Isovalerová acidemie byla první acidemie popsána u člověka, a to v roce 1966 Tanakou a kolektivem, jako vrozená porucha katabolismu leucinu [26, 27]. Je to autosomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno nedostatkem mitochondriálního enzymu isovaleryl-CoA-dehydrogenasy, katalyzující přeměnu isovaleryl-CoA. To má za následek hromadění derivátů isovaleryl-CoA [26]. Toxický isovaleryl-CoA je konjugován buď s glycinem, nebo je konjugován s L-karnitinem [28]. V moči pacientů se objevuje isovalerylglycin a 3-hydroxyisovalerová kyselina [26], přičemž isovalerylglycin je hlavním metabolitem [28]. Nedostatek enzymu isovaleryl-CoA-dehydrogenasy je spojen s výrazným snížením volného karnitinu jak v plazmě, tak moči [28]. Při diagnostice se tedy stanovují hladiny isovalerylglycinu a isovalerylkarnitinu v moči a plazmě. Hladina volné isovalerové kyseliny

v krvi se může zvýšit více než stokrát v porovnání s referenčními hladinami. Avšak z důvodu rychlé konjugace se v krvi a moči nestanovuje [26].

Isovalerová acidemie se vyskytuje v akutní novorozenecké nebo chronické formě. Při chronické formě je projevem opožděný vývoj. Nedávno byla popsána další forma, která je asymptomatická a je diagnostikována při novorozeneckém screeningu [26].

Isovalerová acidemie byla poprvé popsána u dvou sourozenců ve věku 2,5 a 4 let, u kterých se v brzkých měsících po narození objevil trvalý zápach potu a dalších tělesných tekutin připomínající sýrový zápach nebo zápach zpocených nohou. Dále se u nich projevilo zvracení, metabolická acidóza a později i kóma [29].

U akutní formy onemocnění se u novorozenců objevují v prvních dvou týdnech života takové projevy, jako jsou zvracení, nechutenství, záchvaty a také snížená úroveň vědomí. Kóma může být způsobeno požitím většího množství proteinů. Novorozenci se zdají být dehydratováni a může se u nich projevit hypotermie. Charakteristický je sýrový zápach moče, potu nebo ušního mazu [26].

Včasná diagnóza a léčba dietou, s omezeným obsahem bílkovin a doplňování karnitinu a glycinu, účinně podporuje normální vývoj u těžce postižených jedinců [26].

2.7 Hypervalinemie a hyperleucinemie-isoleucinemie

V roce 1963 byla popsána Wadou a kolektivem další vzácná vrozená metabolická porucha, která postihuje metabolismus valinu [30]. Hypervalinemie a hyperleucin-isoleucinemie jsou způsobeny mutací v genu BCAT. Existují dvě isoformy enzymu BCAT. Jsou známé jako BCAT1, který se nachází v cytoplasmě a mitochondriální BCAT2, který se objevuje ve většině tkání. Mutace u genu BCAT2 může způsobit obě tyto poruchy. Nadále je zkoumáno, zda tato onemocnění mají vliv na poškození mozku [31].

Pro hypervalinemii je typická zvýšená koncentrace valinu v plazmě a moči. Pacienti s tímto onemocněním nejsou schopni transaminace valinu na 2-oxoisovalerát. Zároveň však nejsou zvýšené hladiny leucinu nebo isoleucinu, protože transaminace u zbývajících větvených aminokyselin probíhá bez problému. Příznaky tohoto onemocnění u dětí jsou zvracení, nechutenství, svalová hypotonie, opožděný tělesný a duševní vývoj [11, 31].

Hyperleucinemie-isoleucinemie je metabolické onemocnění, při kterém se objevuje porucha v transaminaci leucinu a isoleucinu, přičemž transaminace valinu probíhá bez komplikací. Toto onemocnění má stejné příznaky jako hypervalinemie, s tím rozdílem, že se u dětí může projevit hluchota a degenerativní změny na sítnici [32].

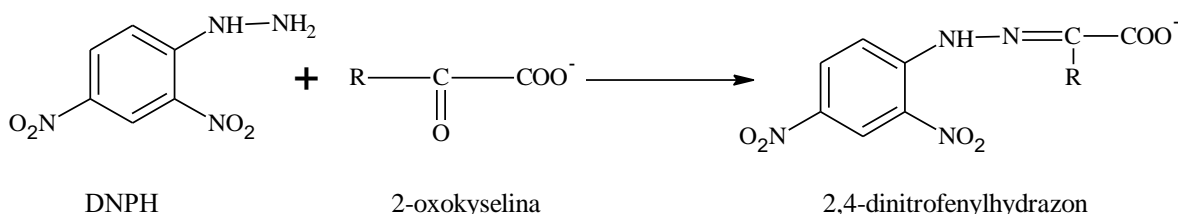
3 METODY STANOVENÍ 2-OXOKYSELIN

Pro stanovení 2-oxokyselin se využívá řada metod. Papírová nebo tenkovrstvá chromatografie se řadí mezi první metody, které se začaly používat. V dnešní době se 2-oxokyseliny analyzují spektrofotometrickými a spektrofluorimetrickými metodami, kapilární zónovou elektroforézou a v neposlední řadě chromatografickými technikami [1, 2]. Pro detekci 2-oxokyselin jsou využívány i jiné metody jako je hmotnostní spektrometrie (MS) nebo elektrochemické metody, jako je například voltametrie [33, 34].

2-Oxokyseliny jsou látky, které neabsorbují UV-záření a ani přirozeně nefluoreskují, a nejsou těkavé. Z tohoto důvodu při použití chromatografických metod, je nutná derivatizace. Derivatizace nám umožňuje převést původně polární 2-oxokyseliny na deriváty, které jsou dobře separovány na obrácených fázích a silně absorbují v UV nebo viditelné oblasti, či fluoreskují [35]. Derivatizace může být provedena buď před nadávkováním vzorku na kolonu (tzv. předkolonová derivatizace), nebo po separaci na koloně, před vstupem látek do detektoru (tzv. poskolonová derivatizace).

3.1 Papírová chromatografie

První popsaná metoda stanovení 2-oxokyselin, avšak v dnešní době již nepoužívaná, byla papírová chromatografie. Je to semikvantitativní analýza. Již v roce 1949 Cavallini a kolektiv popsali detekci 2-oxokyselin po derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH; obrázek 15). Při této metodě papír funguje jako nosič, na kterém je ukotvena stacionární fáze (např. voda), zatímco mobilní fáze vzlíná vlivem kapilárních sil. Seligson a kolektiv Cavalliniho modifikovanou metodou stanovili v krvi a moči pyruvát a 2-oxoglutarát. Zároveň se jim podařilo separovat další dvě neidentifikovatelné oxokyseliny, vyskytující se v moči. Pyruvát se separoval ve dvou skvrnách, zatímco 2-oxoglutarát jako jedna.



Obrázek 15 Reakce 2,4-dinitrofenylhydrazinu s 2-oxokyselinou

Později bylo zjištěno, že 2,4-dinitrofenylhydrazin existuje jak v *cis*, tak *trans* formě, proto vznik dvou skvrn 2,4-dinitrofenylhydrazonů pyruvátu. Vedle výše zmíněného 2,4-dinitrofenylhydrazinu se také používala jiná derivatizační činidla jako například fenylhydrazin a p-nitrofenylhydrazin [36, 37].

Jelikož 2,4-dinitrofenylhydrazin nebyl dostatečně specifický pro stanovení oxokyselin a při separaci v důsledku isomerace vznikalo více skvrn, začalo se hledat jiné, vhodnější, derivatizační činidlo. Studie z roku 1955 se zabývala využitím 1,2-diamino-4-nitrobenzenu jako derivatizačního činidla při stanovení oxokyselin. Nitrochinoxalinolové deriváty oxokyselin byly stabilnější a dobře separovatelné papírovou chromatografií. Deriváty byly detekovány pod UV lampou. Problémem však byly nestálé retardační faktory při opakovaných měření v důsledku změny teploty, popřípadě na tento jev měl vliv nepatrných změn ve složení směsi rozpouštědel použitých jako mobilní fáze. Navzdory tomu se ale jednalo o více specifické derivatizační činidlo, navíc vznikal pouze jeden derivát [38].

3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Jako jedna z nejpoužívanějších metod pro analýzu 2-oxokyselin v biologickém materiálu se uvádí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční nebo spektrofotometrickou detekcí na obrácené fázi, jelikož nám poskytuje vysokou citlivost a selektivitu pro tyto látky [39, 41-43]. Pro separaci se využívá jak isokratická [43, 59], tak gradientová eluce [3]. Pailla a kolektiv [3] ve své práci porovnávali časovou náročnost jejich metody v porovnání s jinými publikacemi. Po derivatizaci 2-oxokyselin s *ortho*-fenylendiaminem (OPD) byly deriváty 2-oxokyselin separovány gradientovou elucí během 12 minut. Wang a kolektiv derivatizovali 2-oxokyseliny 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenem, doba analýzy byla 20 minut. Hara a kolektiv separovali deriváty 2-oxokyselin během 14 minut, nicméně příprava vzorku byla časově náročná, trvala asi 2,5 hodiny.

Spojení fluorescenční detekce s HPLC metodou má tu výhodu, že oproti UV- detekci je podstatně citlivější [40, 41, 43]. Deriváty 2-oxokyselin s OPD můžeme také analyzovat ultrarychlou kapalinovou chromatografií (UFLC, z angl. ultra fast liquid chromatography) s hmotnostní detekcí [34].

HPLC metody většinou vyžadují předúpravu vzorku před vlastní analýzou tak, aby se odstranily interferující látky [42]. Jako jedna z nejpoužívanějších metod je extrakce tuhou fází (SPE, z angl. solid-phase extraction), která se provádí po derivatizaci 2-oxokyselin. Důležitou úlohu hraje výběr extrakčního činidla, nejčastěji se používá ethylacetát [3, 34]. Další možnost

extrakce metodou SPE popisuje Radeck a kolektiv [44] ve své práci z roku 1988, kdy k eluci chinoxalinových derivátů z SPE kolonky použili směs methanolu s vodou a následně směs acetonitrilu s vodou. K extrakci se také využívají jiná organická rozpouštědla, například Mahar a kolektiv [45] využili k eluci derivátů 2-oxokyselin, vzniklých reakcí s 4-nitro-1,2-fenylendiaminem, chloroform.

3.2.1 Derivatizace u HPLC metod

Ne každá látka má vhodné vlastnosti pro detekci. Aby tyto látky mohly být analyzovány, je třeba je chemicky modifikovat. To se provádí procesem tzv. derivatizace [46]. Derivatizací zavádíme vhodné fluorofory nebo chromofory, nebo případně jiné skupiny do molekuly analyzované látky. Vznikají UV/Vis-absorbující nebo fluoreskující deriváty, které jsou vhodné pro následnou analýzu. Derivatizace také zlepšuje separaci látek, selektivitu a citlivost stanovení, zabraňuje nežádoucí sorpci látek na koloně, čímž se zvyšuje účinnost separačního procesu a navíc ovlivňuje dobu analýzy. Rozlišujeme tři kategorie derivatizace v HPLC. Podle místa, kde derivatizace probíhá, se jedná o předkolonovou a postkolonovou derivatizaci, nebo derivatizaci na koloně, kdy chemická reakce probíhá přímo na koloně [46, 47].

3.2.1.1 Předkolonová derivatizace

Při předkolonové derivatizaci probíhá chemická reakce před kolonou. Derivát musí být dostatečně stabilní. Jako každá metoda má své výhody i nevýhody. Reakční podmínky separace se mohou volit libovolně. Na rozdíl od postkolonové derivatizace, může probíhat reakce pomalu, řádově až desítky minut, avšak příliš dlouhá doba derivatizace může vést ke snížení přesnosti metody. Vhodným výběrem činidel a způsobu extrakce můžeme eliminovat interferující látky. Také nabízí možnost snadného odstranění přebytečných reagentů. Jednou z největších nevýhod je vznik vedlejších produktů, které mohou interferovat při stanovení, což se odrazí na selektivitě metody [46, 48]

3.2.1.2 Postkolonová derivatizace

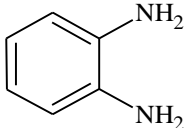

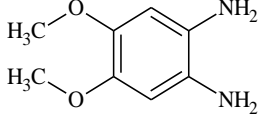

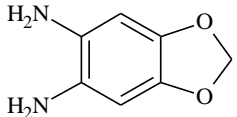

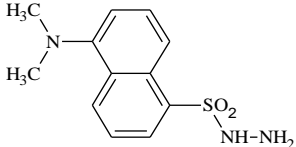

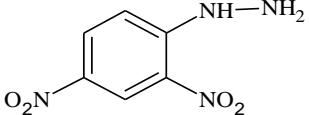

Při postkolonové derivatizaci probíhá reakce za kolonou. Při tomto procesu nemusí být derivát jednoznačné chemické individuum. Analyt je separován v nezměněné podobě. Post-kolonová derivatizace je plně automatizovaná, tudíž není potřeba manuální operace. Reakce musí probíhat rychle za daných podmínek (pH a teplota). Vznik vedlejších produktů při reakci nevádí. Nevýhodou tohoto typu derivatizace je použití nadbytku derivatizačního činidla a naředění analytu [46, 48].

3.2.1.3 Derivatizační činidla používaná při stanovení 2-oxokyselin metodou HPLC

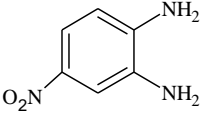

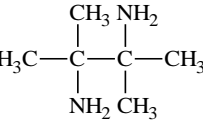

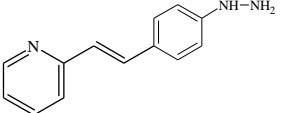

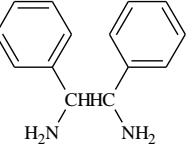

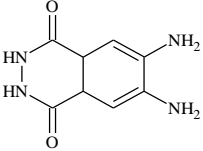

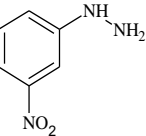

Derivatizační činidla, která se nejčastěji používají při stanovení 2-oxokyselin HPLC metodami, jsou *ortho*-fenylendiamin, 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen, 4-hydrazino-2-stilbenzol a 2,4-dinitrofenylhydrazin [1, 2].

Pro stanovení 2-oxokyselin metodou HPLC s fluorescenční detekcí bylo jako první derivatizační činidlo použit *ortho*-fenylendiamin. Později bylo zjištěno, že 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen (DDB) také reaguje s 2-oxokyselinami a poskytuje mnohem silněji fluoreskující deriváty [49]. Pro chemiluminiscenční detekci bylo jako první derivatizační činidlo použito 4,5-diaminofthalhydrazid, který se dá využít pro stanovení 2-oxokyselin HPLC metodou na obrácených fázích. 2-Oxokyseliny nejprve reagují s derivatizačním činidlem a teprve poté je ke vzniklým derivátům přidán peroxid vodíku a hexakynoželezitan draselný [50, 51, 52]. Přehled derivatizačních činidel, používaných při stanovení 2-oxokyselin metodami HPLC, je uveden v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2 Přehled derivatizačních činidel pro HPLC I

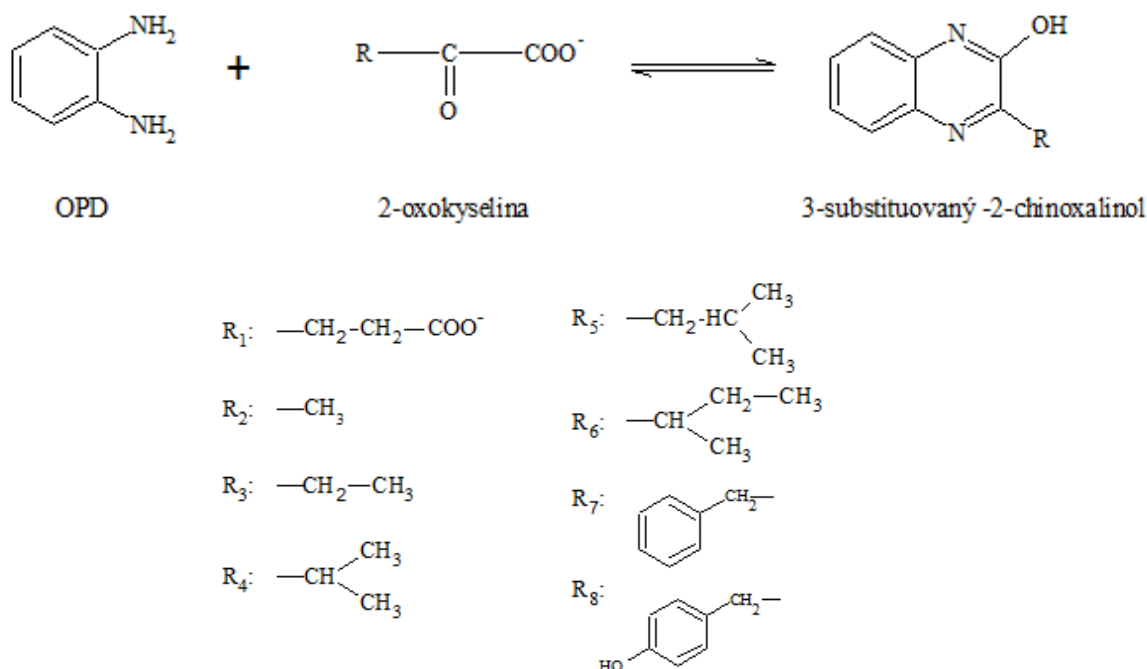
Derivatizační činidlo	Vzorec	Detekce (nm)	Biologický materiál	Citace	Piktogramy	H-věty
<i>Ortho</i> -fenyldiamin		Fluorescenční 350/410	Plná krev, sérum	[3, 54, 57]		H301-H312 +H332- H317-H319- H341-H351- H410
1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzen		Fluorescenční 365/445	Moč, sérum	[39, 40]		H315-H319- H335
1,2-Diamino-4,5-methyldioxybenzen		Fluorescenční 367/445	Moč, sérum	[49, 59]		H315-H319- H335
Dansylhydrazin		Fluorescenční 350/525 UV-Vis 254	Plazma	[53]		H315-H319- H335
2,4-Dinitro-fenylhydrazin		UV-Vis 360	Moč, plazma	[55]		H228-H302

Tabulka 3 *Přehled derivatizačních činidel pro HPLC II*

Derivatizační činidlo	Vzorec	Detekce (nm)	Biologický materiál	Citace	Piktogramy	H-věty
4-Nitrofenylen-diamin		UV-Vis 299-340	Sérum, moč	[45]		H302,H317,H319
2,3-Diamino-2,3-dimethylbutan		UV-Vis 255	Sérum	[2]		H225-H304-H315-H336-H411
<i>trans</i> -4'-Hydrazino-2-stilbazol		Fluorescenční 401/544	Sérum, moč	[56]		H301-H318
1,2-Diamino-1,2-difenyloethan		UV-Vis 299-340	Sérum, moč	[1]		H315-H319-H335
4,5-Diaminoftal-hydrazid		Chemiluminiscence	Plazma	[50,51]		H315-H319-H335
3-Nitrofenyl-hydrazin		MS	Extrakt z myšního srdce	[58]		H302-H312-H315-H319-H332-H335

3.2.1.4 *ortho*-Fenylendiamin

Reakce OPD s 2-oxokyselinami poskytuje vysoce fluoreskující 2-chinoxalinové deriváty (obrázek 16). Deriváty se detekují při emisní vlnové délce 410 nm, excitační vlnová délka je 350 nm. OPD je citlivý na světlo a může snadno oxidovat, přičemž vedlejší produkty oxidovaného OPD mohou negativně ovlivnit analýzu, protože jeho deriváty eluují v podobných retenčních časech jako deriváty neoxidovaného OPD. V některých studiích [35] k roztoku OPD přidávali z důvodu stabilizace také redukční činidlo 2-merkptoethanol. Nejčastěji se OPD připravuje v prostředí 3mol/l nebo 2mol/l kyseliny chlorovodíkové. Podmínky inkubace se mezi jednotlivými autory liší, uvádí se 60 nebo 20 minut při teplotě 80 °C [3, 34, 35].

