

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení alantoinu a kyseliny močové v suché kapce krve metodou HPLC
s hmotnostní detekcí

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Pekařová**
Osobní číslo: **C19589**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Stanovení alantoinu a kyseliny močové v suché kapce krve metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Suchá kapka krve.

Možnosti stanovení alantoinu a kyseliny močové v biologických vzorcích.

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část:

Zpracování vzorků suché kapky krve pro simultánní stanovení alantoinu a kyseliny močové metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Zavedení metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro simultánní stanovení alantoinu a kyseliny močové v lidské krvi.

Určení analytických parametrů metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro simultánní stanovení alantoinu a kyseliny močové v lidské krvi.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Michal Kopčil**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení kyseliny močové a alantoinu v suché kapce krve metodou HPLC s hmotnostní detekcí 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. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23. 7. 2021

Lenka Pekařová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Michalu Kopčilovi, za jeho cenné rady, poskytnuté informace a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D za vedení mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala celé své rodině a nejbližším přátelům, kteří mě během studia plně podporovali.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro simultánní stanovení kyseliny močové a alantoinu v suché kapce krve. První část se věnuje popisu kyseliny močové a alantoinu. Dále je popsána technika odběru suché kapky krve a kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. V experimentální části je prezentován způsob přípravy vzorků a optimalizace podmínek pro stanovení kyseliny močové a alantoinu a následné použití metody pro měření reálných vzorků odebraných technikou suché kapky krve.

KLÍČOVÁ SLOVA

alantoin, kyselina močová, kapalinová chromatografie, suchá kapka krve

TITLE

Determination of uric acid and allantoin in dried blood spot by HPLC with mass detection

ANNOTATION

This diploma thesis comprises developing and optimizing a liquid chromatography method with mass detection for simultaneous determination of uric acid and allantoin in a dried blood spot. The first part comprises the description of uric acid and allantoin. There is also described the dried blood spot collection technique and the description of liquid chromatography with mass detection. The experimental part presents a method of sample preparation and optimization of conditions for the determination of uric acid and allantoin and the subsequent use of the method for measuring real samples collected by the dried blood spot technique.

KEYWORDS

allantoin, uric acid, liquid chromatography, dried blood spot

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Seznam zkratk | 9 |
| Seznam obrázků, tabulek a GRAFŮ | 11 |
| Úvod | 13 |
| Cíl práce | 14 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 15 |
| 1.1 Kyselina močová..... | 15 |
| 1.1.1 Biochemické a fyziologické funkce kyseliny močové | 15 |
| 1.1.2 Metabolismus kyseliny močové | 16 |
| 1.1.3 Patofyziologické vlastnosti kyseliny močové..... | 18 |
| 1.1.4 Možnosti stanovení kyseliny močové..... | 21 |
| 1.2 Alantoin..... | 23 |
| 1.2.1 Vlastnosti a funkce alantoinu | 24 |
| 1.2.2 Stanovení alantoinu | 26 |
| 1.3 Suchá kapka krve | 27 |
| 1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie..... | 30 |
| 1.5 Hmotnostní spektrometrie..... | 32 |
| 2 Experimentální část | 34 |
| 2.1 Vzorky krve..... | 34 |
| 2.1.1 Odběr vzorků krve na odběrovou kartu | 34 |
| 2.1.2 Odběr plné krve | 34 |
| 2.2 Pomůcky..... | 34 |
| 2.3 Chemikálie | 36 |
| 2.4 Pracovní roztoky | 36 |
| 2.5 Test lýzy erytrocytů | 38 |
| 2.6 Příprava standardů alantoinu a kyseliny močové pro konstrukci kalibrační křivky | 39 |
| 2.7 Optimalizace Extrakce | 39 |
| 2.7.1 Příprava vzorků..... | 39 |
| 2.7.2 Zpracování vzorků..... | 39 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.8 | Příprava vzorků pro testování různých objemů krve aplikovaných na odběrovou kartu.. | 40 |
| 2.9 | Příprava vzorků pro testování stability kyseliny močové a alantoinu | 40 |
| 2.10 | Příprava vzorků pro stanovení přesnosti v sérii a mezi sériemi..... | 40 |
| 2.11 | Zpracování vzorků suché kapky krve | 41 |
| 2.12 | Analytické parametry metody | 41 |
| 2.13 | Chromatografické podmínky | 42 |
| 2.14 | Zpracování výsledků | 43 |
| 3 | Výsledky a Diskuze | 44 |
| 3.1 | Příprava kalibračních standardů pro stanovení kyseliny močové a alantoinu v suché kapce krve | 44 |
| 3.2 | Optimalizace podmínek kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru | 45 |
| 3.2.1 | Hmotnostní spektrometrie | 45 |
| 3.2.2 | Kapalinová chromatografie | 46 |
| 3.3 | Test účinnosti extrakčního činidla | 47 |
| 3.4 | Test účinnosti sonifikace při extrakci alantoinu a kyseliny močové ze suché kapky krve..... | 49 |
| 3.5 | Test různých objemů krve aplikovaných na odběrovou kartu | 52 |
| 3.6 | Stabilita alantoinu a kyseliny močové v suché kapce krve | 53 |
| 3.7 | Analytické parametry metody | 54 |
| 3.8 | Určení orientačních hladin kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získanou technikou suché kapky krve..... | 56 |
| 4 | Závěr | 58 |
| | Použitá literatura | 59 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| ACN | Acetonitril |
| AMK | Aminokyselina |
| AMP | Adenosinmonofosfát |
| APCI | Chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APRT | Adeninfosforibosyltransferasa |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| CI | Chemická ionizace |
| DBS | Suchá kapka krve |
| DESI | Desorpční elektrosprejová ionizace |
| DI | Desorpční ionizace |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| EI | Elektronová ionizace |
| ESI | Ionizace elektrosprejem |
| GC | Plynová chromatografie |
| GMP | Guanosinmonofosfát |
| HILIC | Hydrofilní interakční chromatografie |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HPRT | Hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasa |
| IMP | Inosinmonofosfát |
| IS | Vnitřní standard |
| KM | Kyselina močová |
| LC | Kapalinová chromatografie |
| MALDI | Desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice |
| MF | Mobilní fáze |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| MS/MS | Tandemová hmotnostní spektrometrie |
| MSU | Urát monosodný |
| NADP | Nikotinamidadenindinukleotidfosfát |
| NK | Nukleová kyselina |
| PKU | Fenylketonurie |
| PRPP | 5'-ribosyl-1-bisfosfát |
| RNA | Ribonukleová kyselina |