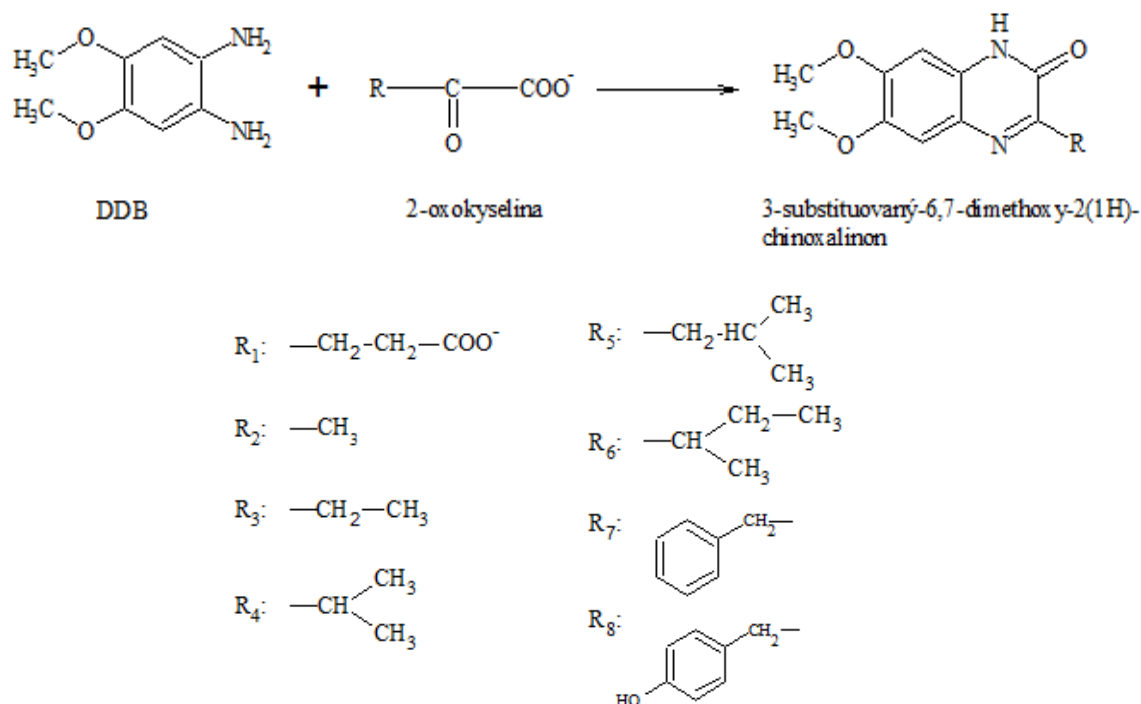


Obrázek 16 Reakce *ortho*-fenylendiaminu (OPD) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu

3.2.1.5 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzen

Původně byl 4,5-dimethoxy-1,2-diaminobenzen (DDB) používán hlavně pro derivatizaci aromatických aldehydů. Poté se zjistilo, že reakcí s 2-oxokyselinami (obrázek 17) poskytuje také fluoreskující deriváty. Vzniklé deriváty jsou detekovány fluorescenčním detektorem, excitační vlnová délka je 362 nm a emisní vlnová délka je 450 nm. Roztok derivatizačního činidla se připravuje v prostředí 0,5mol/l kyseliny chlorovodíkové a 2-merkptoethanolu. 2-Merkptoethanol se v roztoku DDB využívá jako stabilizátor, jedná se o redukční činidlo. Pokud by nebyl přítomen, reakční směs by se zbarvila dočervena. Deriváty je

možné detekovat již po inkubaci při teplotě nad 37 °C, přičemž maximálních hodnot intenzity fluorescence u modelové sloučeniny se dosahovalo při teplotě 100 °C (2,5 hodiny). Také pokud se po derivatizaci upraví pH roztoku na 6,6-8,0, intenzita fluorescence vzniklých derivátů je mnohem vyšší. Deriváty byly stabilní minimálně po dobu 5 hodin na denním světle při laboratorní teplotě [39, 40].

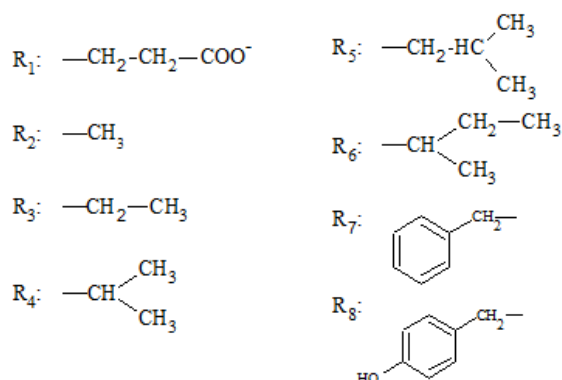
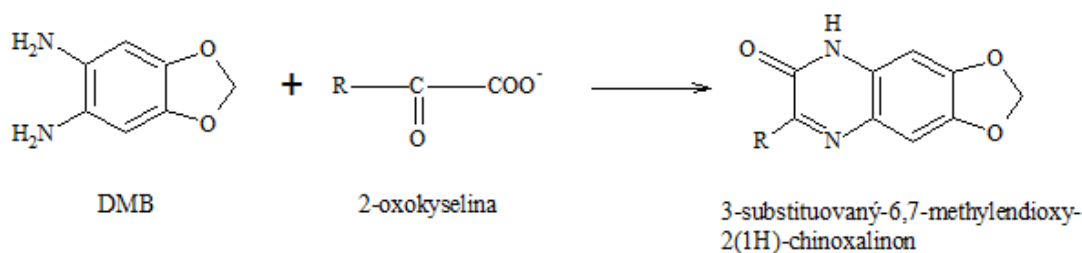


Obrázek 17 Reakce 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenu (DDB) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu

3.2.1.6 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzen

1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzen (DMB) je derivatizační činidlo, které reaguje s 2-oxokyselinami (obrázek 18) za vzniku fluoreskujících derivátů. Ve studiích [49, 59] se uvádí, že citlivost HPLC metody s využitím DMB je vyšší oproti ostatním používaným derivatizačním činidlům, OPD a DDB. Při excitaci 367 nm [49] nebo 365 nm [59], jsou deriváty s DMB detekovány při emisní vlnové délce 445 nm. DMB se připravuje v prostředí kyseliny chlorovodíkové, dá se použít i kyselina sírová, ale DMB se v ní špatně rozpouští. Pro stabilizaci se do roztoku přidává 2-merkapt ethanol a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, aby se zabránilo oxidaci činidla. Pokud by se k roztoku DMB redukční činidla nepřidala, roztok reakční směsi by se zabarvil, jako v případě DDB, dočervena, což by ovlivnilo analýzu. Takto ošetřený roztok DMB je použitelný po dobu minimálně 2 týdnů, i když je skladován při pokojové teplotě na denním světle. 2-Oxokyseliny reagují s DMB pouze v kyselém prostředí. Na rozdíl od OPD

se používají nižší koncentrace kyseliny chlorovodíkové. Optimální koncentrace kyseliny chlorovodíkové se pohybuje okolo 0,35-0,5 mol/l. Pokud by byla koncentrace kyseliny chlorovodíkové 0,9 mol/l a vyšší, došlo by při derivatizaci ke vzniku sraženiny. Úpravou pH reakční směsi na hodnotu 6,6-7,4 dosáhneme v případě pyruvátu vyšší intenzity fluorescence [59]. Intenzita fluorescence je také ovlivněna teplotou. Při nízké teplotě nebo dlouhotrvající inkubací při vyšších teplotách (např. 100 °C po dobu 100 min, nebo 30 min při 110 °C) se intenzita fluorescence snižuje, navíc v druhém případě vzniká sraženina. V obou studiích optimalizovali inkubaci, nejlepších výsledků dosáhli, když směs byla inkubována při 100 °C po dobu 50 minut [49, 59]. Wang a kol. [59] využili toto činidlo při stanovení 2-oxokyselin v séru a moči. Upozorňují na to, že se jim nepodařilo detekovat v séru fenylpyruvát, 2-oxokapronát, který se používá jako vnitřní standard, byl jen s obtížemi detekován.



Obrázek 18 Reakce 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzenu (DMB) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu

3.3 Plynová chromatografie

Další běžně používaná metoda pro stanovení 2-oxokyselin v biologických vzorcích je plynová chromatografie [60]. K detekci se využívá plamenově ionizační, nebo hmotnostní detektor. Jak již bylo zmíněno u HPLC metody, při stanovení 2-oxokyselin je i v případě plynové chromatografie nutná derivatizace. 2-Oxokyseliny se převádějí na dostatečně těkavé a méně polární deriváty. Rozlišujeme tři hlavní skupiny derivatizačních reakcí pro plynovou chromatografii [61, 62].

Jednou z nich je alkylace, jejímž principem je esterifikace, tudíž reakce kyseliny s alkoholem za vzniku esteru. Tento způsob derivatizace se využívá jako první krok, který předchází následným derivatizacím nebo slouží k ochraně aktivních vodíků v -OH, -SH, -COOH nebo -NH₂ skupin. Alkylace se nejčastěji využívá při derivatizaci organických kyselin, můžeme ji také využít i při derivatizaci etherů, thioetherů nebo thioesterů, amidů a sulfoamidů. Nejčastěji používanými derivatizačními činidly jsou fluorid boritý v methanolu nebo butanolu, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin, benzylbromid aj. [61].

Druhou derivatizační reakcí je acylace. Principem je zavedení acylové skupiny do sloučeniny na místo aktivního vodíku v polárních skupinách, čímž ovlivníme její stabilitu. Reakcí vznikají těkavější deriváty, estery, thioestery nebo amidy. Mezi acylační činidla patří např. 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol [61].

Posledním typem derivatizační reakce je silylace. Tato metoda převládá nad výše zmíněnými postupy z důvodu vyšší stability derivátů a jejich vyšší těkavosti. Při této reakci se snažíme zavést silylovou skupinu na místo aktivního vodíku polárních funkčních skupin, čímž snížíme polaritu stanovované sloučeniny. Reakcí silylačních činidel, jako jsou N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid nebo N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid a trimethylsilylimidazol, vznikají odpovídající trimethylsilyl-(TMS) deriváty [61].

3.4 Elektroforetické stanovení 2-oxokyselin

Podobně jako u chromatografických metod, byla první použitou elektroforetickou metodou papírová elektroforéza. Po separaci byly 2-oxokyseliny převáděny na 2,4-dinitrofenylhydrazonové deriváty. Separace pyruvátu a 2-oxoglutarátu tehdy trvala 4-5 hodin. Papírová elektroforéza byla využívána pro stanovení 2-oxokyselin v moči a krvi. Tato metoda nevyžadovala deproteinaci, odsolovací nebo extrakční kroky před analýzou [65-67].

Další elektroforetickou metodou pro stanovení 2-oxokyselin se uvádí kapilární zónová elektroforéza (CZE). Má řadu výhod. Umožňuje rychlou a vysoce účinnou separaci. Spotřeba

vzorku a použitých reagensí je malá. Elektroforetická separace je ovlivněna teplotou kapiláry spolu s pH použitého pufru, sloužícího jako elektrolyt [68,69].

Obvykle se vzorek vnáší k anodě, zatímco detekce probíhá na katodě, protože vlivem elektroosmotického toku (EOF) se kladně nabitě molekuly pohybují směrem od kladně nabitě elektrody k záporně nabitě. Separace aniontů některých anorganických kyselin a karboxylových kyselin s krátkým řetězcem probíhá s využitím tzv. reverzního EOF, kdy kationický surfaktant zablokuje negativní náboj na povrchu kapiláry a vytvoří se dvojitá vrstva s pozitivním nábojem. Reverzní EOF pak proudí stejným směrem, jako látky s negativním nábojem [68,69].

Látky neobsahující žádné chromofory a fluorofory, je třeba před analýzou derivatizovat, abychom zvýšili citlivost detekce. Je možná jak nepřímá detekce, tak i přímá. Pro karboxylové kyseliny je typické, že v UV oblasti absorbují jen slabě, proto se častěji využívá nepřímá metoda stanovení, kdy jsou v elektrolytu látky silně absorbující v UV oblasti.

Shirao a kol. [68] ve své práci stanovili CZE různé organické kyseliny, jako jsou pyruvát, 2-oxoglutarát, acetát, laktát, isovalerát, citrát, sukcinát, formiát a kyselina hippurová, v moči. Organické kyseliny detegovali při vlnové délce 185 nm a jako derivatizační činidlo použili 2-nitrofenylhydrazin. Popisují, že stanovení organických kyselin v moči bylo obtížnější, z důvodu přítomnosti většího množství interferujících látek ve vzorcích a také výskytu precipitátu. Další studie z roku 1995 [71] popisuje nepřímou UV detekci organických kyselin v séru, kdy analýza trvala 12 minut. Jiná studie [70] využila bezkontaktní vodivostní a UV detekci pro stanovení 29 organických kyselin v moči, uvádí také, že je možné tyto látky detegovat hmotnostním spektrometrem. Tato metoda je však drahá a navíc je omezena pouze na nepřímou detekci využívající absorpci UV záření elektrolytem.

CZE je metoda používaná jen minoritně při analýze 2-oxokyselin. Zatím nebyla zveřejněna žádná studie zabývající se simultánním stanovením 2-oxokyselin v krvi, moči nebo jiném biologickém materiálu.

3.5 Stanovení aminokyselin

Pro lidské tělo je důležitých 21 základních kódovaných α -L-aminokyselin, jejichž kondenzací vznikají proteiny. Všechny α -aminokyseliny, s výjimkou prolinu, mají karboxylovou a primární aminoskupinu na druhém uhlíku, který je označován jako α . Díky své chiralitě se jedná o opticky aktivní látky, kromě glycinu, který má na svém α uhlíku

navázané dva atomy vodíku. Struktura a vlastnosti proteinů jsou dány pořadím jednotlivých aminokyselin v řetězci. Aminokyseliny v podobě proteinů mají řadu funkcí, hormonálních, strukturních nebo katalytických. Jsou významnými prekurzory pro syntézu dusíkatých bazí, jako jsou puriny a pyrimidiny, dále pak porfyrinů anebo peptidických hormonů [11,72]. Genetické poruchy v metabolismu aminokyselin vedou k vzácným vrozeným onemocněním. Koncentrace volných aminokyselin v biologických vzorcích krve, moči nebo cerebrospinální tekutině slouží jako biochemické ukazatele novorozeneckých metabolických poruch [73].

Aminokyseliny jsou v dnešní době nejčastěji stanoveny separačními technikami. Nejvyužívanější je kapalinová chromatografie na obrácených fázích s fluorescenční, hmotnostní nebo UV-detekcí [73], také se využívá plynová chromatografie [74, 75], anebo kapilární elektroforéza [76].

Aminokyseliny jsou amfolyty [11], prakticky neabsorbují v UV oblasti, ani přirozeně nefluoreskují, s výjimkou tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu. Z tohoto důvodu je důležité je převést na deriváty, které budeme schopni detekovat [73]. Aminokyseliny se mohou stanovovat jak derivatizované, tak nederivatizované. Nederivatizované aminokyseliny se separují iontově výměnnou chromatografií a detegují například elektrochemickým nebo hmotnostním detektorem. Derivatizace aminokyselin může probíhat před, nebo po separaci [47,77].

Derivatizační činidla používaná pro analýzu aminokyselin metodou HPLC jsou například ninhydrin [47], dansylchlorid [78], *ortho*-ftalaldehyd, fluoreskamin [47], naftalen-2,3-dikarboxaldehyd [79, 80] nebo 4-fluor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol [76].

3.6 Referenční hodnoty vybraných aminokyselin a od nich odvozených 2-oxokyselin

Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin a aminokyselin v plné krvi zdravého člověka (nad 18 let věku) jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4 Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plné krvi.

2-OXOKYSELINA	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Zdroj
2-Oxoglutarát	$8,9 \pm 2,7$	[81]
Pyruvát	22,0 – 258,0	[81]
2-Oxobutyrate	$3,3 \pm 5,0$	[83]
2-Oxoisovalerát	$11,0 \pm 1,7$	[81]
2-Oxoisokapronát	$33,5 \pm 8,2$	[81]
2-Oxo-3-methylvalerát	$22,7 \pm 4,6$	[81]
Fenylpyruvát	$0,5 \pm 0,1$	[84]
4-Hydroxyfenylpyruvát	$0,4 \pm 0,2$	[85]

Tabulka 5 Referenční hodnoty vybraných aminokyselin v plné krvi.

AMINOKYSELINY	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Zdroj
L-Glutamát	$33,5 \pm 3,2$	[86]
L-Glutamin	$492,6 \pm 93,6$	[82]
L-Alanin	259,0 – 407,0	[87]
L-2-aminomáselná kyselina	15,0 – 31,0	[87]
L-Valin	190,0 – 276,0	[87]
L-Leucin	$150,1 \pm 27,7$	[88]
L-Isoleucin	$84,0 \pm 18,0$	[81]
L-Fenylalanin	$78,1 \pm 20,5$	[82]
L-Tyrosin	$54,5 \pm 9,7$	[82]

4 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je zavést dostatečně citlivou a selektivní HPLC metodu s fluorescenční detekcí pro stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve s použitím derivatizačního činidla, které není karcinogenní.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 Biologický vzorek

5.1.1.1 Plná krev

Venózní krev byla odebrána dobrovolníkům z Katedry biologických a biochemických věd do 9ml odběrových zkumavek s K₃EDTA (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko) kvalifikovaným personálem. Krev byla použita pro přípravu směsných standardů aminokyselin a 2-oxokyselin. Připravené směsné standardy v plné krvi byly pipetovány na odběrovou kartu #903 (Whatman, Dassel, Německo). Po zaschnutí (asi 3-4 hodiny při laboratorní teplotě) byly vzorky suché kapky krve uchovány zabalené v polyethylenovém sáčku při teplotě -20 °C.

5.1.1.2 Suchá krevní skvrna

Kapka krve z prstu dobrovolníků byla kápnuta na odběrovou kartu #903. Další postup zpracování vzorku je uveden v kapitole 5.1.1.1.

5.1.2 Chemikálie

Acetonitril (C₂H₃N, w = 99,9%, M_r 41,05) p. a. (VWR Chemicals International, LLC, Radnor, PA, USA)

Dansylhydrazin (C₁₂H₁₅N₃O₂S, M_r 265,33) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Deionizovaná voda (H₂O, M_r 18,00; G = 0,055 μS)

1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzen, dihydrochlorid (C₈H₁₂N₂O₂ · 2 HCl, M_r 241,11) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzen, dihydrochlorid (C₇H₈N₂O₂ · 2 HCl, M_r 225,07) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Ethanol gradient grade pro kapalinovou chromatografii Lichrosolv[®] (C₂H₆O, w = 99,9 %, M_r 46,07) p. a. (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄, M_r 141,96) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim Německo)

Hydroxid draselný (KOH, M_r 56,11) p. a. (Lachema, Brno, ČR)

Hydroxid sodný (NaOH, M_r 40,00) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

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

Kyselina boritá (H_3BO_3 , M_r 61,83) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina chloristá (HClO_4 , $\rho = 1,664 \text{ g/cm}^3$, $w = 70,0 \%$, M_r 100,46) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina chlorovodíková (HCl , $\rho = 1,18 \text{ g/cm}^3$, $w = 36,6 \%$, M_r 36,45) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina 2-oxobutanová, sodná sůl ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NaO}_3$, M_r 124,07) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina 2-oxoglutarová, sodná sůl ($\text{C}_5\text{H}_5\text{NaO}_5$, M_r 168,08) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina 2-oxohexanová, sodná sůl ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_3$, M_r 152,13) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina 3-methyl-2-oxobutanová, sodná sůl ($\text{C}_5\text{H}_7\text{NaO}_3$, M_r 138,13) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim Německo)

Kyselina 3-methyl-2-oxopentanová, sodná sůl ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_3$, M_r 152,13) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$, M_r 180,16) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina 4-methyl-2-oxopentanová, sodná sůl ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_3$, M_r 152,13) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina fenylpyrohroznová, sodná sůl ($\text{C}_9\text{H}_7\text{NaO}_3$, M_r 186,14) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina pyrohroznová, sodná sůl ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$, M_r 110,04) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

ortho-Fenylendiamin, dihydrochlorid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2 \cdot 2 \text{ HCl}$, M_r 181,10) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2$, M_r 184,19) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

2-Merkaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, M_r 78,13) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyanid draselný (KCN , M_r 65,12) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Dithioničitan sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, M_r 174,11) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina trifluorctová ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$, M_r 114,03) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

L-Alanin ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$, M_r 89,09) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

L-2-Aminomáselná kyselina ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2$, M_r 103,12) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

L-Fenylalanin ($C_9H_{11}NO_2$, M_r 165,19) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
L-Glutamin ($C_5H_{10}N_2O_3$, M_r 146,15) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
L-Glutamová kyselina ($C_5H_9NO_4$, M_r 147,13) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
L-Isoleucin ($C_6H_{13}NO_2$, M_r 131,18) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
L-Leucin ($C_6H_{13}NO_2$, M_r 131,18) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
L-Norleucin ($C_6H_{13}NO_2$, M_r 131,17) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
L-Valin ($C_6H_{11}NO_2$, M_r 117,15) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

5.1.3 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy AdventurerTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
Automatické pipety Biohit (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)
Blokový termostat pro zkumavky SBH 130D (Stuart, Stone, Staffordshire, Velká Británie)
Centrifuga EPP-5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
Centriguga FrontierTM 5000 Series, FG5706-K (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
Filtreační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Filtreační papír na odběr krve, odběrová karta (Whatmann, GmbH, Dassel, Německo)
Hlubokomrazící box MDF-U-3086S (Panasonic, Osaka, Japonsko)
Lyofilizátor SCANVAC CoolSafeTM (Labogene APS, Allerød, Dánsko)
Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
 Vysokotlaká analytická čerpadla LC-20AD
 Autosampler SIL-20AC
 Termostat kolon CTO-20AC
 Odplynovač mobilní fáze DGU-20A
 Fluorescenční detektor RF-20A
 Řídicí systém CBM-20A
 Software LC solution (verze 1,25)
Analytická kolona LiChroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μ m, opatřená ochranou kolonou LiChroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μ m (Merck, KGaA, Darmstadt, Německo)
Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
Magnetické míchadlo (Heidolph Instruments, GmbH & KG, Schwabach, Německo)
Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 μ m (Sulpeco, Bellefonte, PA, USA)
Odběrové zkumavky s K_3EDTA , 9 ml, Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
Odměrné válce, kádinky, nálevka, odměrné baňky

Odpařovací zařízení Thermo Scientific, model TS-18825, Reacti-EVAP EVAPORATING UNIT (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

pH-metr inoLab, level 2, (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, Weilheim, Německo)

Polypropylenové (PP) zkumavky s víčkem typu eppendorf; 1,5 ml (Fisher Scientific, spol. s. r. o, Pardubice, ČR)

Předvážky Adventurer™ Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Pyrex zkumavky s teflonovým těsněním, 10 ml (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Velká Británie)

Rotační olejová vývěva CLASSIC VRO-4 (LAVAT, a.s., Radim u Kolína, ČR)

Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, spol. s. r. o, Pardubice, ČR)

Spin-X® centrifugační zkumavky opatřené nylonovým filtrem o porozitě 0,22 µm (Corning, NY, USA)

Termoblok Thermo Fisher Scientific, model 18821 REACTI-THERM™ HEATING/STIRRING MODULE (Thermo Fisher Scientific, High Point, NC, USA)

Ultrazvuková čistička ECOSON (ECOSON, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)

Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)

Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

5.1.4 Pracovní roztoky

Deionizovaná voda

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu\text{S}$) byla vyráběna zařízením na úpravu vody Smart2pure. Voda byla filtrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 µm.

Roztok kyseliny chlorovodíkové (asi 1mmol/l) pro přípravu a ředění standardů 2-oxokyselin

Roztok byl připraven zředěním 84 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové (asi 11,95mol/l) deionizovanou vodou na konečný objem 1 l.

Zásobní roztok pyruvátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0134 g pyruvátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok fenylpyruvátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0245 g fenylpyruvátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 4-hydroxyfenylpyruvátu (asi 500μmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0221 g fenylpyruvátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 2-oxoglutarátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0212 g 2-oxoglutarátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 2-oxoisovalerátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0187 g 2-oxoisovalerátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 2-oxo-3-methylvalerátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0189 g 2-oxo-3-methylvalerátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 2-oxoisokapronátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0206 g 2-oxoisokapronátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 2-oxobutyátu (asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0158 g 2-oxobutyátu v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok 2-oxokapronové kyseliny (vnitřní standard, asi 5mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0158 g 2-oxokapronové kyseliny v 25 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava směsného standardu 2-oxokyselin, včetně vnitřního standardu (asi 50 μ mol/l)

Směsný standard 2-oxokyselin o objemu 10 ml byl připraven následovně. Do 10ml odměrné baňky bylo postupně pipetováno 100 μ l zásobních roztoků PYR, PPYR, 2-OB, 2-KG, KIV, KMV, KIC, 2-OB a 2-KH (asi 5mmol/l) a 1 ml 4-OH-PPYR (500 μ mol/l). Poté byl roztok směsného standardu doplněn deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml. Roztok směsného standardu byl připravován buď čerstvý, nebo byl uchován při -20 °C v 1ml alikvotách maximálně po dobu 1 týdne.

Příprava směsného standardu 2-oxokyselin, včetně vnitřního standardu, bez 4-OH-PPYR a 2-KG (asi 50 μ mol/l)

Směsný standard 2-oxokyselin o objemu 10 ml byl připraven následovně. Do 10ml odměrné baňky bylo postupně pipetováno 100 μ l zásobních roztoků PYR, PPYR, 2-OB, KIV, KMV, KIC, 2-OB a 2-KH (asi 5mmol/l). Poté byl roztok směsného standardu doplněn deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml. Roztok směsného standardu byl připravován buď čerstvý, nebo byl uchován při -20 °C v 1ml alikvotách maximálně po dobu 1 týdne.

Příprava roztoku vnitřního standardu (asi 200 μ mol/l)

Roztok o objemu 5 ml byl připraven naředěním 200 μ l 2-oxokapronové kyseliny (asi 5mmol/l) v 4800 μ l deionizované vody.

Příprava jednotlivých standardů 2-oxokyselin a vnitřního standardu (asi 100 μ mol/l)

Asi 100 μ mol/l roztoky jednotlivých 2-oxokyselin o objemu 10 ml byly připraveny následujícím způsobem. Do 10ml odměrné baňky bylo pipetováno 200 μ l zásobního roztoku (PYR, PPYR, 2-OB, 2-KG, KIV, KMV, KIC, 2-OB a 2-KH) nebo 2 ml 4-OH-PPYR. Poté byl roztok jednotlivého standardu doplněn deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml. Roztok směsného standardu byl připravován buď čerstvý, nebo byl uchován při -20 °C v 1ml alikvotách maximálně po dobu 1 týdne.

Příprava roztoku vnitřního standardu 2-oxokapronové kyseliny (asi 10 μ mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 100 μ l pracovního roztoku 2-oxokapronové kyseliny (asi 100 μ mol/l) v 900 μ l deionizované vody.

Příprava roztoku vnitřního standardu 2-oxokapronové kyseliny (asi 5 μ mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 50 μ l pracovního roztoku 2-oxokapronové kyseliny (asi 100 μ mol/l) v 950 μ l deionizované vody.

Příprava roztoku kyseliny chloristé (asi 1mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 85 μ l koncentrované kyseliny chloristé (11,59mol/l) 915 μ l deionizované vody.

Příprava roztoku kyseliny chloristé (asi 6,3mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 2 ml koncentrované kyseliny chloristé 2 ml deionizované vody.

Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové (asi 1mol/l)

Roztok byl připraven zředěním 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové 11 ml deionizované vody.

Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové (asi 100mmol/l)

Roztok byl připraven zředěním 100 μ l 1mol/l kyseliny chlorovodíkové 900 μ l deionizované vody.

Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové (asi 10mmol/l)

Roztok byl připraven zředěním 100 μ l 100mmol/l kyseliny chlorovodíkové 900 μ l deionizované vody.

Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové (asi 1mmol/l)

Roztok byl připraven zředěním 100 μ l 10mmol/l kyseliny chlorovodíkové 900 μ l deionizované vody.

Příprava roztoku hydroxidu draselného (asi 1mmol/l)

Navážka 0,11 g KOH byla rozpuštěna v 250 ml deionizované vody. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 640 μ l do 5ml odměrné baňky a poté roztok doplněn deionizovanou vodou na konečný objem 5 ml.

Příprava asi 10% (v/v) roztoku ethanolu ve vodě

Roztok byl připraven smícháním 100 µl 100% ethanolu s 900 µl deionizované vody.

Příprava asi 25% (v/v) roztoku ethanolu ve vodě

Roztok byl připraven smícháním 250 µl 100% ethanolu se 750 µl deionizované vody.

Příprava směšného standardu 2-oxokyselin ve fyziologickém roztoku

Ze zásobních roztoků jednotlivých 2-oxokyselin o koncentraci asi 5 mmol/l (PYR, PPYR, 2-KG, KIC, KIV, KMV a 2-OB) a 500 µmol/l (4-OH-PPYR) byl připraven směšný standard pipetováním 500 µl PYR, 10 µl PPYR, 50 µl KIV, 100 µl KMV, 100 µl KIC, 50 µl 2-OB, 50 µl 2-KG, 50 µl 4-OH-PPYR a 90 µl 9,4% roztoku chloridu sodného.

Příprava směšného standardu 2-oxokyselin ve fyziologickém roztoku bez 4-OH-PPYR a 2-KG

Ze zásobních roztoků jednotlivých 2-oxokyselin o koncentraci asi 5 mmol/l (PYR, PPYR, KIC, KIV, KMV a 2-OB) byl připraven směšný standard pipetováním 500 µl PYR, 10 µl PPYR, 50 µl KIV, 100 µl KMV, 100 µl KIC, 50 µl 2-OB, 90 µl 9,4% roztoku chloridu sodného a 100 µl deionizované vody.

Příprava směšného standardu 2-oxokyselin ve fyziologickém roztoku bez 4-OH-PPYR a PPYR

Ze zásobních roztoků jednotlivých 2-oxokyselin o koncentraci asi 5 mmol/l (PYR, 2-KG, KIC, KIV, KMV a 2-OB) byl připraven směšný standard pipetováním 500 µl PYR, 50 µl 2-KG, 50 µl KIV, 100 µl KMV, 100 µl KIC, 50 µl 2-OB, 90 µl 9,4% roztoku chloridu sodného a 60 µl deionizované vody.

Příprava asi 9,4% roztoku chloridu sodného

Navážka 0,47 g chloridu sodného byla rozpuštěna v 4,5 ml deionizované vody.

Příprava fyziologického roztoku (asi 0,85% roztok chloridu sodného)

Fyziologický roztok byl připraven zředěním 90 µl 9,4% roztoku chloridu sodného 910 µl deionizované vody.

Příprava nesrážlivé krve s přidavkem fyziologického roztoku

K 4,5 ml nesrážlivé krve bylo pipetováno 500 μ l fyziologického roztoku (asi 0,85% roztok chloridu sodného).

Příprava roztoku *ortho*-fenylendiaminu (asi 25mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,2773 g *ortho*-fenylendiaminu v 25 ml deionizované vody. Poté bylo opatrně přidáno 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (11,95mol/l). Roztok byl promíchán a následně bylo přidáno 25 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava roztoku *ortho*-fenylendiaminu (asi 5,5mmol/l) se stabilizátory, 2-merkptoethanolem a dithioničitanem sodným

Derivatizační činidlo bylo připraveno následujícím způsobem. V 5 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 0,0487 g dithioničitanu sodného. Po úplném rozpuštění dithioničitanu sodného bylo přidáno 590 μ l koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 0,7 ml 2-merkptoethanolu (asi 14,3mol/l). Poté byla směs doplněna deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml. V takto připravené směsi byla rozpuštěna navážka 10 mg *ortho*-fenylendiaminu. Derivatizační činidlo bylo uchováváno při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava derivatizačního činidla 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenu (asi 4,1mmol/l)

Derivatizační činidlo bylo připraveno následujícím způsobem. V 5 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 0,0487 g dithioničitanu sodného. Po úplném rozpuštění dithioničitanu sodného bylo přidáno 590 μ l koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 0,7 ml 2-merkptoethanolu (asi 14,3mol/l). Poté byla směs doplněna deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml. V takto připravené směsi byla rozpuštěna navážka 10 mg 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenu. Derivatizační činidlo bylo uchováváno při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava derivatizačního činidla 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenu (asi 4,4mmol/l)

Derivatizační činidlo bylo připraveno následujícím způsobem. V 5 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 0,0487 g dithioničitanu sodného. Po úplném rozpuštění dithioničitanu sodného bylo přidáno 590 μ l koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 0,7 ml 2-merkptoethanolu (asi 14,3mol/l). Poté byla směs doplněna deionizovanou vodou na

konečný objem 10 ml. V takto připravené směsi byla rozpuštěna navážka 10 mg 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenu. Derivatizační činidlo bylo uchováno při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava asi 0,1% roztoku dansylhydrazinu

Navážka 10 mg dansylhydrazinu byla rozpuštěna v 10 ml 100% ethanolu. Roztok byl uchován při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava asi 4mol/l kyseliny chlorovodíkové

Roztok byl připraven zředěním 100 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové 200 µl deionizované vody.

Příprava asi 5% kyseliny trifluoroctové

Roztok kyseliny trifluoroctové byl připraven následujícím způsobem. K 4,75 ml 100% acetonitrilu bylo přidáno 250 µl zásobního roztoku kyseliny trifluoroctové. Roztok byl uchován při 4 °C.

Příprava asi 0,75% kyseliny trifluoroctové

Roztok asi 0,75% kyseliny trifluoroctové byl připraven zředěním 300 µl 5% kyseliny trifluoroctové 1,7 ml 100% acetonitrilu. Roztok byl uchován při 4 °C.