| | |
|-----|--------------------------------|
| ROS | Reaktivní sloučeniny kyslíku |
| RP | Reverzní fáze |
| SF | Stacionární fáze |
| TLC | Chromatografie na tenké vrstvě |

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Strukturní vzorec kyseliny močové | 15 |
| Obrázek 2: Inosinmonofosfát | 16 |
| Obrázek 3.: Syntéza kyseliny močové..... | 17 |
| Obrázek 4: Enzymatické stanovení kyseliny močové | 21 |
| Obrázek 5: Elektrochemická reakce KM..... | 23 |
| Obrázek 6: Strukturní vzorec alantoinu..... | 24 |
| Obrázek 7: Enzymatická a neenzymatická syntéza alantoinu | 25 |
| Obrázek 8: Reakce kyseliny močové s volnými radikály za vzniku vybraných produktů. | 26 |
| Obrázek 9: Odběrová karta Whatman 903 s odebraným vzorkem krve..... | 28 |
| Obrázek 10: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie..... | 30 |
| Obrázek 11: Ionizace elektrosprejem | 33 |
| | |
| Tabulka 1: Konečné produkty metabolismu purinů | 18 |
| Tabulka 2: Koncentrace standardů pro sestrojení kalibrační křivky | 39 |
| Tabulka 3: Chromatografické podmínky..... | 42 |
| Tabulka 4: Optimalizované podmínky pro hmotnostní spektrometrii | 43 |
| Tabulka 5: Optimalizace podmínek pro HPLC-MS..... | 46 |
| Tabulka 6: Test účinnosti sonifikace při extrakci alantoinu a kyseliny močové ze suché kapky krve..... | 49 |
| Tabulka 7: Stabilita alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve uchovávaných při laboratorní teplotě..... | 54 |
| Tabulka 8: Stabilita alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve uchovávaných při 4 °C | 54 |
| Tabulka 9: Přesnost metody pro stanovení kyseliny močové v suché kapce krve | 55 |
| Tabulka 10: Přesnost metody pro stanovení alantoinu v suché kapce krve | 55 |
| Tabulka 11: Parametry kalibračních křivek metody pro stanovení kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích suché kapky krve | 56 |
| Tabulka 12: Hladiny kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou suché kapky krve (všichni)..... | 56 |
| Tabulka 13: Hladiny kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou suché kapky krve (ženy)..... | 57 |

| | |
|--|----|
| Tabulka 14: Hladiny kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou suché kapky krve (muži) | 57 |
| Graf 1: Závislost plochy píků alantoinu na koncentraci acetonitrilu v elučním činidle | 48 |
| Graf 2: Závislost plochy píků kyseliny močové na koncentraci acetonitrilu v elučním činidle | 48 |
| Graf 3: Závislost velikosti plochy píku alantoinu na době extrakce | 50 |
| Graf 4: Závislost poměru plochy píku alantoinu a IS na době extrakce | 50 |
| Graf 5: Závislost velikosti plochy píku kyseliny močové na době extrakce | 51 |
| Graf 6: Závislost poměru plochy píku kyseliny močové a IS na době extrakce | 51 |
| Graf 7: Závislost koncentrace alantoinu na objemu krve aplikované na odběrovou kartu. | 52 |
| Graf 8: Závislost koncentrace kyseliny močové na objemu krve aplikované na odběrovou kartu..... | 53 |

ÚVOD

Oxidační stres je důsledek nerovnováhy mezi produkcí volných kyslíkových radikálů a antioxidační obranou, který může vést až k poškození tkáně. Volné radikály jsou produkty celé řady biochemických reakcí nebo se do organismu dostávají z vnějšího prostředí. Kyselina močová je významným extracelulárním antioxidantem. U většiny savců je kyselina močová dále odbourávána na alantoin. Metodami molekulární biologie bylo zjištěno, že lidé mají v oblasti genu pro urátidasu několik „nonsense“ mutací, proto k expresi tohoto genu nedochází, ačkoli je stále přítomen. Kyselina močová může být oxidována některými reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS) na alantoin. Alantoin by tak mohl být ukazatelem oxidačního stresu.