Mobilní fáze A [25% (v/v) ethanol v deionizované vodě]

Mobilní fáze A byla připravena smícháním 250 ml 100% ethanolu se 750 ml deionizované vody. Poté byla mobilní fáze přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 µm a následně odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze B (100% ethanol)

Jeden litr 100% ethanolu byl přefiltrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 µm a následně odvzdušněn v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze A [20% (v/v) acetonitril v 25mmol/l hydrogenfosforečnanu sodném; pH = 7,2]

Mobilní fáze A byla připravena následujícím způsobem. Navážka 1,42 g hydrogenfosforečnanu sodného byla rozpuštěna ve 400 ml deionizované vody. Po úplném

rozpuštění bylo k roztoku přidáno 100 ml 100% acetonitrilu. Poté bylo upraveno pH mobilní fáze na hodnotu 7,2 6mol/l kyselinou chlorovodíkovou. Takto připravená mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm a následně odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze B (100% acetonitril)

Půl litru 100% acetonitrilu bylo přefiltrováno skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm a následně odvzdušněn v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze A [25% (v/v) acetonitril v deionizované vodě]

Mobilní fáze A byla připravena smícháním 250 ml 100% acetonitrilu se 750 ml deionizované vody. Poté byla mobilní fáze přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm a následně odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Zásobní roztok 2-aminomáselné kyseliny (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0242 g 2-aminomáselné kyseliny v 25 ml deionizované vody a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok alaninu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0237 g alaninu v 25 ml deionizované vody a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok glutaminu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0385 g glutaminu v 25 ml deionizované vody a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok kyseliny glutamové (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0380 g kyseliny glutamové v 25 ml deionizované vody a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok isoleucinu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0321 g isoleucinu v 25 ml deionizované vody a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok leucinu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0342 g leucinu v 25 ml deionizované vody a uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu norleucinu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0317g norleucinu v 25 ml deionizované vody a uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok valinu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0288 g valinu v 25 ml deionizované vody a uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok fenylalaninu (asi 10mmol/l)

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0413 g fenylalaninu v 25 ml deionizované vody a uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Příprava směsného standardu aminokyselin a vnitřního standardu (asi 100μmol/l)

Směsný standard osmi aminokyselin a vnitřního standardu byl připraven následovně. Do 10ml odměrné baňky bylo pipetováno 100 μl jednotlivých zásobních roztoků výše zmíněných aminokyselin (asi 10mmol/l). Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml.

Příprava směsného standardu aminokyselin ve fyziologickém roztoku

Směsný standard aminokyselin ve fyziologickém roztoku byl připraven rozpuštěním navážek 0,0930 g kyseliny glutamové, 0,4850 g glutaminu, 0,2051 g alaninu, 0,1152 g kyseliny 2-aminomáselné, 0,1571 g valinu, 0,0899 g isoleucinu, 0,0902 g fenylalaninu a 0,0928 g leucinu v 250 ml fyziologického roztoku. Koncentrace jednotlivých aminokyselin byly následující: 2528 μmol/l kyseliny glutamové, 13274 μmol/l glutaminu, 9209 μmol/l alaninu, 4469 μmol/l kyseliny 2-aminomáselné, 5364 μmol/l valinu, 2741 μmol/l isoleucinu, 2184 μmol/l fenylalaninu a 2830 μmol/l leucinu. Jeden díl takto připraveného směsného standardu byl smíchán s 9 díly plné krve.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu norleucinu asi v 100% ethanolu (asi 10 μ mol/l)

Pracovní roztok norleucinu byl připraven zředěním 25 μ l zásobního roztoku (asi 10mmol/l) v 25 ml 100% ethanolu.

Příprava 0,1mol/l borátového pufru o pH asi 9,3

Navážka 0,19 g kyseliny borité byla rozpuštěna v 50 ml deionizované vody. Poté bylo pH roztoku upraveno 6mol/l hydroxidem sodným na hodnotu 9,3. Takto připravený borátový pufr byl přefiltrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 μ m a uchováván při 4 °C.

Příprava roztoku kyanidu draselného (asi 40mmol/l)

Navážka 0,005 g kyanidu draselného byla rozpuštěna ve 2 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při 4 °C.

Příprava derivatizačního činidla naftalen-2,3-dikarboxaldehydu (asi 1%)

Navážka 0,0300 g byla rozpuštěna ve 30 ml 100% ethanolu. Roztok byl uchováván při -80 °C v 1ml alikvotách.

Mobilní fáze A [5% (v/v) acetonitril v 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodném; pH 7,2]

Navážka 1,35 g hydrogenfosforečnanu sodného byla rozpuštěna v 950 ml deionizované vody. Po úplném rozpuštění hydrogenfosforečnanu sodného bylo přidáno 50 ml acetonitrilu. Poté bylo pH mobilní fáze upraveno 6mol/l kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,2. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μ m a následně odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze B [65% (v/v) acetonitril v 10mmol/l hydrogenfosforečnanu sodném; pH 7,2]

Navážka 0,5 g hydrogenfosforečnanu sodného byla rozpuštěna v 350 ml deionizované vody. Po úplném rozpuštění hydrogenfosforečnanu sodného bylo přidáno 650 ml acetonitrilu. Poté bylo pH mobilní fáze upraveno 6mol/l kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,2. Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μ m a následně odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

5.2 Příprava vzorku suché kapky krve

Místo vpichu (prst ruky) bylo vydezinfikováno septonexem. Vpich byl proveden lancetou z prokrveného místa, což bylo dosaženo účinkem teplé vody. Po vpichu byla první kapka krve setřena buničinou. Po vytvoření další velké kapky krve, se k ní zlehka přiložil filtrační papír typu Whatman #903. Krev byla jediným přiložením prosáknuta tak, aby vyplnila předtěstěný kruh. Vzorky krve byly sušeny při laboratorní teplotě po dobu 3-4 hodin. Odběrové karty byly do doby zpracování uchovávány v PE sáčcích při -20 °C, maximálně po dobu 3 měsíců.

Při zpracování vzorku suché kapky krve byl ze středu krevní skvrny vyražen terčík o průměru 6 mm, což odpovídá přibližně 10 µl plné krve.

5.3 Příprava směšného standardu 2-oxokyselin v plné krvi

Zředěním 200 µl směšného standardu 2-oxokyselin ve fyziologickém roztoku (PYR, PPYR, KIV, KMV, KIC, 2-OB) s 1,8 ml nesrážlivé krve byl připraven směšný standard 2-oxokyselin s nejvyšší koncentrací (S₅). Ředěním směšného standardu S₅ nesrážlivou krví ve fyziologickém roztoku (9:1, v/v) byly připraveny směšné standardy S₁-S₄ (tabulka 6).

Tabulka 6 Koncentrace jednotlivých 2-oxokyselin ve směšných standardech

2-Oxokyseliny	S ₅ c (µmol/l)	S ₄ c (µmol/l)	S ₃ c (µmol/l)	S ₂ c (µmol/l)	S ₁ c (µmol/l)
PYR	487,1	243,5	97,4	48,7	24,4
PPYR	5,3	2,6	1,1	0,5	0,3
4-OH-PPYR	2,5	1,2	0,5	0,2	0,1
2-KG	50,4	25,2	10,1	5,0	2,5
KIV	54,2	27,1	10,8	5,4	2,7
KMV	99,4	49,7	19,9	9,9	5,0
KIC	108,3	54,2	21,7	10,8	5,4
2-OB	50,9	25,5	10,2	5,1	2,5

Směšné standardy 2-oxokyselin (S₁-S₄) byly připraveny podle tabulky 7. Jako standard S₀ byla použita nesrážlivá krev ve fyziologickém roztoku (9:1, v/v).

Tabulka 7 Příprava směsných standardů pro sestavení kalibrační křivky

Vzorek	S ₅ (μl)	Krev ve fyziol. roztoku (μl)	Ředění
S ₄	500	500	2x
S ₃	200	800	5x
S ₂	100	900	10x
S ₁	50	950	20x

Připravené směsné standardy byly aplikovány buď na čistý filtrační papír typu Whatman #903 nebo filtrační papír, kde předtím byl do středu předtíštěného kruhu pipetován vnitřní standard (2 μl 2-oxokapronové kyseliny). Další postup byl stejný jako v kapitole 5.2.

5.4 Příprava směsného standardu aminokyselin v plné krvi

Zředěním 100 μl směsného standardu aminokyselin ve fyziologickém roztoku (2-AB, Glu, Gln, Ala, Val, Leu, Ile a Phe) s 900 μl nesrážlivé krve byl připraven směsný standard aminokyselin s nejvyšší koncentrací (S₅). Další postup je stejný jako v kapitole 5.3 (tabulka 8 a 9).

Tabulka 8 Koncentrace jednotlivých aminokyselin ve směsných standardech

Aminokyseliny	S ₅ (μmol/l)	S ₄ (μmol/l)	S ₃ (μmol/l)	S ₂ (μmol/l)	S ₁ (μmol/l)
Glu	252,2	126,4	50,6	25,3	12,6
Gln	1327,4	663,7	265,5	132,7	66,4
Ala	920,9	460,4	14,2	92,1	46,0
2-AB	446,9	223,4	89,4	44,7	22,3
Val	536,4	268,2	107,3	53,6	26,8
Ile	274,1	137,1	54,8	27,4	13,7
Phe	218,4	109,2	43,7	21,8	10,9
Leu	283,0	141,5	56,6	28,3	14,1

Tabulka 9 Příprava směsných standardů pro sestavení kalibrační křivky

Vzorek	S ₅ (μl)	Krev ve fyziol. roztoku (μl)	Ředění
S ₄	100	100	2x
S ₃	50	200	5x
S ₂	20	180	10x
S ₁	20	380	20x

5.5 Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci *ortho*-fenylendiaminem

Jedná se o tzv. „zlatý standard“ stanovení 2-oxokyselin v biologických vzorcích.

5.5.1 Derivatizace jednotlivých standardů 2-oxokyselin a 2-oxokyselin ve směsném standardu

V 1,5ml PP zkumavkách bylo smícháno 200 μl roztoku směsného standardu jednotlivých 2-oxokyselin (bez 4-OH-PPYR a 2-KG), o koncentraci asi 50 μmol/l, s 200 μl derivatizačního činidla, OPD. Jednotlivé standardy 2-oxokyselin, o koncentraci asi 100 μmol/l, byly připraveny stejným způsobem. Po promíchání byla směs inkubována 30 minut při 55 °C. Po ochlazení byla směs převedena do skleněných vialek.

5.5.2 Optimalizace množství derivatizačního činidla

Celkem do pěti skleněných vialek bylo pipetováno 250 μl PYR (asi 500μmol/l) a různý objem derivatizačního činidla. Směs byla inkubována 30 minut při teplotě 55 °C.

- 250 μl PYR + 250 μl OPD
- 250 μl PYR + 50 μl H₂O + 200 μl OPD
- 250 μl PYR + 100 μl H₂O + 150 μl OPD
- 250 μl PYR + 150 μl H₂O + 100 μl OPD
- 250 μl PYR + 200 μl H₂O + 50 μl OPD

5.5.3 Lyofilizace roztoku směšného standardu 2-oxokyselin v 1mmol/l kyselině chlorovodíkové

Byl zkoumán vliv procesu lyofilizace na stabilitu 2-oxokyselin. Byl lyofilizován směšný standard 2-oxokyselin v 1mmol/l kyselině chlorovodíkové (5 sad o objemu 450 µl). Lyofilizát byl rozpuštěn ve 450 µl 1mmol/l kyselině chlorovodíkové a zpracován, jak je uvedeno v kapitole 5.5.1.

5.5.4 Výběr vhodného činidla pro extrakci 2-oxokyselin ze suché kapky krve

Byla testována tato extrakční činidla: 1mol/l, 100mmol/l, 10mmol/l a 1mmol/l kyselina chlorovodíková, 1mmol/l hydroxid draselný, 10% a 25% (v/v) ethanol ve vodě a 100% ethanol. Vyražený terčík suché kapky krve byl převeden do 1,5ml PP zkumavky a bylo k němu přidáno 150 µl elučního činidla. Vzorky byly zpracovány v duplikátu. Extrakce probíhala 60 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi pipetováno 50 µl 6,3mol/l kyseliny chloristé a následně byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, 4430 x g, laboratorní teplota). Supernatant (150 µl) byl převeden do 1,5ml PP zkumavky a bylo k němu přidáno 150 µl derivatizačního činidla. Další postup byl stejný jako v kapitole 5.5.1. Po zchlazení byla směs za použití centrifugace (5 minut, 4430 x g, laboratorní teplota) přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,22 µm a převedena do skleněných vialek. Při extrakci 100% ethanolom bylo k terčíku suché kapky krve přidáno 500 µl ethanolu, po šedesátiminutové inkubaci při laboratorní teplotě byla směs odstředěna (5 minut, 4430 x g, laboratorní teplota) a 450 µl supernatantu bylo převedeno do zkumavky. Ethanol byl odpařen v atmosféře dusíku o čistotě 4,6 (Linde Gas a. s., Pardubice). K odparku bylo přidáno 200 µl derivatizačního činidla a další postup byl stejný jako v případě použití ostatních extrakčních činidel.

5.5.5 Chromatografické podmínky

mobilní fáze A:	25% (v/v) acetonitril v deionizované vodě
mobilní fáze B:	100% acetonitril
kolona:	LichroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm, opatřená ochrannou kolonou LichroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm
průtok mobilní fáze:	0,5 ml/min
dávkovaný objem:	10 µl
teplota kolony:	37 °C
autosampler:	4 °C

fluorescenční detektor:	λ (excitace) = 350 nm
	λ (emise) = 410 nm
	citlivost střední
	zesílení $\times 16$
časový program:	gradientová eluce, doba analýzy 22 minut
	0,00 min, 2 % B
	3,00 min, 2 % B
	3,01 min, 35 % B
	13,00 min, 38 % B
	13,01 min, 100 % B
	18,00 min, 100 % B
	18,01 min, 2 % B
	22,00 min, STOP

5.6 Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem

5.6.1 Postup derivatizace směsného standardu 2-oxokyselin a jednotlivých standardů 2-oxokyselin

V 1,5 ml PP zkumavkách bylo smícháno 250 μ l roztoku směsného standardu jednotlivých 2-oxokyselin (bez 4-OH-PPYR a 2-KG), o koncentraci asi 50 μ mol/l, se 150 μ l derivatizačního činidla, DDB. Jednotlivé standardy 2-oxokyselin, o koncentraci asi 100 μ mol/l, byly připraveny stejným způsobem. Po promíchání byla směs inkubována 30 minut při 100 °C. Po ochlazení byla směs převedena do skleněných vialek.

5.6.2 Optimalizace množství derivatizačního činidla

Celkem do tří skleněných vialek bylo pipetováno 250 μ l směsného standardu 2-oxokyselin (PYR, PPYR, 2-OB, 2-KH, KIV, KMV a KIC), o koncentraci asi 50 μ mol/l, a různý objem derivatizačního činidla. Vzorky byly zpracovány v duplikátu. Směs byla inkubována 30 minut při 100 °C.

- 250 μ l směsného standardu + 150 μ l DDB
- 250 μ l směsného standardu + 100 μ l DDB + 50 μ l deionizované vody
- 250 μ l směsného standardu + 50 μ l DDB + 100 μ l deionizované vody

5.6.3 Optimalizace podmínek inkubace při derivatizaci 2-oxokyselin 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem (teplota a čas)

Celkem do tří skleněných vialek bylo pipetováno 250 μl směsného standardu 2-oxokyselin (PYR, PPYR, 2-OB, 2-KH, KIV, KMV a KIC), o koncentraci asi 50 $\mu\text{mol/l}$, a 150 μl derivatizačního činidla. Vzorky byly zpracovány v duplikátu. Směs byla inkubována následovně:

40 °C po dobu 15, 30, 60 min

70 °C po dobu 15, 30, 60 min

100 °C po dobu 15, 30, 60 min.

5.6.4 Stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem

Vyseknutý terčík suché kapky krve byl převeden do 1,5ml PP zkumavky a bylo k němu přidáno 150 μl 1mmol/l kyseliny chlorovodíkové a 20 μl vnitřního standardu kyseliny 2-oxokapronové (asi 5 $\mu\text{mol/l}$). Směs byla inkubována 60 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo k směsi přidáno 50 μl 6,3mol/l kyseliny chloristé a poté byla směs odstředěna (5 minut, 4430 \times g, laboratorní teplota). Do 1,5ml PP zkumavky bylo převedeno 150 μl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 200 μl deionizované vody a 50 μl derivatizačního činidla. Směs byla inkubována 60 minut při 100 °C. Po zchlazení byla směs za použití centrifugace (5 minut, 4430 \times g, laboratorní teplota) přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,22 μm a převedena do skleněných vialek.

5.6.5 Chromatografické podmínky

mobilní fáze A:	25% (v/v) acetonitril v deionizované vodě
mobilní fáze B:	100% acetonitril
kolona:	LichroCart 125 \times 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μm , opatřená ochrannou kolonou LichroCart 4 \times 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μm
průtok mobilní fáze:	0,5 ml/min
dávkovaný objem:	10 μl
teplota kolony:	37 °C
autosampler:	4 °C
fluorescenční detektor:	λ (excitace) = 370 nm λ (emise) = 445 nm

časový program: citlivost střední
zesílení $\times 4$
gradientová eluce, doba analýzy 22 minut
0,00 min, 10 % B
13,00 min, 27 % B
13,01 min, 100 % B
18,00 min, 100 % B
18,01 min, 10 % B
22,00 min, STOP

5.7 Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenem

Jelikož DMB a DDB jsou analogy OPD a příprava obou činidel byla podle literárních zdrojů podobná, zvolili jsme stejný postup přípravy vzorků a stejnou optimalizaci derivatizačního kroku, také chromatografické podmínky byly stejné jako při použití DDB.

5.8 Stanovení vybraných aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Metoda HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení aminokyselin po derivatizaci naftalen-2,3-dikarboxaldehydem (NDA) byla přejata a upravena [90].

5.8.1 Derivatizace aminokyselin ve směsném standardu

V skleněné vialce bylo smícháno 200 μl roztoku směsného standardu jednotlivých aminokyselin (Val, Ile, Leu, 2-AB, Nleu, Glu, Gln, Ala, Phe), o koncentraci asi 100 $\mu\text{mol/l}$, s 90 μl 100% ethanolu, 300 μl borátového pufru (pH 9,3), 20 μl NDA a 20 μl KCN. Po promíchání byla směs inkubována 15 min při laboratorní teplotě.

5.8.2 Stanovení vybraných aminokyselin v suché kapce krve

Vyseknutý terčík suché kapky krve byl převeden do 1,5ml PP zkumavky a bylo k němu přidáno 200 μl roztoku vnitřního standardu norleucinu v 100% ethanolu (asi 10 $\mu\text{mol/l}$). Směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl obsah zkumavky odstředěn (5 minut, 4430 \times g, laboratorní teplota), 100 μl supernatantu bylo

převáděno do skleněné vialky, přidáno 300 µl borátového pufru (pH 9,3), 20 µl NDA a 20 µl KCN. Směs byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě.

5.8.3 Chromatografické podmínky

mobilní fáze A:	5% (v/v) acetonitril v 10mmol/l Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,2
mobilní fáze B:	65% acetonitril (v/v) v 10mmol/l Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,2
kolona:	Ascentis [®] Express C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm, opatřená ochrannou kolonou Ascentis [®] Express C18, 5 µm, 5 x 4,6 mm
průtok mobilní fáze:	0,75 ml/min
dávkový objem:	10 µl
teplota kolony:	37 °C
autosampler:	8 °C
fluorescenční detektor:	λ (excitace) = 420 nm λ (emise) = 480 nm citlivost střední zesílení x4
časový program:	gradientová eluce, doba analýzy 35 minut 0,00 min, 20 % B 25,00 min, 55 % B 25,01 min, 100 % B 30,00 min, 100 % B 30,01 min, 20 % B 35,00 min, STOP

5.9 Analytické parametry metody

5.9.1 Linearita kalibrační křivky

Linearita metody vyjadřuje její schopnost poskytovat v určitém rozmezí koncentrací měřený signál, který je přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Zjišťuje se analýzou standardních roztoků o známých koncentracích, které pokrývají rozsah dané metody. Linearita je poté popisována jako interval mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou koncentrací standardního roztoku, kde s určitou přesností a správností můžeme stanovit koncentraci analyzované látky. Výsledkem tohoto měření je poté kalibrační křivka.

5.9.2 Přesnost analytické metody

Přesnost metody je analytický parametr, který se vyjadřuje jako míra shody mezi opakovanými měřeními téhož vzorku za předem definovaných podmínek. Velmi často se uvádí jako směrodatná odchylka nebo relativní směrodatná odchylka naměřených hodnot od těch skutečných, tudíž by se dala také chápat, jako chyba, kterou je výsledek měření zatížen. Míra přesnosti je posuzována variačním koeficientem (CV), jehož hodnota se udává v procentech.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$
$$CV [\%] = \frac{SD}{AVG} \times 100,$$

kde SD vyjadřuje směrodatnou odchylku, AVG je aritmetický průměr, x_i vyjadřuje koncentraci analytu ve vzorku a n je počet vzorků v sérii.

Podle podmínek opakování přesnosti metody se jedná buď o opakovatelnost, nebo reprodukovatelnost. Opakovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky měření stejného analytu tou samou metodou, stejnou osobou, za stejných laboratorních podmínek, na stejném přístroji, v krátkém časovém intervalu. Reprodukovatelnost popisuje míru shody mezi výsledky získanými měřeními stejného analytu ve stejném vzorku, stejnou metodou, avšak analýza probíhá za různých podmínek, liší se pracovník, přístroj a další experimentální podmínky, jako je čas a místo. Rozlišujeme opakovatelnost v sérii (tzv. *intra-assay*), kdy se jeden a tentýž vzorek analyzuje opakovaně, alespoň 10x za stejných podmínek s použitím jedné kalibrace, nebo opakovatelnost mezi sériemi (tzv. *inter-assay*), také známou jako přesnost v čase. Při tomto měření se analyzuje vzorek opakovaně, po dobu například několika dní, s tím rozdílem, že pro každé měření se využívá nově připravená kalibrace.

5.10 Zpracování výsledků

Pro zpracování získaných dat byly použity programy MS Excel, SigmaStat, verze 3.5 (Systat Software, Erkrath, Německo) a LC solution, verze 1,25 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo v této práci zmíněno, 2-oxokyseliny jsou významné meziprodukty metabolismu sacharidů, aminokyselin a lipidů. Hladiny 2-oxokyselin se využívají jako diagnostický ukazatel vzácných vrozených onemocnění, které se mohou projevit u novorozenců krátce po porodu. 2-Oxokyseliny jsou nejčastěji stanoveny metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Jelikož 2-oxokyseliny neabsorbují UV záření ani sami o sobě nefluoreskují, je nutné je převést na vhodné deriváty.

V roce 2008 byla na pracovišti Katedry biologických a biochemických věd zavedena metoda HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení 2-oxokyselin s rozvětveným řetězcem (KIV, KIC, KMV) v plazmě a suché kapce krve, která k derivatizaci 2-oxokyselin využívala OPD. Cílem naší práce bylo nahradit tuto vysoce karcinogenní látku za nekarcinogenní, ovšem za podmínek, že HPLC metoda s fluorescenční detekcí bude minimálně stejně selektivní a citlivá, tedy vhodná pro stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorcích suché kapky krve. Celkem jsme testovali tři derivatizační činidla, analogy OPD, 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen (DDB) a 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzen (DMB), u kterých nebyla prokázána karcinogenita, a dansylhydrazin (DNSH). Deriváty byly separovány na koloně s obrácenou fází (LiChroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm).

6.1 Příprava kalibračních standardů pro účely stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve

Existuje celá řada způsobů přípravy standardů pro sestavení kalibrační křivky, která je použitelná pro kvantifikaci 2-oxokyselin, ale prakticky jakýchkoliv analytů, ve vzorcích suché kapky krve. Jednou z možností je příprava standardů 2-oxokyselin ve vodě, kterou poté opatrně odpaříme v atmosféře dusíku, nebo k jejímu odstranění využijeme lyofilizaci. Odparek či lyofilizát pak rozpustíme v plné krvi. Další možností je přidavek standardů k plné krvi tak, aby se matrice krve prakticky nezměnila. Maximální doporučený přidavek je jeden díl roztoku standardů ve fyziologickém roztoku a devět dílů plné krve.

Odpaření vody pod proudem dusíku je velmi zdlouhavé a vede ke ztrátám 2-oxokyselin. Metoda lyofilizace je šetrnějším způsobem odstranění vody, ale i ta vedla k významným ztrátám 2-oxokyselin (viz příloha 1). Proto jsme se zaměřili na metodu standardního přídatku 2-oxokyselin k plné krvi.

Jelikož se při přípravě vzorku používá extrakce 2-oxokyselin ze suché kapky krve, je otázkou, kdy aplikovat vnitřní standard, zda před aplikací vzorku na filtrační papír nebo až

v průběhu přípravy vzorku, tedy při extrakci 2-oxokyselin ze suché kapky krve. Proto jsme stejný vzorek krve aplikovali na filtrační papír, kde jsme pipetovali do středu předtištěného kruhu vnitřní standard kyselinu 2-oxokapronovou a na filtrační papír, kde do předtištěného kruhu vnitřní standard pipetován nebyl. V prvním případě byl vyseklý terčík extrahován 1mmol/l kyselinou chlorovodíkovou, v druhém případě pak 1mmol/l kyselinou chlorovodíkovou obsahující vnitřní standard. V případě, kdy byl vnitřní standard aplikován ještě před aplikací vzorku krve, jsme získali nereprodukovatelné výsledky, proto jsme od tohoto postupu ustoupili.

6.2 Stanovení 2-oxokyselin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí po derivatizaci *ortho*-fenylendiaminem

Navázali jsme na již zavedenou metodu HPLC s fluorescenční detekcí, využívající OPD pro derivatizaci 2-oxokyselin. Zaměřili jsme se na optimalizaci derivatizačního kroku. Nejlepších výsledků jsme dosáhli, pokud jsme k supernatantu přidávali OPD v poměru 1:1 a směs inkubovali 30 minut při 55 °C [89]. Jako vnitřní standard jsme zvolili 2-oxokapronovou kyselinu. Jedná se o látku, která se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobá námi stanovovaným 2-oxokyselinám, ale nevyskytuje se běžně v krvi lidí.

6.2.1 Výběr vhodného extrakčního činidla a způsob extrakce 2-oxokyselin z terčíku suché kapky krve

Pro extrakci 2-oxokyselin ze vzorků DBS jsme testovali celou řadu extrakčních činidel, deionizovanou vodu, 1mol/l, 100mmol/l, 10mmol/l a 1mmol/l kyselinu chlorovodíkovou, 1mmol/l hydroxid draselný, 10% a 25 % (v/v) ethanol ve vodě, a 100% ethanol. Po přidání extrakčního činidla k terčíku DBS, se kromě 1mol/l kyseliny chlorovodíkové a 100% ethanolu, uvolňoval do roztoku hemoglobin, což bylo indikováno červeným zabarvením. Proto jsme po extrakci museli ke směsi přidávat deproteinační činidlo v takovém množství, aby byl vzorek co nejméně naředěn. V předešlé práci [89] přidávali 50 µl 1mol/l kyseliny chloristé, což se ukázalo být nedostačující. Nejlepších výsledků jsme dosáhli, když jsme ke směsi přidali 50 µl asi 6,3mol/l kyseliny chloristé. Z výsledků vyplývá (tabulka 10), že nejvhodnějším extrakčním činidlem byla 1mmol/l kyselina chlorovodíková.

Tabulka 10 Průměrné plochy piků derivátů 2-oxokyselin po extrakci testovanými činidly

	Voda	1mmol/l HCl	10mmol/l HCl	100mmol/l HCl
PYR	2456655	2415788	1138795	881900
2-OB	34372	28537	53459	73162
KIV	367183	628568	464405	373854
KMV	70062	100036	89152	70815
PPYR	98377	134311	139558	164471
2-KH	320520	343087	319126	322981
KIC	163527	173359	169637	199418
	1mol/l HCl	1mmol/l KOH	10% ethanol	25% ethanol
PYR	847874	1657916	2288886	1960384
2-OB	45777	71184	91910	95057
KIV	677431	1154542	922629	3266177
KMV	84312	111580	158555	186613
PPYR	158363	170394	188031	166629
2-KH	323417	285018	409180	326822
KIC	147478	172777	153062	152886

Také jsme testovali různé způsoby extrakce, 2-oxokyseliny jsme z terčků DBS extrahovali 1mmol/l kyselinou chlorovodíkovou po dobu 30 a 60 minut při laboratorní teplotě. Také jsme 2-oxokyseliny z terčků DBS extrahovali deionizovanou vodou a 1mmol/l kyselinou chlorovodíkovou za neustálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Nejúčinnějším způsobem byla extrakce 1mmol/l kyselinou chlorovodíkovou po dobu 60 minut.

6.2.2 Optimalizace separace derivátů 2-oxokyselin

V této práci bylo testováno několik mobilních fází a gradientová eluce. Při použití gradientové eluce s mobilní fází obsahující deionizovanou vodu a ethanol jako organický modifikátor (mobilní fáze A byl 25% ethanol v deionizované vodě a mobilní fáze B 100% ethanol) byly některé deriváty 2-oxokyselin obtížně separovány od interferujících látek. Z tohoto důvodu jsme testovali gradientovou eluci s mobilní fází obsahující fosfátový pufr a acetonitril jako organický modifikátor (mobilní fáze A byl 20% acetonitril v 25mmol/l Na_2HPO_4 , pH 7,2 a mobilní fáze B byl 100% acetonitril). Nepodařilo se nám ve vzorcích DBS detegovat derivát 4-hydroxyfenylpyruvátu a derivát 2-oxoglutarátu eluoval v píku, který byl příliš „rozmytý“. Při gradientové eluci s mobilní fází obsahující deionizovanou vodu a acetonitril (mobilní fáze A byl 25% acetonitril v deionizované vodě a mobilní fáze B 100%

acetonitril) jsme dosáhli podobných výsledků, jako v případě mobilní fáze obsahující pufr, ovšem příprava mobilní fáze obsahující pouze deionizovanou vodu a organický modifikátor je jednodušší, také v případě použití hmotnostní detekce je lepší. Při derivatizaci 2-oxokyselin derivatizačními činidly DDB a DMB, derivát 2-oxoglutarátu již neeluoval v „rozmytém píku“ tak, jako při použití derivatizačního činidla OPD, ovšem i zde nebyl pík derivátu 4-hydroxyfenylpyruvátu ve vzorcích suché kapky krve detegován.

6.2.3 Analytické parametry metody

Chromatografický záznam stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorku suché kapky krve metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci OPD je uveden v příloze 2. Linearita byla zjišťována jako součást kalibrace metody, a to analýzou standardů s koncentracemi rovnoměrně pokrývající deklarovaný rozsah metody. Byla sestrojena kalibrační křivka a provedeno vyhodnocení kalibračního vztahu. Kalibrační křivky byly lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací (24,4–487,1) $\mu\text{mol/l}$ pro pyruvát, (2,7–54,2) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxoisovalerát, (5,0–99,4) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxo-3-methylvalerát, (5,4–108,3) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxoisokapronát a (2,5–50,9) pro 2-oxobutyryát. Parametry kalibračních křivek shrnuje tabulka 11.

Tabulka 11 *Parametry kalibračních křivek pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci ortho-fenylendiaminem*

2-Oxokyselina	k	q	R ²
PYR	0,0146	-0,3335	0,9933
2-OB	0,0011	-0,0024	0,9889
KIV	0,0084	-0,015	0,9894
KIC	0,0093	0,0085	0,9961
KMV	0,0185	0,02	0,9993

Výsledky přesnosti metody v sérii pro stanovení jednotlivých 2-oxokyselin ve vzorcích DBS metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci OPD jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12 Přesnost metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci ortho-fenylendiaminem pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve

2-Oxokyselina	AVG (μmol/l)	SD (μmol/l)	CV (%)
PYR	347,5	24,6	7,1
2-OB	-	-	-
KIV	17,4	1,1	6,4
KIC	38,0	2,9	7,6
KMV	41,8	3,5	8,4

AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient; počet měření (n) = 10

6.3 Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem

Při přípravě derivatizačního činidla DDB jsme zaznamenali drobný problém. Zjistili jsme, že pokud činidlo rozpustíme v deionizované vodě a následně přidáme koncentrovanou kyselinu chlorovodíkovou a stabilizační činidla dithioničitan sodný a 2-merkptoethanol, vznikla sraženina. Z toho důvodu jsme postup přípravy derivatizačního činidla DDB pozměnili, nejprve jsme připravili směs obsahující kyselinu chlorovodíkovou, stabilizátory a poté jsme v této směsi DDB rozpustili. Při tomto postupu žádná sraženina nevznikla.

Směs obsahující sraženinu jsme odstředili (5 minut, 1700 x g, laboratorní teplota) a supernatant jsme použili k analýzám. Derivatizace 2-oxokyselin proběhla normálně, jen plochy píků derivátů 2-oxokyselin byly nepatrně nižší v porovnání s derivatizačním činidlem, při jehož přípravě sraženina nevznikla.

6.3.1 Optimalizace derivatizačního kroku

Optimalizovali jsme derivatizační proceduru, tedy dobu a teplotu inkubace, a množství DDB. Reakční směs jsme inkubovali 15, 30 a 60 minut při teplotách 40, 70 a 100 °C. Z grafů (obrázky 19-21) je patrné, že intenzita fluorescence vznikajících derivátů 2-oxokyselin se zvyšuje s rostoucí dobou inkubace a rostoucí teplotou inkubace. Maximálních ploch píků derivátů jednotlivých 2-oxokyselin bylo dosaženo, když reakční směs byla inkubována 60 minut při 100 °C. V tabulkách 13-15 jsou uvedeny průměrné plochy píků přepočítaných na procenta, přičemž 100 % je chápáno jako nejvyšší plocha píku daného

derivátu 2-oxokyseliny. Hara a kol. [39] uvádějí, že deriváty jsou detekovány již při 37 °C a maximální intenzity fluorescence bylo dosaženo po 2,5 hodinové inkubaci při 100 °C.

Tabulka 13 Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 40 °C

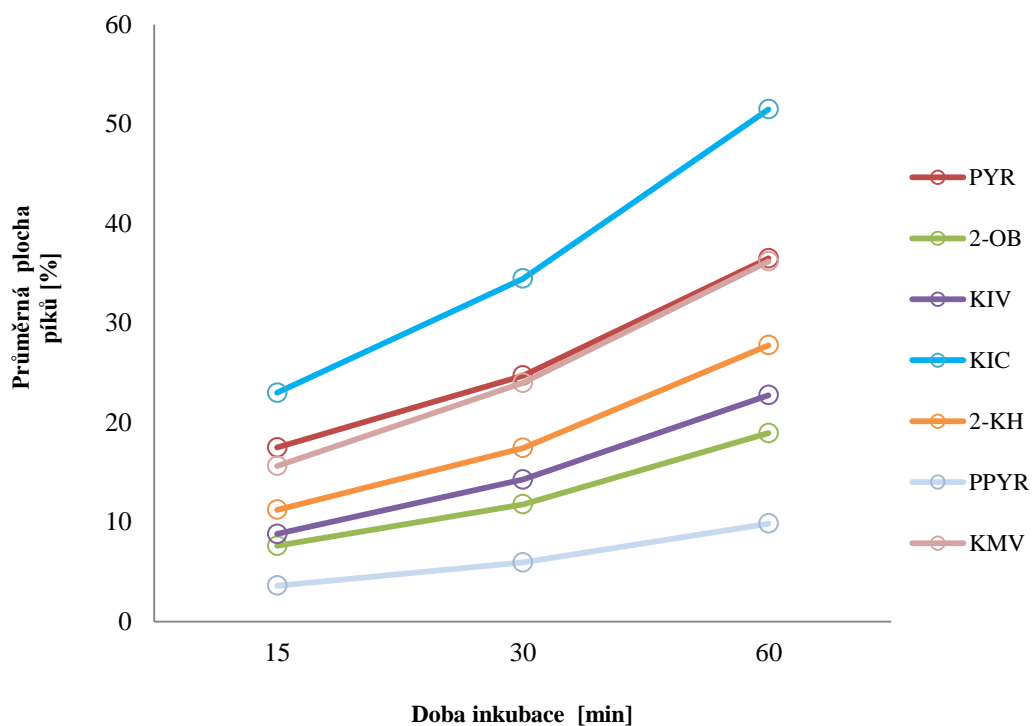
Čas (min)	PYR	2-OB	KIV	KIC	2-KH	PPYR	KMV
15	17,5	7,6	8,8	23,0	11,2	3,6	15,6
30	24,7	11,8	14,3	34,5	17,4	6,0	24,0
60	36,5	19,0	22,8	51,8	27,8	9,9	36,2