Simultánní stanovení kyseliny močové a alantoinu je poměrně obtížné z důvodu nízkých koncentrací alantoinu v biologických vzorcích. Z tohoto důvodu je nutné použít dostatečně specifickou a citlivou metodu. Plynová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí je dostatečně citlivá metoda, ale vyžaduje derivatizaci alantoinu i kyseliny močové. Proto je vhodnější metodou kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS), kde není potřeba derivatizace. Výhodou metody HPLC-MS je její jednoduchost, nízké náklady na provoz bez negativního dopadu na přesnost, výtěžnost a specifitu.

V současné době jsou kladeny vysoké požadavky na co nejjednodušší odběr vzorku. Jedním z možných způsobů odběru vzorku je technika suché kapky krve. Tato technika je jednoduchá a jen málo invazivní. Odběrové karty se snadno přepravují a uchovávají. Tato technika nevyžaduje pro odběr vzorku kvalifikovaný personál.

Tato diplomová práce je zaměřena na zavedení metody kapalinové chromatografie pro simultánní stanovení alantoinu a kyseliny močové v suché kapce krve.

CÍL PRÁCE

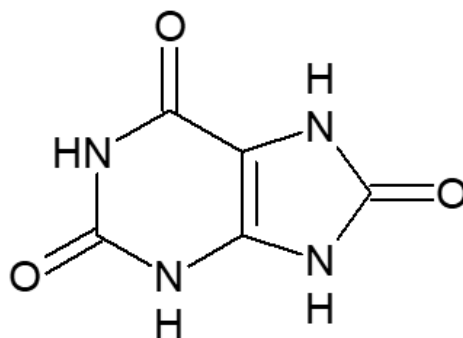
Cílem této diplomové práce je vyvinout dostatečně citlivou, specifickou a rychlou metodu pro simultánní stanovení kyseliny močové a alantoinu ze vzorků odebraných technikou suché kapky krve, která by mohla být využita k monitorování oxidačního stresu u lidí.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kyselina močová

2,6,8-Trioxypurin neboli kyselina močová (KM) je konečným produktem metabolismu purinů u lidí (obrázek 1). KM je syntetizována z xanthinu za katalýzy enzymem xanthinoxidasou [1–5].

Krystaly KM poprvé popsal Antoni van Leeuwenhoek v roce 1679 v dnavém tofu a o 50 let později William Stukeley. KM byla poprvé izolována švédským chemikem Carlem Wilhemem Scheeleem z močových kamenů. První vědec, který prokázal souvislost mezi dnou a zvýšenými hladinami KM, byl Alfred Garrod. Tím připravil cestu pro další studie zabývající se fyziologickou úlohou, kterou tato sloučenina hraje při onemocnění lidí. Dalším lékařem, který se podílel na úplném porozumění patologického významu KM, byl Frederic A. Mohamed. Ten popsal souvislost mezi vyššími hladinami kyseliny močové a hypertenzí [6, 7].



Obrázek 1: Strukturální vzorec kyseliny močové

1.1.1 Biochemické a fyziologické funkce kyseliny močové

Za normálních podmínek, při pH 7,4, se KM v plazmě vyskytuje z větší části jako monosodná sůl, která je rozpustná do koncentrace asi $0,42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Konkrétně se hladina KM v plazmě pohybuje u žen mezi 120 až $350 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a u mužů mezi 180 až $420 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. KM je po albuminu nejvýznamnějším extracelulárním antioxidantem. Aby se látka mohla definovat jako antioxidant, musí splňovat tři předpoklady. Musí mít především schopnost interagovat s biologicky relevantními oxidanty a radikály. Po reakci s těmito radikály musí být produkt fyziologicky méně škodlivý než působící radikál. Nakonec musí být daná látka přítomna v dostatečné koncentraci, aby byl zajištěn kvalitativně relevantní stupeň její reakce.

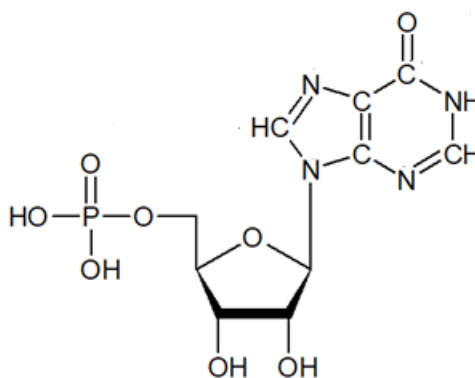
V krvi KM chrání erythrocyty před poškozením ROS. Dále inhibuje peroxidaci lipidů, brání oxidaci hemoglobinu dusitany a chrání DNA před poškozením volnými radikály. Větší význam má schopnost KM vytvářet stabilní koordinační komplexy s ionty některých přechodných kovů. Tímto mechanismem inhibuje kyselina močová Fentonovu reakci [8].