Tabulka 14 Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 70 °C

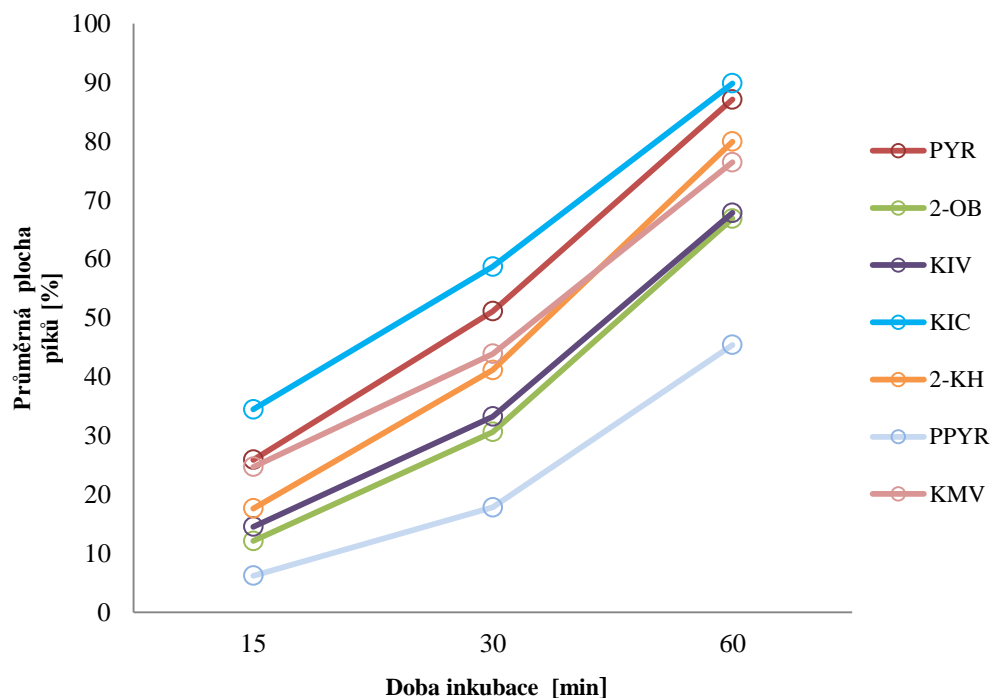
Čas (min)	PYR	2-OB	KIV	KIC	2-KH	PPYR	KMV
15	25,9	12,1	14,5	34,5	17,7	6,2	24,7
30	51,2	30,6	33,3	58,7	41,2	17,8	43,9
60	87,1	66,9	67,9	89,9	80,0	45,4	76,5

Tabulka 15 Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 100 °C

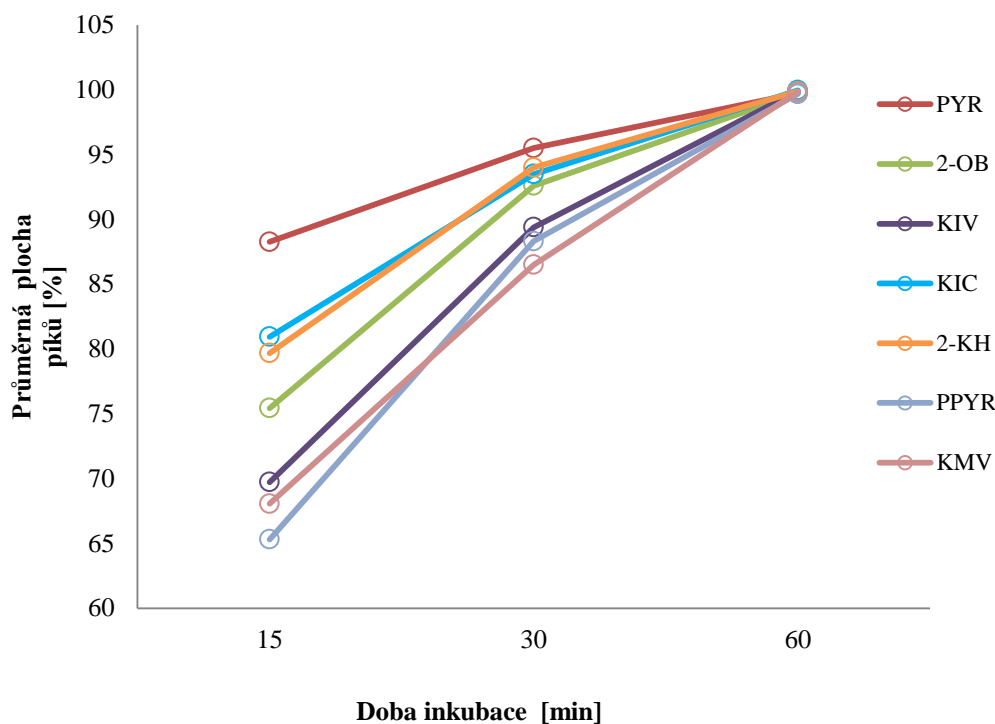
Čas (min)	PYR	2-OB	KIV	KIC	2-KH	PPYR	KMV
15	88,3	75,4	69,7	80,9	76,7	65,3	68,1
30	95,5	92,6	89,4	93,5	94,0	88,3	86,5
60	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0



Obrázek 19 Plochy píkú derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 40 °C



Obrázek 20 Plochy píkú derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 70 °C



Obrázek 21 Plochy píků derivátů 2-oxokyselin přepočítaných na procenta po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při 100 °C

Dále jsme optimalizovali množství DDB v reakční směsi. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16. K jednotlivým roztokům směšného standardu 2-oxokyselin (250 μ l) jsme postupně přidávali buď 150 μ l derivatizačního činidla DDB, 100 μ l derivatizačního činidla DDB a 50 μ l deionizované vody nebo 50 μ l derivatizačního činidla DDB a 100 μ l deionizované vody. Z výsledků vyplývá, že čím je větší množství derivatizačního činidla v reakční směsi, tím jsou větší plochy píků derivátů 2-oxokyselin. V případě pyruvátu postačuje i menší množství derivatizačního činidla v reakční směsi.

Tabulka 16 Optimalizace množství derivatizačního činidla v reakční směsi

Množství DDB (μ l)	PYR	2-OB	KIV	KIC	2-KH	PPYR	KMV
50	87,2	65,6	54,6	69,6	66,1	68,2	54,3
100	97,8	90,6	83,0	91,4	91,4	90,8	88,2
150	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Hodnoty jsou uváděny jako průměrné plochy píků v %, vztaženo k největší ploše píku

6.3.2 Stabilita derivátů 2-oxokyselin po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem

V tabulce 17 jsou shrnuty výsledky stability derivátů jednotlivých 2-oxokyselin po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při laboratorní teplotě. Výsledky ukazují, že deriváty jsou při laboratorní teplotě po dobu minimálně 42 hodin stabilní. Hodnoty nad 100 % jsou zřejmě důsledkem odpaření rozpouštědla z důvodu netěsnosti víček vialek. Hara a kol. [39] uvádějí, že deriváty 2-oxokyselin jsou stabilní nejméně 5 hodin při stání na denním světle.

Tabulka 17 Stabilita derivátů 2-oxokyselin po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem při laboratorní teplotě

2-Oxokyselina	19 hod	42,5 hod
PYR	101,7	100,8
PPYR	101,4	103,1
KIV	103,0	103,2
KIC	103,0	102,7
KMV	105,3	103,0
2-KH	102,7	102,3
2-OB	102,7	102,5

Hodnoty jsou uváděny jako plochy píku v %, vztaheno k počáteční ploše píku

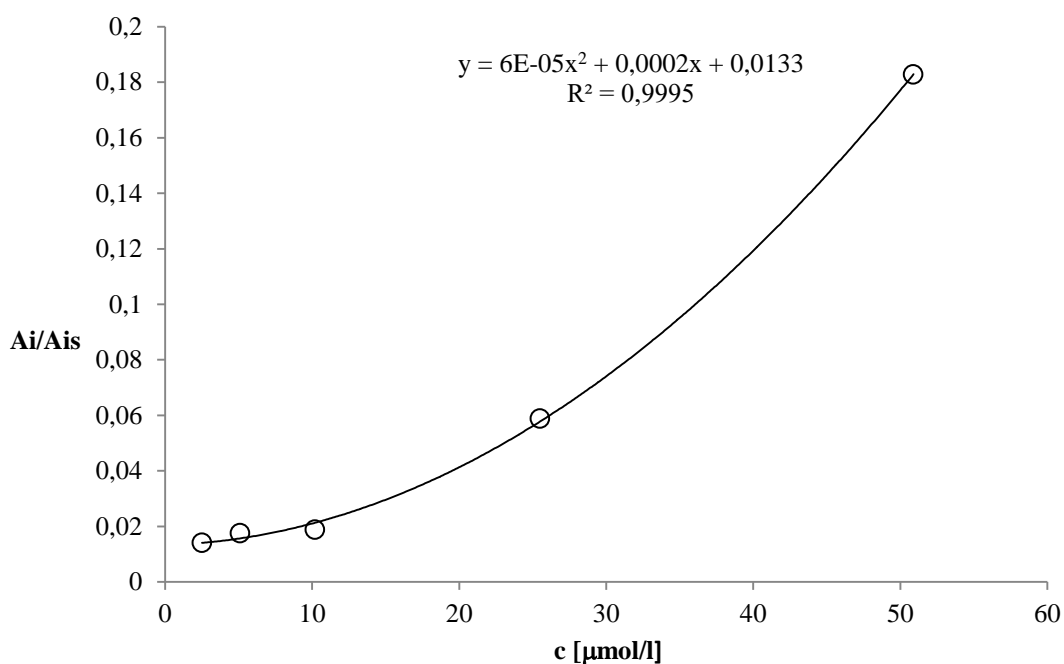
6.3.3 Analytické parametry metody

Chromatografický záznam stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorku suché kapky krve metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci DDB je uveden v příloze 3. Kalibrační křivky byly lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací, (2,5–50,4) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxoglutarát, (24,4–487,1) $\mu\text{mol/l}$ pro pyruvát, (2,7–54,2) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxoisovalerát, (5,0–99,4) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxo-3-methylvalerát a (5,4–108,3) $\mu\text{mol/l}$ pro 2-oxoisokapronát, až na 2-oxobutyryát (2,5–50,9) $\mu\text{mol/l}$, kde byl průběh kvadratický (obrázek 22). Parametry kalibračních křivek shrnuje tabulka 18.

Hladiny fenylpyruvátu nebyly kvantifikovány, jelikož u části dobrovolníků nebyl detegován. Hladiny fenylpyruvátu jsou v plné krvi lidí velmi nízké, protože fenylalanin je tzv. hlavní cestou hydroxylován za vzniku tyrosinu [84]. Jen za patologických stavů, například při fenylketonurii, je fenylalanin při transaminaci přeměněn právě na fenylpyruvát.

Tabulka 18 Parametry kalibračních křivek pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem

2-Oxokyselina	k	q	R ²
PYR	0,0199	0,2540	0,9986
2-OB	0,0001x ² + 0,0002x	0,0133	0,9995
2-KG	0,0163	0,2222	0,9946
KIV	0,0168	-0,0027	0,9927
KIC	0,0338	0,2493	0,9954
KMV	0,0153	-0,0127	0,9962



Obrázek 22 Kalibrační křivka pro stanovení 2-oxobutyrátu ve vzorcích suché kapky krve

Výsledky přesnosti metody v sérii pro stanovení jednotlivých 2-oxokyselin ve vzorcích DBS metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci DDB jsou shrnuty v tabulce 19.

Tabulka 19 Přesnost metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve.

2-Oxokyselina	AVG (μmol/l)	SD (μmol/l)	CV (%)
PYR	464,3	20,0	4,3
2-OB	13,6	0,5	3,3
KIV	18,5	0,6	3,4
KIC	38,1	1,5	4,1
KMV	31,5	1,2	3,8

AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient; počet měření (n) = 10

6.4 Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-methyldioxybenzenem

Jak již bylo zmíněno DMB a DDB jsou analogy OPD. DMB a DDB se liší pouze v postranním řetězci (obrázky 17 a 18), ale mechanismus derivatizace je totožný. Obě činidla jsou připravována v prostředí kyseliny chlorovodíkové, jsou využívány stejné stabilizátory, dithioničitan sodný a 2-merkptoethanol [39, 49, 59]. Všichni autoři také zmiňují, že čím vyšší je teplota inkubace reakční směsi, tím vyšších intenzit fluorescence u vzniklých derivátů dosáhneme. Navzdory tomu, Wang a kol. [59] upozorňují, že příliš dlouhá doba inkubace při vyšších teplotách, nad 100 °C, způsobí tvorbu sraženiny. Z tohoto důvodu jsme usoudili, že derivatizační krok bude stejný jako v případě použití DDB. Po 60minutové inkubaci reakční směsi při 100 °C žádná sraženina nevznikala.

Problém nastal při určení analytických parametrů metody, kdy získané výsledky nebyly reprodukovatelné. Při optimalizaci separačního kroku, kdy jsme testovali celou řadu gradientových elucí mobilní fáze obsahující deionizovanou vodu a acetonitril jako organický modifikátor, jsme nedokázali od sebe separovat derivát vnitřního standardu a fenylpyruvátu. Možným řešením by mohlo být použití pufru v mobilní fázi. Na druhou stranu se do budoucna plánuje využít pro stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorcích suché kapky krve hmotnostní detekce, zejména k identifikaci vzniklých derivátů, proto jsme se zaměřili na takovou optimalizaci separačního kroku, kdy je jako mobilní fáze využita pouze směs organického modifikátoru a deionizované vody, případně s malým přírůdkem kyseliny octové nebo mravenčí. Prozatím byly publikovány dvě práce, které využily pro derivatizaci 2-

oxokyselin DMB. Autoři při separaci derivátů 2-oxokyselin využívali isokratickou eluci s mobilní fází obsahující směs methanolu, acetonitrilu a fosfátového pufru o pH 7 [49,59].

Chromatografický záznam stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorku suché kapky krve metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci DMB je uveden v příloze 4.

6.5 Stanovení 2-oxokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci dansylhydrazinem

Velkou nevýhodou DNSH, v porovnání s OPD, DDB a DMB, je, že sám vysoce fluoreskuje, stejně jako deriváty 2-oxokyselin. Při přípravě derivatizačního činidla DNSH jsme vycházeli z práce Donnarumma a kol. [53], kteří se zabývali pouze stanovením 2-oxoglutarátu. My jsme se chtěli zaměřit i na stanovení dalších 2-oxokyselin. Nejprve jsme testovali možnosti derivatizace pyruvátu. Podmínky derivatizačního kroku jsme zcela převzali od autorů zmíněné publikace, avšak derivát pyruvátu jsme nedetegovali, pouze ohromný pík vlastního dansylhydrazinu. Po provedení celé řady dalších pokusů se nám nepodařilo získat deriváty 2-oxokyselin, které by vykazovaly dostatečně vysokou intenzitu fluorescence, proto jsme od použití tohoto derivatizačního činidla pro stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorcích suché kapky krve odstoupili.

6.6 Určení orientačních hladin vybraných 2-oxokyselin v krvi dobrovolných dárců, korelace těchto hladin s hladinami odpovídajících aminokyselin

V tabulce 20 jsou uvedeny orientační hladiny vybraných aminokyselin a 2-oxokyselin v plné krvi, získané metodou suché kapky krve, u 14 dobrovolníků. Jak je uvedeno v tabulce 21, tak hladiny glutaminu statisticky významně korelovaly s hladinami 2-oxoglutarátu, hladiny alaninu s hladinami pyruvátu, hladiny valinu s 2-oxoisovalerátem a hladiny leucinu s 2-oxoisokapronátem. Tyto výsledky jsou zajímavé a očekávané, avšak k jednoznačnému průkazu těchto závislostí je nutné významně rozšířit soubor dárců krve, což se do budoucna plánuje.

Tabulka 20 Orientační hladiny vybraných 2-oxokyselin a aminokyselin v krvi (vzorky suché kapky krve) 14 dobrovolných dárců

Aminokyseliny	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	Median ($\mu\text{mol/l}$)	IQR ($\mu\text{mol/l}$)	Maximum ($\mu\text{mol/l}$)	Minimum ($\mu\text{mol/l}$)
Glu	80,1	13,8	81,0	22,1	106,2	60,3
Gln	462,0	157,8	424,3	228,1	758,0	276,3
Ala	551,3	123,6	552,4	150,7	801,5	358,6
2-AB	15,8	6,2	14,6	7,4	29,3	8,5
Val	245,0	80,9	231,1	94,0	438,2	116,8
Ile	69,6	25,4	68,2	18,1	141,0	35,9
Leu	125,6	44,7	119,5	23,7	250,9	66,4
2-Oxokyseliny						
2-KG	60,6	21,5	57,3	19,8	124,7	38,1
PYR	413,8	170,8	364,4	213,5	712,0	179,4
2-OB	21,7	13,6	15,6	21,1	50,1	9,6
KIV	18,5	4,8	18,1	8,1	28,4	11,7
KIC	42,6	16,6	44,0	28,9	65,9	18,2
KMV	27,2	8,7	26,1	12,4	42,4	15,4

Tabulka 21 Závislost hladin aminokyselin na hladinách odpovídajících 2-oxokyselin

	Spearmanův koeficient pořadové korelace, R	p-hodnota
Glu vs. 2-KG	0,240	0,399
Gln vs. 2-KG	0,560	0,0355
Glu+Gln vs. 2-KG	0,495	0,069
Ala vs. PYR	0,670	0,00813
2-AB vs 2-OB	0,451	0,101
Val vs. KIV	0,736	0,00206
Ile vs. KMV	0,481	0,0778
Leu vs. KIC	0,547	0,041

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo nahradit karcinogenní derivatizační činidlo *ortho*-fenylendiamin, které se běžně používá při derivatizaci 2-oxokyselin pro jejich stanovení metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Jelikož technika suché kapky krve poskytuje malé množství vzorku (asi 10 μ l), je potřeba použít pro stanovení 2-oxokyselin dostatečně citlivou a selektivní metodu, z tohoto důvodu jsme ani neuvažovali o použití derivatizačních činidel, jejichž deriváty nefluoreskují. Naším hlavním úkolem tedy bylo zavést metodu HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve a pro tento účel najít vhodné derivatizační činidlo.

Vhodným kandidátem je 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen, vzniklé deriváty 2-oxokyselin vykazovaly daleko vyšší intenzitu fluorescence v porovnání s deriváty 2-oxokyselin při derivatizaci *ortho*-fenylendiaminem. Analytické parametry metody HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení 2-oxokyselin v suché kapce krve, derivatizovány 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem, jsou vyhovující. Metoda byla také testována z hlediska klinické použitelnosti, byly určeny orientační hodnoty 2-oxokyselin v plné krvi, získané metodou suché kapky krve, u čtrnácti dobrovolníků, které byly porovnatelné s literárními údaji.

Pracoviště Katedry biologických a biochemických věd se zabývá metabolomikou. Cílem je zavést dostatečně citlivé a selektivní metody pro stanovení celé řady metabolitů v biologických vzorcích, získaných málo invazivními až neinvazivními technikami, sem spadá také technika suché kapky krve. V loňském roce byla na tomto pracovišti pro stanovení vybraných 2-oxokyselin v plazmě a plné krvi zavedena metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Ukázalo se však, že metoda HPLC s fluorescenční detekcí je v tomto případě mnohem citlivější. Do budoucna se plánuje zavedení metody HPLC s hmotnostní detekcí.

8 SEZNAM LITERATURY

- [1] MAHAR K. P., KHUHAWAR M. Y., KAZI T. G., ABBASI K., SHABIR G. A., ARAIN S. A. A novel HPLC method for the determination of alpha-keto acids in human serum using meso stillbenediamine as derivatization reagent. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologie*, 2012, 35, s. 1245–1258.
- [2] MAHAR K. P., KHUHAWAR M. Y., ABBASO K. U., SHAR G. Q., AZMAT R., BAIG J. A. HPLC determination of α -keto acids from human serum using 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent, *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2013, 14 (2), s. 8–15.
- [3] PAILLA K., BLONDE-CYNOBER F., AUSSEL CH., DE BADIT PJ., CYNOBER L. Branched-chain keto-acids and pyruvate in blood: measurement by HPLC with fluorimetric detection and changes in older subjects. *Clinical Chemistry*, 2000, 46 (6), s. 848–853.
- [4] VĚSTNÍK ministerstva zdravotnictví ČR. Praha: Ministerstvo zdravotnictví, 31. 5. 2016, částka 6, s. 1-16. [online]. [cit. 2017-09-14]. Dostupné z: http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c6/2016_12065_3442_11.html
- [5] PATEL K. P., O'BRIEN T. W., SUBRAMONY S. H., SHUSTER J., STACPOOLE P. W. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetics features in 371 patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2012, 106, s. 385–394.
- [6] BARNERIAS CH., SAUDUBRAY J.-M., TOUATI G., DE LONLAY P., DULACO., PONSOT G., MARSAC C., BRIVET M., DESGUERRE I. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: four neurological phenotypes with differing pathogenesis. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2010, 52 (2), s. 1–9.
- [7] GRAY L. R., TOMPKINS S. C., TAYLOR E. B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71, s. 2577–2604.
- [8] BROWN G. K., OTERO L. J., LEGRIS M., BROWN R. M., Pyruvate dehydrogenase deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 1994, 31, s. 875–879.
- [9] MADIAS N. E. Lactic acidosis. *Kidney International*, 1986, 29, s. 752–774.
- [10] MIZOCK B. A., FALK J. L. Lactic acidosis in critical illness. *Critical Care Medicine*, 1992, 20, s. 80–93.
- [11] MURRAY R. K. Harperova Biochemie. 23. vyd., 3. české vyd. Jinočany: H & H, 2001, s. 1–892. ISBN 80-7319-003-6.

- [12] BAKKER J., NIJSTEN M. W. N., JANSEN T. C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. *Annals of Intensive Care*, 2013, 3 (12), s. 1–8.
- [13] MedScape, Lactic acidosis [online]. [cit 2017-09-25] Dostupné z <https://emedicine.medscape.com/article/167027-overview>
- [14] TAYLOR J., ROBINSON B. H., SHERWOOD W. G. A defect in branched-chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Pediatric Research*, 1978, 12 (1), s. 60–62.
- [15] PUCKETT R. L., LOREY F., RINALDO P., LIPSON M. H., MATERN D., SOWA M. E., LEVINE S., CHANG R., WANG R. Y., ABDENUR J. E. Maple syrup urine disease: further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2010, 100, s. 136–142.
- [16] KNAPP M. S. VAN DER, VALK J., BARKHOF F. Magnetic resonance of myelination and myelin disorders. 3rd ed. New York: Springer, 2005, s. 1–1087. ISBN 978-3-540-27660-9.
- [17] CHUANG D. T. Maple syrup urine disease: it has come a long way. *The Journal of Pediatrics*, 1998, 132 (3), s. 17–23.
- [18] STRAUSS K. A., WARDLEY B., ROBINSON D., HENDRICKSON CH., RIDER N. L., PUFFENBERGER E. G., SHELMER D., MOSER A. B., MORTIN D. H. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2010, 99, s. 333–345.
- [19] HOFFMAN B., HELBING CH., SCHADEWALDT P., WENDEL U. Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatric Research*, 2006, 59 (1), s. 17–20.
- [20] FRAZIER D. M., ALLGEIER C., HOMER C., MARRIAGE B. J., OGATA B., ROHR F., SPLETT P. L., STEMBRIDGE A., SINGH R. H. Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: an evidence- and consensus-based approach. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2014, 112, s. 210–217.
- [21] CLEARY M. A. Phenylketonuria. *Paediatrics and Child Health*, 2011, 21 (2), s. 61–64.
- [22] HVAS A. M., NEXO E., NIELSEN J. B. Vitamin B₁₂ and vitamin B₆ supplementation is needed among adults with phenylketonuria (PKU). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2006, 29, s. 47–53.
- [23] BLAU N., SPRONSEN F. J. VAN, LEVY H. L. Phenylketonuria. *Lancet*, 2010, 376 (9750), s. 1417–1427.

- [24] OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency [online]. [cit 2017-09-28]. Dostupné z <https://www.omim.org/entry/203740?search=203740&highlight=203740>
- [25] BLAU N., DURAN M., BLASKOVICS M. E., GIBSON K. M. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. 2nd ed. New York: Springer, 2003. ISBN 3-540-42542-X.
- [26] VOCKLEY J., ENSENAUER R. Isovaleric acidemia: new aspects of genetic and phenotypic heterogeneity. *American Journal of Medical Genetics*, 2006, 142C, s. 9–103.
- [27] RHEAD W. J., TANAKA K. Demonstration of a specific mitochondrial isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency in fibroblasts from patients with isovaleric acidemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77 (1), s. 580–583.
- [28] ROE C. R., MILLINGTON D. S., MALTBY D. A., KAHLER S. G., BOHAN T. P. L-Carnitine therapy in isovaleric acidemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 1984, 74 (6), s. 2290–2295.
- [29] TANAKA K., BUDD M. A., EFRON M. L., ISSELBACHER K. J. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1966, 56 (1), s. 236–242.
- [30] WADA Y. Idiopathic hypervalinemia: valine and alpha keto-acids in blood following an oral dose of valine. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1965, 87, s. 322–331.
- [31] WANG L. X., LI C. J., XING Y., YANG Y. H., JIA J. P. Hypervalinemia and hyperleucine-isoleucinemia caused by mutations in the branched-chain-amino-acid aminotransferase gene. *The Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2015, 38, s. 855–861.
- [32] KARLSON P., GEROK W., GROSS W. Pathobiochemie. 2. vyd. Praha: Academia, 1987, s.1–474. ISBN 21-041-87.
- [33] BRAHMAN K. P., PANDEY N., KUMAR S. V. J., SOMAROUTHU P., TIWARI S., PITRE S. K. Highly sensitive stripping voltammetric determination of biomolekule, pyruvic acid in solubilized system and biological fluids. *Arabian Journal of Chemistry*, 2016, 9, s. 1897–1904.
- [34] OLSON C. K., CHEN G., LYNCH J. CH. Quantification of branched-chain keto acids in tissue by ultra fast liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2013, 439, s. 116–122.

- [35] FUCHS M., ENGEL J., CAMPOS M., MATEJEC R., HENRICH M., HARBACH H., WOLFF M., WEISMÜLLER K., MENGES T., HEIDT C. M., WELTERS D. I., KRÜLL M., HEMPELMANN G., MÜHLING J. Intracellular alpha-keto acid quantification by fluorescence-HPLC. *Amino Acids*, 2009, 36, s. 1–11.
- [36] COOPER L. J. A., GINOS Z. J., MEISTER A. Synthesis and properties of the α -keto acids. *Chemical Reviews*, 1983, 83, s. 32–358.
- [37] SELIGSON D., SHAPIRO B. Alpha-keto acids in blood and urine studied by paper chromatography. *Analytical Chemistry*, 1952, 24 (4), s. 754–755.
- [38] TAYLOR W. K., SMITH H. J. 1,2-Diamino-4-nitrobenzene as a reagent for the detection and determination of alpha-keto acids in blood and urine. *Analyst*, 1955, 80, s. 607–613.
- [39] HARA S., TAKEMORI Y., IWATA T., YAMAGUCHI M., NAKAMURA M. Fluorimetric determination of α -keto acids with 4,5-dimethoxy-1,2-diaminobenzene and its application to high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 1985, 172, s. 167–173.
- [40] 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. *Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1985, 344, s. 33–39.
- [41] HYASHI T., TODORIKI H., NARUSE H., TSUCHIYA H. High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in plasma with fluorimetric detection. *Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1983, 273, s. 245–252.
- [42] KIEBER J. D., MOPPER K. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of α -keto acid quinoxalinol derivatives, optimization of technique and application to natural samples. *Journal of Chromatography*, 1983, 281, s. 135–149.
- [43] ADEGOKE A. O. An overview of applications of pre-column derivatization reactions for the liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals and other compounds. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 2012, 6 (14), s. 129–140.
- [44] 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. *Journal of Chromatography*, 1988, 432, s. 297–301.

- [45] MAHAR K. P., ABBASI U. K., KHUHAWAR Y. M., MASTOI M. G., CHANNER H. A., SAHITO B. S., KANDHRO J. A. HPLC determination of α -keto acids in human serum and urine after derivatization with 4-nitro-1,2-phenylenediamine. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 2013, 14 (1), s. 16–25.
- [46] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 1.vyd. Praha: Europrints a.s., 2013, s. 1–235. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [47] RIGAS G. P. Post-column labeling techniques in amino acid analysis by liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, s. 7957–7992.
- [48] LAWRENCE F. J., FREI W. R. Chemical derivatization in liquid chromatography. New York: Elsevier Scientific Publishing Company, *Journal of chromatography library*, 1976, 7, s. 1–202. ISBN 0-444-41429-0.
- [49] NAKAMURA M., HARA S., YAMAGUCHI M., TEKEMORI Y., OHKURA Y. 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α -keto acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1987, 35 (2), s. 687–692.
- [50] YAMAGUCHI M., YOSHIDA H., NOHTA H. Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2002, 950, s. 1–19.
- [51] ISHIDA J., YAMAGUCHI M., NAKAHARA T., NAKAMURA M. 4,5-Diaminophthalhydrazide as a highly sensitive chemiluminescence reagent for α -keto acids in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 1990, 231, s. 1–6.
- [52] ARAKAWA H., ISHIDA J., YAMAGUCHI M., NAKAMURA M. Chemiluminescent products of reaction between α -keto acids and 4,5-diaminophthalhydrazide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1990, 38 (12), s. 3491–3493.
- [53] DONNARUMMA F., WINTERSTEIGER R., SCHOBER M., GREULBERGER J., MATZI V., MAIER A., SCHWARZ M., ORTNER A. Simultaneous quantitation of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in plasma by HPLC with UV and fluorescence detection. *Analytical Sciences*, 2013, 29, s. 1177–1182.
- [54] MÜHLING J., FUCHS M., CAMPOS E. M., GONTER J., ENGEL M. J., SABLITZKI T., WEISS S., DEHNE G. M., KRÜLL G. H. Quantitative determination of free intracellular α -keto acids in neutrophils. *Journal of Chromatography B*, 2003, 789, s. 383–392.
- [55] UCHIYAMA S., INABA Y., KUNUGITA N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-

- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879, s. 1282–1289.
- [56] HIRATA T., KAI M., KOHASHI K., OHKURA Y. Determination of phenylpyruvic acid in urine and serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 1981, 226, s. 25–31.
- [57] QURESHI A. G. High-performance liquid chromatographic methods with fluorescence determination of branched-chain amino acids and their alpha-keto analogues in plasma samples of healthy subjects and eraemic patients. *Journal of Chromatography*, 1987, 400, s. 91–99.
- [58] HAN J., GAGNON S., ECKLE T., BORCHERS H. CH. Metabolomic analysis of key central carbon metabolism carboxylic acids as their 3-nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS. *Electrophoresis*, 2013, 34, s. 2891–2900.
- [59] WANG ZJ., 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. *Journal of Chromatography*, 1988, 430, s. 223–231.
- [60] FIEHN O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2016, 114, s. 1–43.
- [61] ORATA F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *IntechOpen*, 2012, 5, s. 83–108.
- [62] HALKET J. M., ZAIKIN V. G.: Derivatization in mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 9, s. 1–21.
- [63] OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. Hawkinsinuria [online]. [cit 2018-03-05]. Dostupné z <https://www.omim.org/entry/140350>
- [64] AQUARON R. Alkaptonuria: a very rare metabolic disorder. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 50 (5), s. 339–344.
- [65] SMITH I. Chromatographic and electrophoretic techniques. Volume II- zone electrophoresis. 4th ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1976, s. 1–485. ISBN 9780815178408.
- [66] TAUBER H. Separation of alpha-keto acid dinitrophenylhydrazones by paper electrophoresis and their colorimetric determination. *Analytical Chemistry*, 1955, 27 (2), s. 287–289.

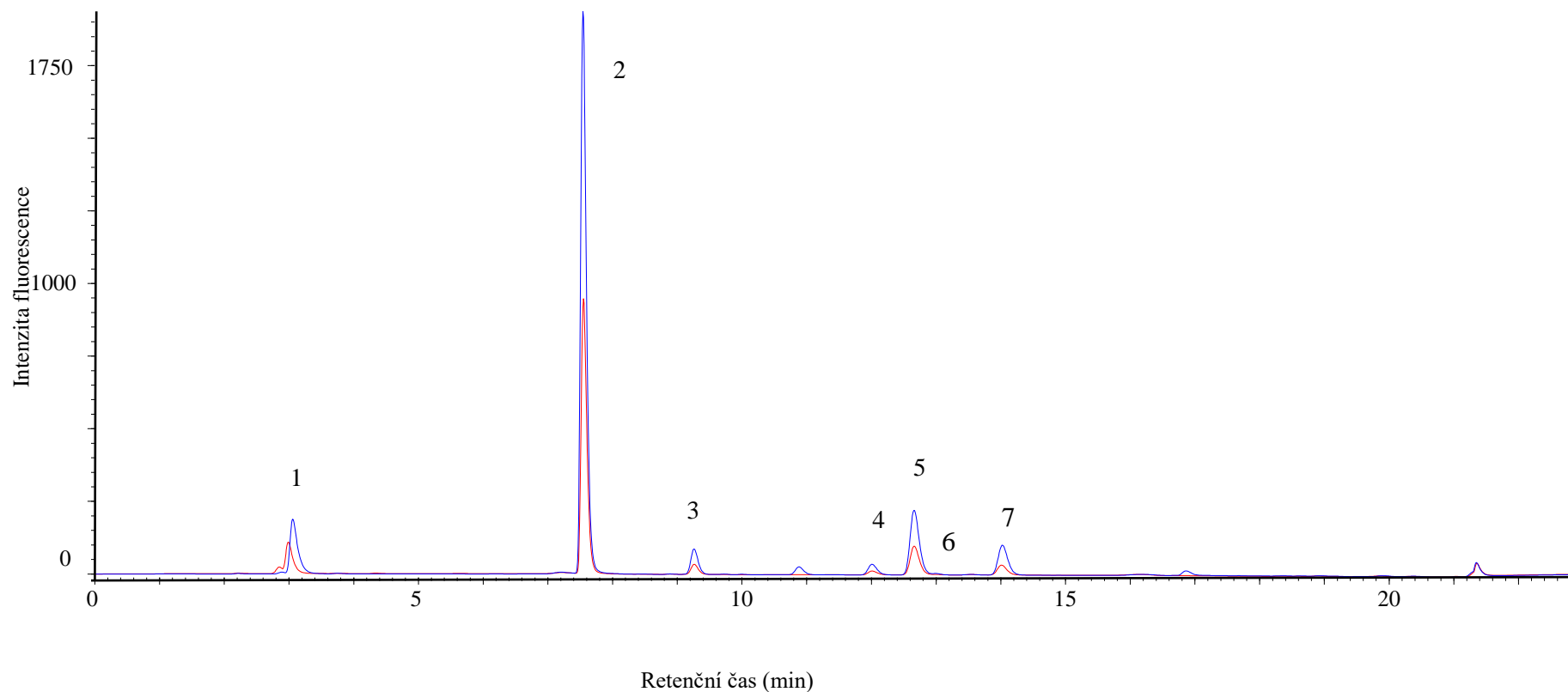
- [67] BERRY A. S., CAMPBELL N. J. A rapid technique for the separation and quantitation of free alpha-keto acids in complex solutions. *Analytical Biochemistry*, 1964, 8 (4), s. 495–502.
- [68] SHIRAI M., FURATA R., SUZUKI S., NAKAZAWA H., FUJITA S., MARYUAMA T. Determination of organic acids by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1994, 680, s. 247–251.
- [69] WASIELEWSKA M., BANEL A., ZYGMUNT B. Capillary electrophoresis in determination of low molecular mass organic acids. *International Journal of Environmental Science and Development*, 2014, 5 (4), s. 417–425.
- [70] TŮMA P., SAMCOVÁ E., ŠTULÍK K. Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection- an efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 685, s. 84–89.
- [71] DOLNÍK V., DOLNÍKOVÁ J. Capillary zone electrophoresis of organic acids in serum of critically ill children. *Journal of Chromatography A*, 1995, 716, s. 269–277.
- [72] VOET D., VOET J. G. *Biochemistry*. New York: John Wiley & sons, 1990, s. 1223. ISBN 0-471-61769-5.
- [73] SONG Y., FUNATSJU T., TSUNODA M. Amino acids analysis using a monolithic silica column after derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F). *Journal of Chromatography B*, 2011, 879, s. 335–340.
- [74] HUŠEK P., MACEK K. Gas chromatography of amino acids. *Journal of Chromatography A*, 1975, 113 (2), s. 139–230.
- [75] CHEN W-P., YANG X-Y., HEGEMAN D. A., GRAY M. W., COHEN D. J. Microscale analysis of amino acids using gas chromatography-mass spectrometry after methyl chloroformate derivatization. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878 (24), s. 2199–2208.
- [76] LORENZO M. P., VILLASENOR A., RAMAMOORTHY A., GARCIA A. Optimization and validation of capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: application to bipolar disorder study. *Electrophoresis*, 2013, 34 (11), s. 1701-1709 (abstrakt).
- [77] WAHL O., HOLZGRABE U. Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes. *Talanta*, 2016, 1554, s. 150–163.
- [78] SIMMACO M., BIASE De D., BARRA D., BOSSA F. Automated amino acid analysis using precolumn derivatization with dansylchloride reversed-phase high-

- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1990, 504, s. 129–138.
- [79] UEDA T., MITCHELL R., KITAMURA F., METCAFF T. Separation of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acids by high-performance capillary electrophoreses with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography A*, 1992, 593 (1-2), s. 265–274.
- [80] ZHANG L-Y., SUN M-X. Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with precolumn naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *Journal of chromatography A*, 2004, 1040 (1), s. 133–140.
- [81] LENTNER C. Geigy scientific tables, volume 4: biochemistry, metabolism of xenobiotics, inborn errors of metabolism, pharmacogenetics and ecogenetics. London: *Ciba-Geigy*, 1986, s. 1–330. ISBN 0-914168-53-3.
- [82] PSYCHOGIOS N., HAU D. D. PENG J., GUO A. C., MANDAL R., BOUATRA S., SINELNIKOV I., KRISHNAMURTHY R., EISNER R., GAUTAM B., YOUNG N., KNOX C., DONG E., HUANG P., HOLLANDER Z., PEDERSEN T. L., SMITH S. R., BAFORTH F., GREINER R., McMANUS B., NEWMAN J. W., GOODFRIEND T., WISHART D. S. The human serum metabolome. *Plos One*, 2011, 6 (2), s. 1–23.
- [83] YANG W., ROTH K. S. Defect in alpha-ketobutyrate metabolism: a new inborn error. *Clinica Chimica Acta*, 1985, 145 (2), s. 173–82.
- [84] TURCHANY J. M., LEUNG P. S., IWAYAMA T., JEFFERSON D. M., ISHIDA J., YAMAGUCHI M., MUNOZ S., DANNER D. J., DICKSON E. R., GERSHWIN M. E. Comparative metabolism and structure of BCKD-E2 in primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity*, 1993, 6 (4), s. 459–466.
- [85] DEUTSCH J. C. Determination of p-hydroxyphenylpyruvate, p-hydroxyphenyllactate and tyrosine in normal human plasma by gas chromatography-mass spectrometry isotope-dilution assay. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*, 1997, 690 (1-2), s. 1–6.
- [86] FUKUSHIMA T., IIZUKA H., YOKOTA A., SUZUKI T., OHNO Y., NISHIKIORI M., SEKI A., ICHIBA H., WATANABE Y., HONGO S., UTSUOMIYA M., NAKATANI M., SADAMOTO K., YOSHIO T. Quantitative analyses of schizophrenia-associated metabolites in serum: serum D-lactate levels are negatively correlated with gamma-glutamylcysteine in medicated schizophrenia patients. *Plos One*, 9 (7), s. 1–8.