KM je slabá kyselina ($pK \sim 5,8$), která je málo rozpustná ve vodě. Při vyšších koncentracích je KM významným rizikovým faktorem u chronického onemocnění ledvin, kardiovaskulárního onemocnění, hypertenze, diabetu a metabolického syndromu. Vysoké hladiny KM lze také detekovat v cytosolu buněk, a to především v hepatocytech a vaskulárních endoteliálních buňkách [4, 5, 9–12].

1.1.2 Metabolismus kyseliny močové

Metabolismus KM je složitý proces zahrnující mnoho enzymů, které se podílejí na přeměně dvou purinových nukleotidů, adeninu a guaninu na KM. Puriny jsou důležité biomolekuly, které jsou součástí takových molekul, jako jsou guanosintrifosfát (GTP), adenosintrifosfát (ATP), cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP) a koenzym A. Jsou také stavebními kameny DNA a RNA. V potravě se puriny nejvíce vyskytují v mase a masných výrobcích, dále pak v droždí [14].

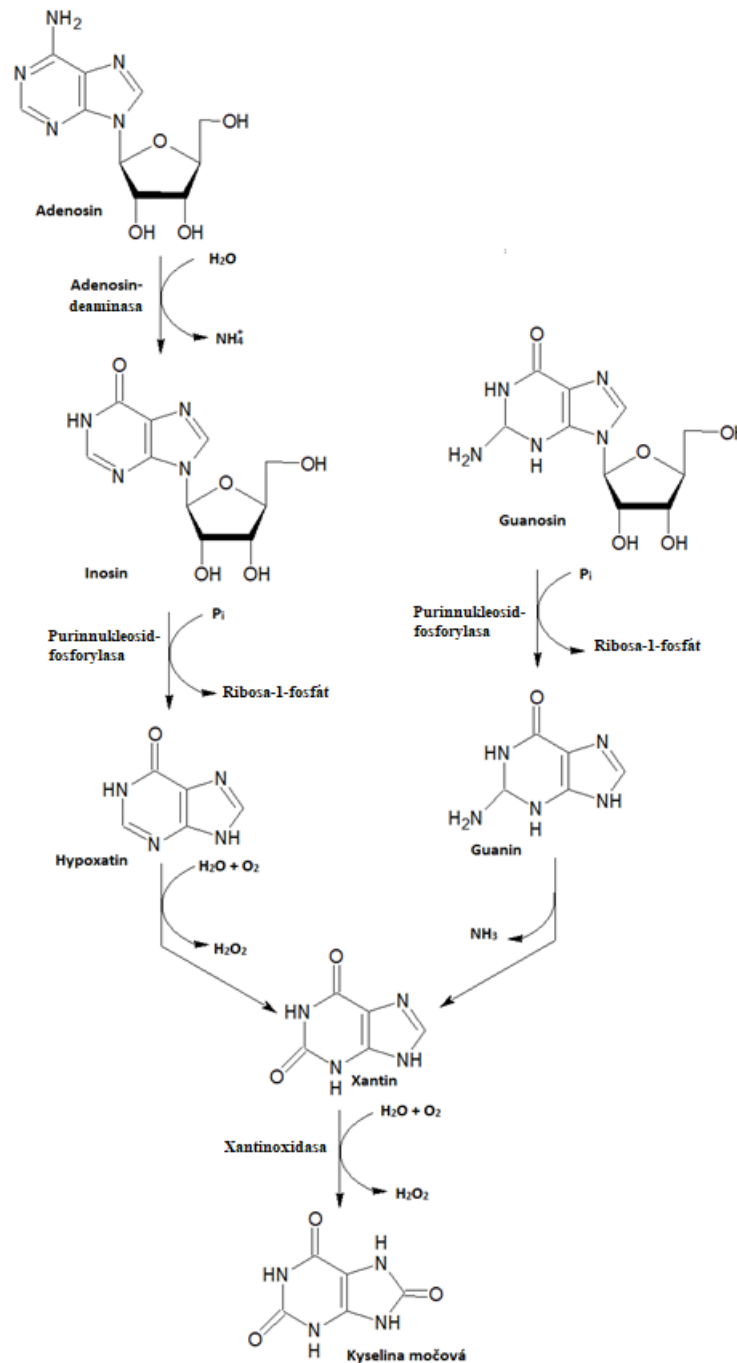
Syntéza purinů vychází z ribosa-5-fosfátu, který je specifickou kinasou fosforylován na 5'-ribosyl-1-bisfosfát (PRPP). Na cukernou složku se napojují jednotlivé části vznikající báze, kterou je inosinmonofosfát (obrázek 2). Adenosinmonofosfát (AMP) vzniká z inosinmonofosfátu (IMP) aminací kyslíku na uhlíku C6 cyklu, donorem dusíku je aspartát. Guanosinmonofosfát (GMP) vzniká z IMP tak, že nejprve je IMP oxidován na xanthosinmonofosfát (XMP) a ten je aminací přeměněn na GMP, kde donorem dusíku je glutamin [13, 14].



Obrázek 2: Inosinmonofosfát

1.1.2.1 Syntéza kyseliny močové

Odbourávání purinových nukleotidů probíhá prakticky jen v játrech. Z nukleotidů vznikají nukleosidy, pak báze a konečným produktem odbourávání purinů je u lidí KM (obrázek 3).



Obrázek 3.: Syntéza kyseliny močové

1.1.2.2 Odbourání kyseliny močové

U lidí nedochází k oxidaci KM na rozpustnější alantoin, protože mají v oblasti genu pro urátoxidasu několik „*nonsense*“ mutací, proto k expresi tohoto genu nedochází, ačkoli je stále přítomen. Gen pro urátoxidasu nejspíš prošel funkční mutací v raných fázích vývoje hominoidů, výsledkem jsou vyšší hladiny KM v krvi.

KM je volně filtrována v glomerulech ledvin a více jak 90 % filtrované KM je resorbováno v proximálním tubulu. V distální části proximálního tubulu je znovu vylučována a následně zpětně resorbována postsekreční reabsorbací. To vše se děje díky transportérům organických aniontů. KM je transportována transportérem URAT1 v apikální membráně proximálních tubulárních buněk výměnou za anionty transportované směrem k lumen tubulů. KM je z organismu vylučována také gastrointestinálním traktem a malá část potem [17].

Pro odbourání KM až na amoniak a oxid uhličitý jsou potřebné enzymy urátoxidasa (urikasa), alantoinasa, alantoinkasa a ureasa. Tyto enzymy však nejsou zastoupeny u všech živočichů. Konečné produkty metabolismu purinů u různých organismů jsou uvedeny v Tabulce 1 [16, 18, 19].

Tabulka 1: Konečné produkty metabolismu purinů

| Produkt metabolismu purinů | Organismy |
|-----------------------------------|--|
| Kyselina močová | Člověk a jiní primáti, ptáci, plazi, kruhoústí, hmyz (mimo dvoukřídlých) |
| Alantoin | Savci mimo člověka a ostatních primátů, dvoukřídlí a plži |
| Kyselina alantoinová | Ryby lososovité, platýsové, úhořovité |
| Močovina a kyselina glyoxalová | Ryby, obojživelníci, sladkovodní a mořští lístožábří, sumýšovci, korýši |

1.1.3 Patofyziologické vlastnosti kyseliny močové

1.1.3.1 Hyperurikémie

Hyperurikémie je definována jako dlouhodobě zvýšená koncentrace KM v plazmě, kde u žen je hladina vyšší jak $350 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a u mužů $416 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, se dělí na primární a sekundární.

Primární hyperurikémie je nejčastěji spojována s vrozenými defekty enzymů metabolismu purinů nebo s defekty v genech pro transportní molekuly v tubulech ledvin. Sekundární hyperurikémie je nejčastěji zapříčiněná poruchou vylučování KM ledvinami, nadprodukcí KM nebo zvýšeným příjmem purinů v jídle. Nadprodukce KM může vznikat u karcinomů, těžší formy psoriázy, myeloproliferativního a lymfoproliferativního onemocnění, cytotoxické léčby nebo hemolytické anémie. Hyperurikémie zvyšuje riziko akutního poškození ledvin, zhoršuje kontraktilní aktivitu intraglomerulárních mezangiálních buněk.

Zvýšená tvorba a zhoršené vylučování KM ledvinami, nebo jejich kombinace, vede k hyperurikémii. KM se může hromadit v ledvinách, což vede k vzniku kamenů. Ledvinové kameny a infekce močových cest jsou nejčastějšími problémy močových cest. Patologicky zvýšené hladiny KM nad její fyziologickou hladinu vede k jejímu vysrážení ve formě krystalů urátu monosodného (MSU). Nejdůležitějším rizikovým faktorem pro krystalizaci KM a tvorbu kamenů je nízké pH moči (pod 5,5) a zhoršené vylučování KM močí. Hlavními příčinami nízkého pH moči, vedle zhoršeného vylučování KM, jsou chronický průjem, těžká dehydratace a diabetická ketoacidóza. [4, 19–22].

Pokud není hyperurikémie léčena, vede k rozvoji dny. Dna (*Arthritis uratica*) je zánětlivé metabolické onemocnění projevující se zvýšenými hodnotami KM v séru a atakami akutní artritidy. Krystaly MSU se ukládají hlavně v pojivových tkáních kloubů, šlach, ledvin a vzácně srdečních chlopních a perikardu. Snadno také interagují se sérovými proteiny. Krystaly MSU v dutinách kloubů interagují s makrofágy, žírnými buňkami, neutrofilů, monocytů, nehemopoetickými synoviálními a endotelovými buňkami. Dna postihuje více muže než ženy. Primární dna se dědí autosomálně dominantně. Příčinou sekundární dny je nejčastěji nadprodukce KM nebo porucha vylučování ledvinami. Ta může být způsobena diuretiky a jinými léky (například salicyláty), otravou olovem, chronickou renální insuficiencí, laktátovou acidózou, myxedémem, ketoacidózou, hypertyreózou a nebo nadměrnou konzumací alkoholu [4, 7, 17, 20].