- [87] CYNOBER L. A. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition*, 2002, 18 (9), s. 761–766.
- [88] TRABADO S., AL-SALAMEH A., CROIXMARIE V., MASSON P., CORRUBLE E., FEVE B., COLLE R., RIPOLL L., WALTHER B., BOURSIER-NEYRET C., WERNER E., BECQUEMONT L., CHANSON P. The human plasma-metabolome: reference values in 800 French healthy volunteers; impact of cholesterol, gender and age. *Plos One*, 2017, 12 (3), s. 1–17.
- [89] JIROŠOVÁ J. Stanovení oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Pardubice, 2008, Diplomová práce (Mgr.), Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd.
- [90] TOIFLOVÁ T. Stanovení vybraných aminokyselin v séru u pacientů s onemocněním jater. Pardubice, 2014, Diplomová práce (Mgr.), Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd.

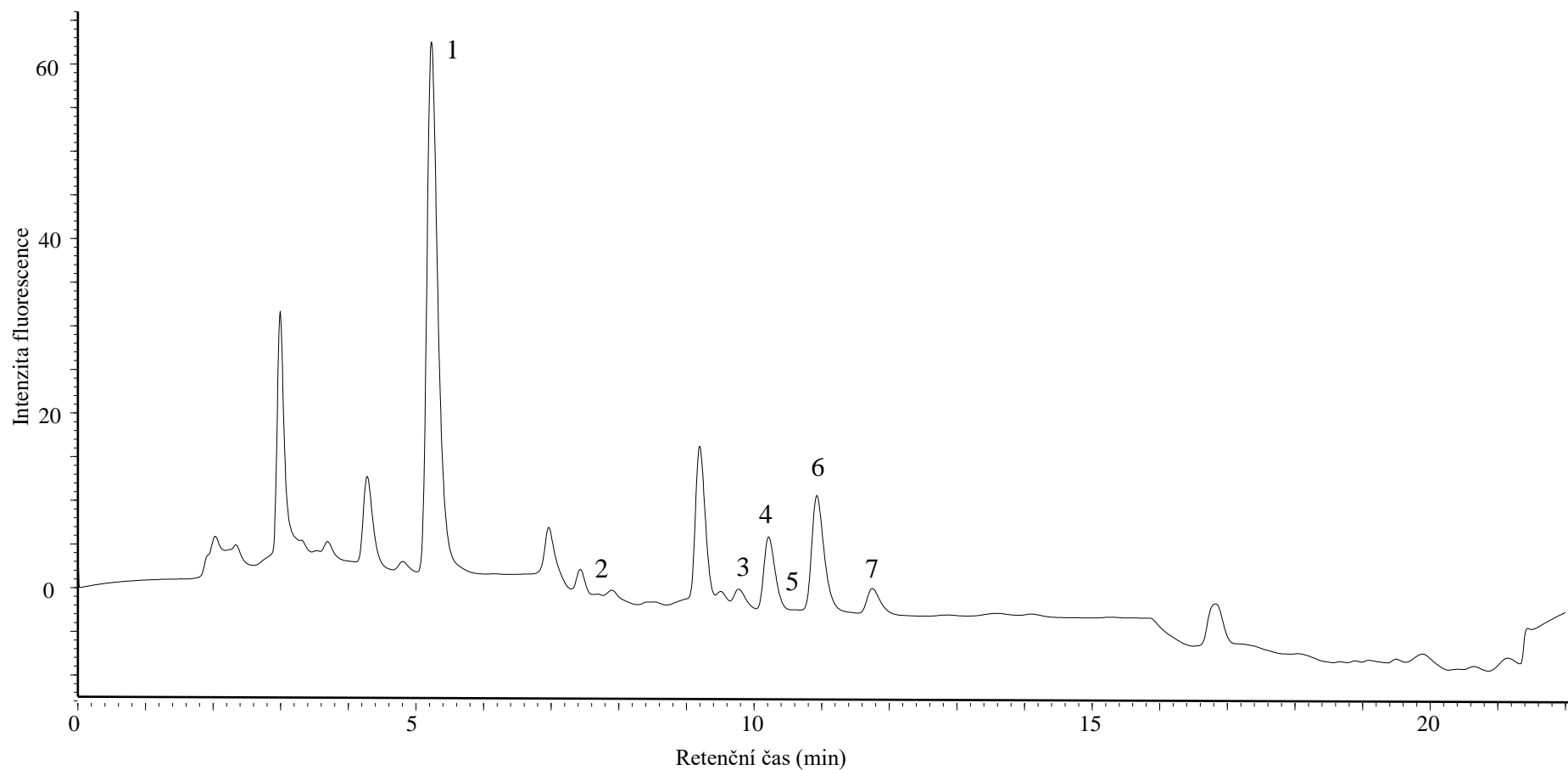
9 PŘÍLOHY

Příloha 1. HPLC chromatogramy stanovení vybraných 2-oxokyselin v směsném standardu po derivatizaci <i>ortho</i> -fenylendiaminem.....	92
Příloha 2. HPLC chromatogram stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci <i>ortho</i> -fenylendiaminem.....	93
Příloha 3. HPLC chromatogram stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem	94
Příloha 4. HPLC chromatogram stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-methyldioxybenzenem	95



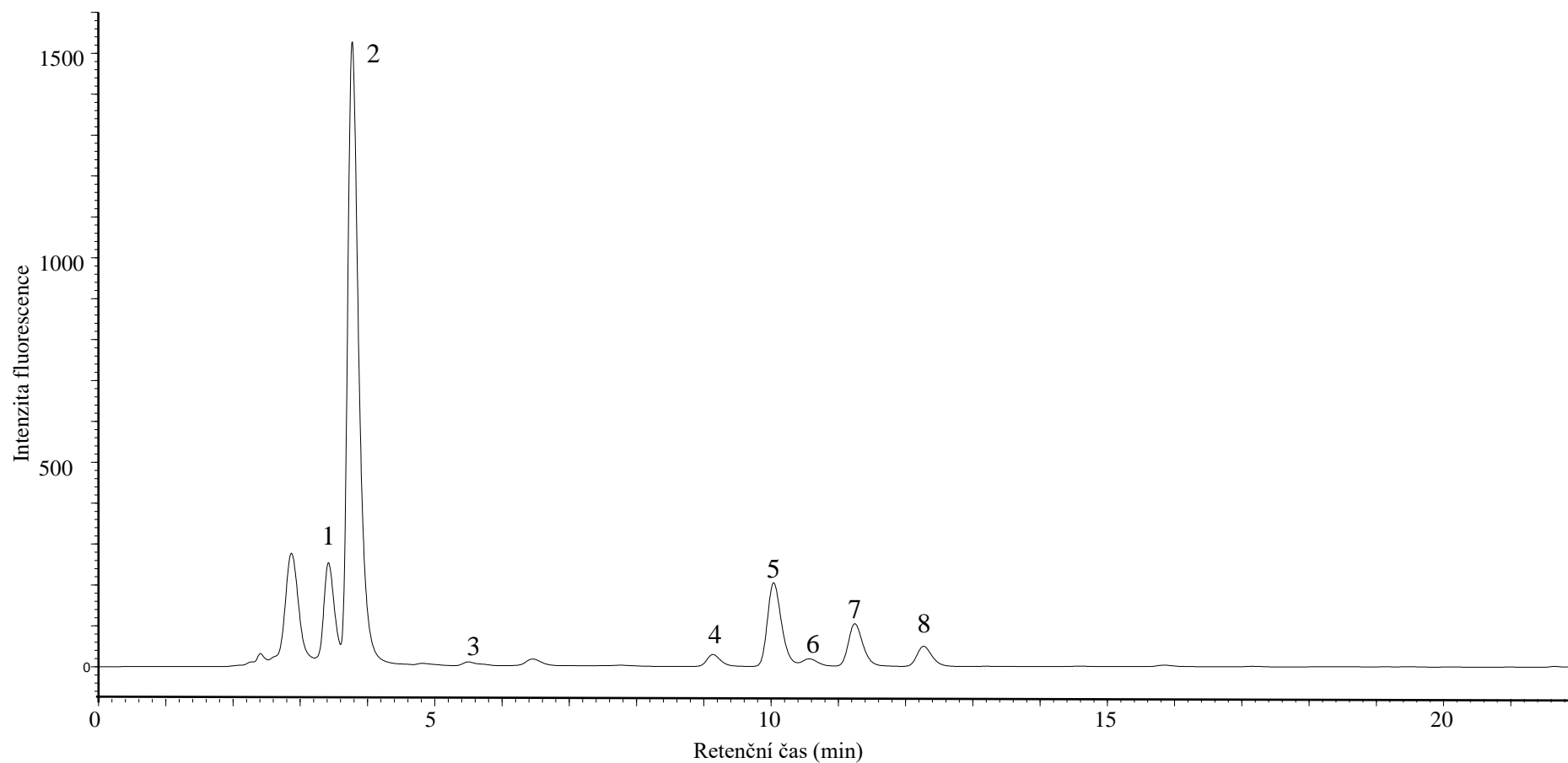
Příloha 1. HPLC chromatogramy stanovení vybraných 2-oxokyselin v směsném standardu po derivatizaci *ortho*-fenylendiaminem

Modrý chromatogram: směsný standard 2-oxokyselin; červený chromatogram: identický směsný standard 2-oxokyselin, který byl podroben lyofilizaci. Píky: 1, 2-oxoglutarát; 2, pyruvát; 3, 2-oxobutyrát; 4, 2-oxoisovalerát; 5, 2-oxoisokapronát; 6, fenylpyruvát; 7, 2-oxo-3-methylvalerát. HPLC podmínky: gradientová eluce (mobilní fáze A: 20% acetonitril v 25mmol/l Na₂HPO₄, pH 7,2; mobilní fáze B: 100% acetonitril; časový program: 0,00 min, 2 % B; 3,00 min, 2 % B; 3,01 min, 25 % B; 13,00 min, 50 % B; 13,01 min, 100 % B; 18,00 min, 100 % B; 18,01 min, 2 % B; 23,00 min, STOP), stacionární fází byla analytická kolona LichroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μm, opatřená ochrannou kolonou LichroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μm, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, separace probíhala při 37 °C, deriváty 2-oxokyselin byly monitorovány fluorescenčním detektorem (λ_{EX} 350 nm, λ_{EM} 410 nm)



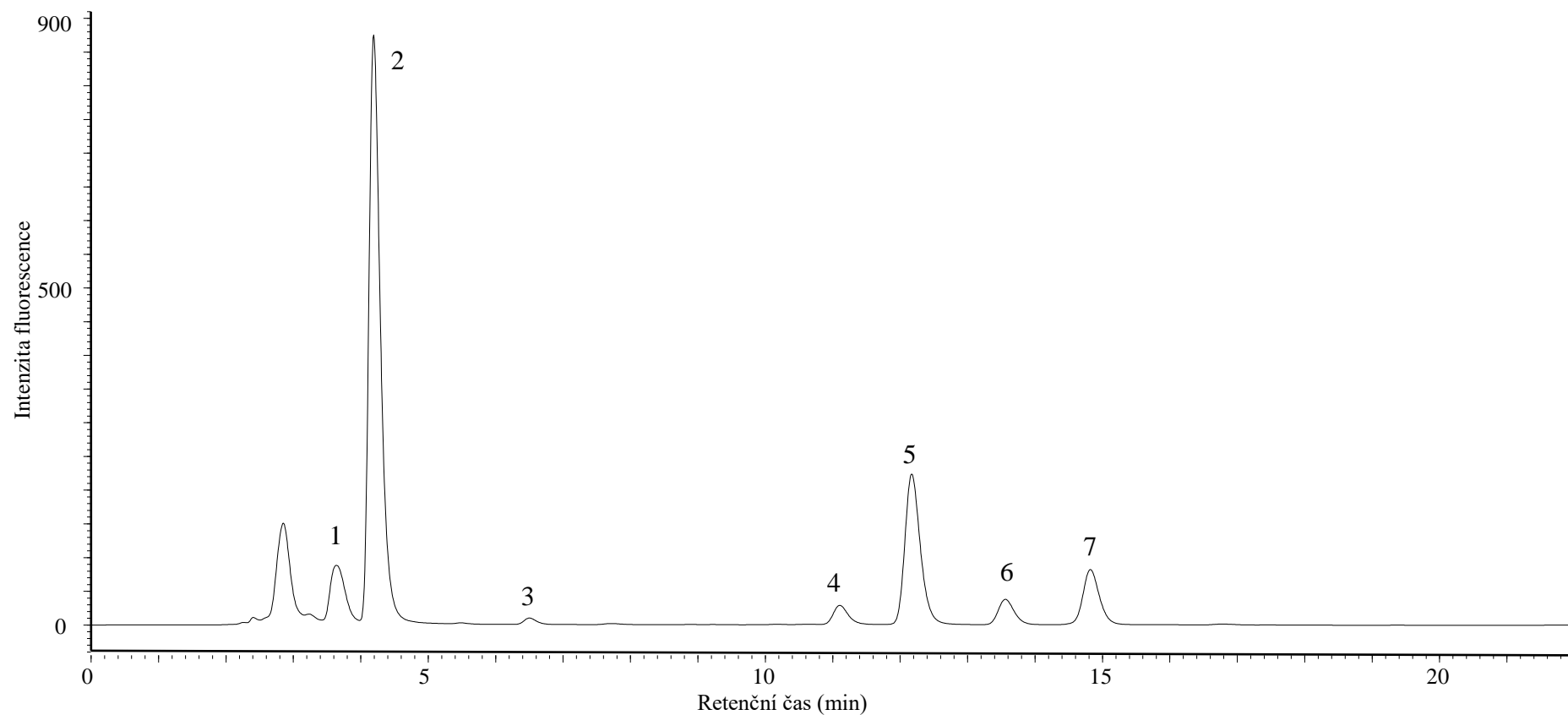
Příloha 2. HPLC chromatogram stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci *ortho*-fenylendiaminem

Píky: 1, pyruvát; 2, 2-oxobutyrát; 3, 2-oxoisovalerát; 4, 2-oxoisokapronát; 5, fenylpyruvát; 6, 2-oxokapronát (vnitřní standard); 7, 2-oxo-3-methylvalerát. HPLC podmínky: gradientová eluce (mobilní fáze A: 25% acetonitril ve vodě; mobilní fáze B: 100% acetonitril; časový program: 0,00 min, 2 % B; 3,00 min, 2 % B; 3,01 min, 35 % B; 13,00 min, 38 % B; 13,01 min, 100 % B; 18,00 min, 100 % B; 18,01 min, 2 % B; 22,00 min, STOP), stacionární fází byla analytická kolona LichroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm, opatřená ochrannou kolonou LichroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, separace probíhala při 37 °C, deriváty 2-oxokyselin byly monitorovány fluorescenčním detektorem (λ_{EX} 350 nm, λ_{EM} 410 nm)



Příloha 3. HPLC chromatogram stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenem

Píky: 1, 2-oxoglutarát; 2, pyruvát; 3, 2-oxobutyrát; 4, 2-oxoisovalerát; 5, 2-oxoisokapronát; 6, fenylypyruvát; 7, 2-oxokapronát (vnitřní standard); 8, 2-oxo-3-methylvalerát. HPLC podmínky: gradientová eluce (mobilní fáze A: 25% acetonitril ve vodě; mobilní fáze B: 100% acetonitril; časový program: 0,00 min, 10 % B; 13,00 min, 27 % B; 13,01 min, 100 % B; 18,00 min, 100 % B; 18,01 min, 10 % B; 22,00 min, STOP), stacionární fázi byla analytická kolona LichroCart 125 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μ m, opatřená ochrannou kolonou LichroCart 4 x 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μ m, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, separace probíhala při 37 °C, deriváty 2-oxokyselin byly monitorovány fluorescenčním detektorem (λ_{EX} 370 nm, λ_{EM} 445 nm)



Příloha 4. HPLC chromatogram stanovení vybraných 2-oxokyselin v suché kapce krve po derivatizaci 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzenem

Píky: 1, 2-oxoglutarát; 2, pyruvát; 3, 2-oxobutyát; 4, 2-oxoisovalerát; 5, 2-oxoisokapronát; 6, 2-oxo-3-methylvalerát; 7, 2-oxokapronát (vnitřní standard), koeluce s fenylpyruvátém. HPLC podmínky: viz příloha 3.