Dále bylo prokázáno, že se hyperurikémie podílí na rozvoji hypertenze a kardiovaskulárních onemocněních. KM může pronikat do vláken hladkého svalstva cév prostřednictvím transportního systému organických aniontů, což vede k aktivaci několika signálních transdukčních drah a zvýšené expresi mediátorů zánětu. Důsledkem je nárůst arteriálního tlaku, hypertrofie buněk hladkého svalstva cév a akutní či chronická hypertenze. KM navíc indukuje dysfunkci vaskulárních endoteliálních buněk, konkrétně změnu buněčné proliferace [4, 23].

Dalším onemocněním, které je způsobeno hyperurikémií je inzulínová rezistence. Zvýšená hladina KM vede k endoteliální dysfunkci a následné inhibici produkce radikálu oxidu dusného. To přispívá k rozvoji inzulínové rezistenci. KM v séru je silným a nezávislým rizikovým faktorem pro diabetes u lidí středního a staršího věku a její zvýšená hladina významně koreluje se závažností albuminurie a diabetické retinopatie u pacientů s *diabetes mellitus* 2. typu. Nárůst spotřeby nápojů a potravin obsahující fruktosu vede k obezitě, rezistenci na insulin, výskytu cukrovky a také ke zvýšené tvorbě KM. Jelikož hexokinasa katalyzuje fosforylaci fruktosy, dochází k poklesu hladiny intracelulárních fosfátů a ATP. To vede k aktivaci deaminasy prostřednictvím AMP. AMP je katabolizován na IMP a ten může být dále přeměněn až na KM. KM se poté z buněk uvolňuje do krevního oběhu [4, 23].

S poruchou metabolismu KM také souvisí Kelley-Seegmillerův syndrom, Lesh-Nyhanův syndrom nebo zvýšená aktivita ATP-fosforibosylpyrofosfátsyntetasy. Kelley-Seegmillerův syndrom je způsoben částečným defektem hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT). Je to autosomálně recesivní onemocnění postihující hlavně muže, které se projevuje těžkou formou dny, urolitiázou a selháním ledvin. Lesh-Nyhanův syndrom je způsoben kompletním defektem HPRT. Je to dědičné onemocnění vázané na chromozom X, které postihuje muže. Jelikož defekt transportu KM tubuly je úplný, jedná se o nemoc neslučitelnou s delším životem. Zvýšená aktivita ATP-fosforibosylpyrofosfátsyntetasy vede k urikosurii a tvorbě urátových kamenů. Toto onemocnění je spojeno s mentální retardací, kardiomyopatií, polyneuropatií, megaloblastickou anémií, diabetem, zpomalením růstu a postižením funkce ledvin. Opět je to dědičné onemocnění vázané na X chromozom. Dalšími faktory ovlivňující tvorbu urátových kamenů může být dlouhodobé hladovění, kdy stoupá koncentrace laktátu v plazmě a dochází ke ketóze a hyperurikémii, nebo iatrogenní vlivy a při konzumaci alkoholu, kdy konzumací alkoholu se mírně okyseluje moč a snižuje se rozpustnost KM v moči [19].

1.1.3.2 Hypourikémie

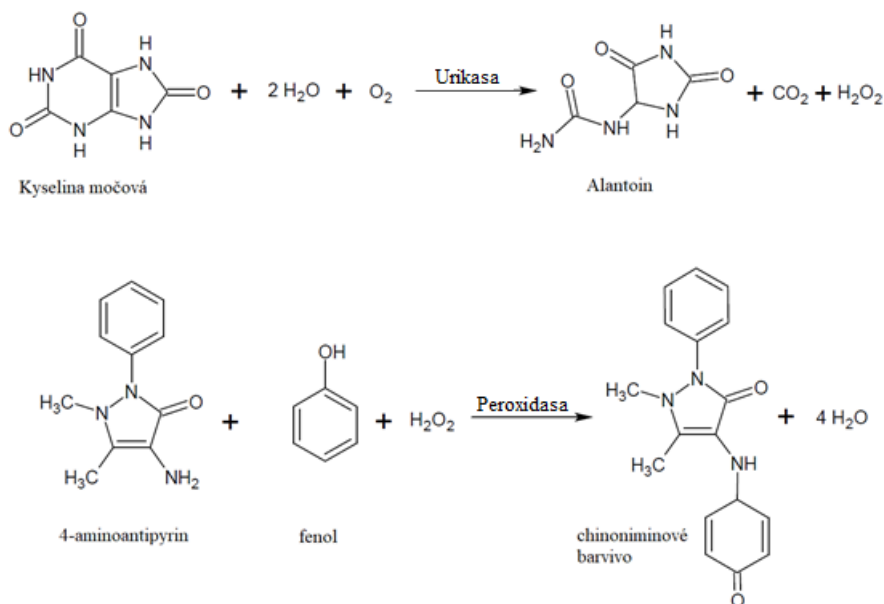
Dědičná xanthinurie je autosomálně recesivní onemocnění způsobené nedostatkem enzymu xanthinoxidasy, který vede ke snížení produkce KM. Tato porucha vede k nízkým hladinám KM a vysokým hladinám xanthinu v moči. Hypourikémii mohou způsobovat také například některé léky, jako jsou alopurinol a febuxostat. Dalšími léčivy snižující hladinu KM v séru jsou probenecid, benzbromaron, blokátory receptorů pro angiotenzin II, fenofibrát a další. Hypourikémie se také vyskytuje u pacientů s diabetem nebo u onemocnění jater, jako je cholangiokarcinom, virová hepatitida a primární biliární cirhóza. Další onemocnění,

u kterých se může vyskytnout hypourikémie je například Hodgkinova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba a roztroušená skleróza [24].

1.1.4 Možnosti stanovení kyseliny močové

V průběhu let bylo popsáno mnoho různých metod pro stanovení KM v biologických vzorcích. Patří sem například plynová chromatografie (GC), hmotnostní spektrometrie (MS), HPLC, kolorimetrické, amperometrické a voltametrické metody.

Přímá detekce KM je obtížná, proto je doporučenou a rutinně využívanou metodou v klinických laboratořích enzymatická metoda. Použití enzymatických metod bylo poprvé navrženo na počátku 20. století. V roce 1941 Bulger a Johns navrhli pro stanovení hladiny KM metodu využívající enzymu urikasu. KM se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy urikasu na allantoin, CO_2 a H_2O_2 . Sleduje se buď úbytek KM při 293 nm, nebo se stanovuje Trinderovou reakcí vzniklý H_2O_2 . Při této reakci reaguje peroxid s 4-aminoantipyrinem a fenolem v přítomnosti enzymu peroxidasy, vzniká chinonmonoiminové barvivo, které se stanovuje spektrofotometricky (obrázek 4). Při stanovení interferují redukující látky jako je glukosa, bilirubin nebo kyselina askorbová, které jsou peroxidem oxidovány [25, 26].



Obrázek 4: Enzymatické stanovení kyseliny močové

1.1.4.1 Chemiluminiscenční metoda stanovení kyseliny močové

Chemiluminiscence je oblíbená metoda kvůli své vysoké citlivosti, nízkému detekčnímu limitu, širokému lineárnímu pracovnímu rozsahu a své rychlosti. Tato metoda je založená na fluorescenci, která je vyvolána chemickou reakcí, kdy po přechodu molekuly z excitovaného stavu na základní hladinu emituje světlo. Lze ji provádět relativně jednoduchou a levnou instrumentací, kde zdroj buzení a optické filtry nejsou potřeba. Je široce používána v různých oblastech, včetně klinické diagnostiky, biotechnologie, farmakologie, bezpečnosti potravin a chemie životního prostředí [27, 28].

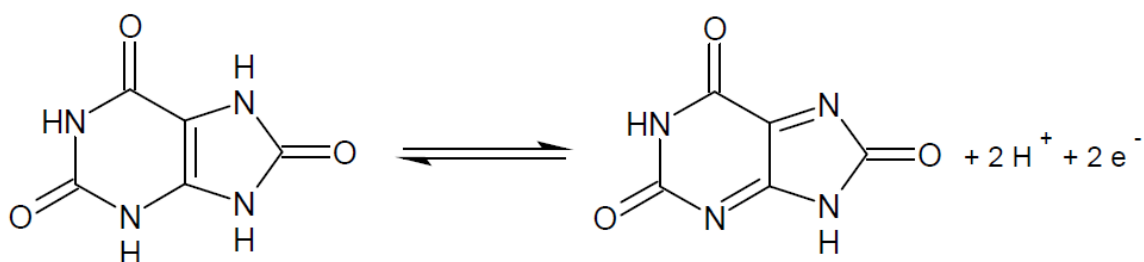
1.1.4.2 Metoda kapilární elektroforézy pro stanovení kyseliny močové

Kapilární elektroforéza je obecně atraktivní alternativou pro analýzu klinických vzorků. Tato metoda má vysokou účinnost separace, což umožňuje stanovení různých druhů metabolitů ve složitých maticích s minimální předúpravou vzorku a krátkou dobou analýzy. Navíc požadované objemy jsou malé, což představuje velkou výhodu při analýze biologických vzorků. Pro stanovení KM byla vyvinuta metoda kapilární elektroforézy s chemiluminiscenční detekcí. Tato metoda je rychlá, citlivá a reprodukovatelná pro stanovení KM v moči a séru [29, 30].

1.1.4.3 Elektrochemické metody pro stanovení kyseliny močové

Technika detekce elektrochemickým senzorem je určena reakcí, při které vzniká potenciál (potenciometrický), měřitelný proud (amperometrický) nebo změna vodivosti (konduktometrický) elektrod. Elektrochemický senzor, kterým je běžně používaný tříelektrodový systém, se skládá z pracovní, referenční a pomocné elektrody. Oxidoredukční reakce KM je znázorněna na obrázku 5. K detekci KM byl vyvinut jednoduchý a efektivní elektrochemický senzor. Jedná se modifikovanou elektrodu z uhlíkových vláken na bázi grafenu. Grafen je dvourozměrný materiál, který poskytuje vynikající vlastnosti, jako je vysoká mechanická pevnost, velká povrchová plocha, dobrá vodivost a nízkonákladová výroba.

Tato elektroda je vhodná pro detekci KM díky její dobré selektivitě, vysoké citlivosti, širokému lineárnímu rozsahu a nízké výrobní ceně [31].



Obrázek 5: Elektrochemická reakce KM

1.1.4.4 Metoda plynové chromatografie pro stanovení kyseliny močové

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda, která je založena na rozdílu distribuce látek mezi mobilní (MF) a stacionární fází (SF). Mobilní fáze je nosný plyn, který je nejčastěji vodík, dusík, helium nebo argon a stacionární fáze je náplň kolony. Kombinace GC s MS představuje účinnou separační metodu s vysoce citlivou detekcí, řádově v desetinách až setinách $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. GC-MS je široce používanou metodou pro stanovení KM v biologických tekutinách. Národní institut pro standardy a technologie zvolil GC-MS s isotopovým zředěním jako definitivní metodu pro stanovení KM. [22, 32].

1.1.4.5 Metoda kapalinové chromatografie pro stanovení kyseliny močové

Kapalinová chromatografie má vysokou účinnost separace, dobrou selektivitu, vysokou citlivost detekce, široký lineární rozsah a automatizaci. Pro detekci KM se používají UV a elektrochemické (EC) detektory nebo tandemový hmotnostní detektor (MS/MS). Separace nejčastěji probíhá na koloně s vázanou reverzní fází [26].

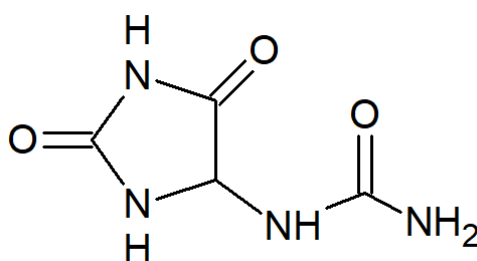
1.2 Alantoin

První zmínka o alantoinu se pravděpodobně datuje do roku 1838, kdy bylo prokázáno, že KM může být oxidována na alantoin. Hladina alantoinu v lidském těle se ukázala být vhodným ukazatelem oxidačního stresu. Oxidací KM cytochromem *c* vzniká alantoin. Význam může mít u pacientů s Reyeovým syndromem, u nichž byla prokázána zvýšená hladina KM.

Reyeův syndrom je těžké onemocnění s poškozením jater (steatózou) a některých dalších orgánů včetně mozku (encefalopatie) [33, 34].

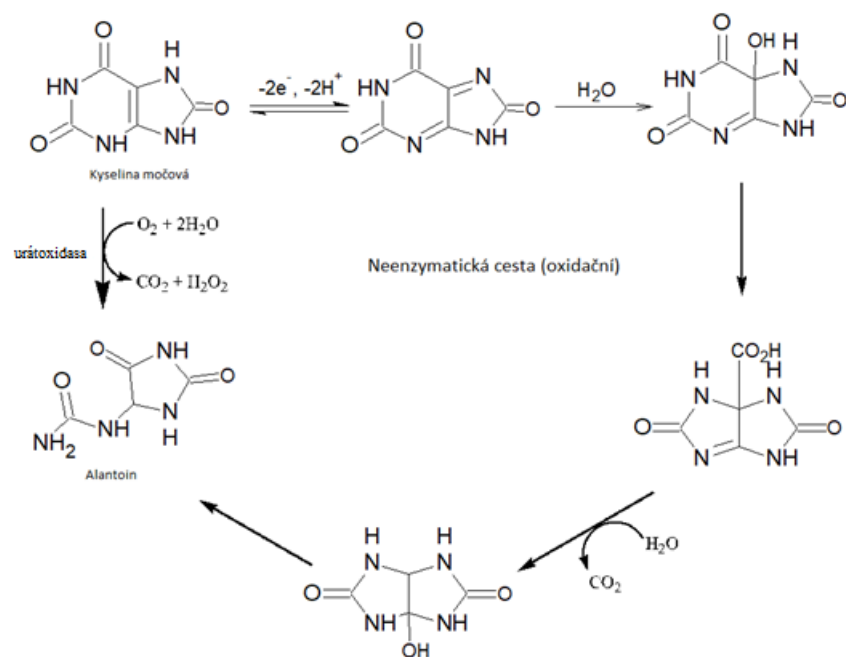
1.2.1 Vlastnosti a funkce alantoinu

Alantoin je heterocyklická, polární organická sloučenina, která je za normálních podmínek bílá krystalická látka. Chemicky je alantoin diureid kyseliny glyoxalové, 5-ureidohydantoin a je znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6: Strukturální vzorec alantoinu.

Alantoin je dobře rozpustný ve vodě a méně rozpustný v glycerinu a propylenglykolu. Je velmi málo rozpustný v alkoholu a prakticky nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech. Alantoin je při vyšším pH nestabilní a dochází k jeho hydrolýze na močovinu a kyselinu glyoxalovou. U většiny savců je alantoin produkt metabolismu purinů, s výjimkou vyšších lidoopů. Alantoin se u lidí vyskytuje v krvi nebo séru v rozmezí 7,2 – 48,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Přítomnost alantoinu v moči u lidí může být známkou mikrobiální kontaminace nebo může být vytvořen neenzymatickou cestou prostřednictvím ROS (obrázek 7) [34, 35].

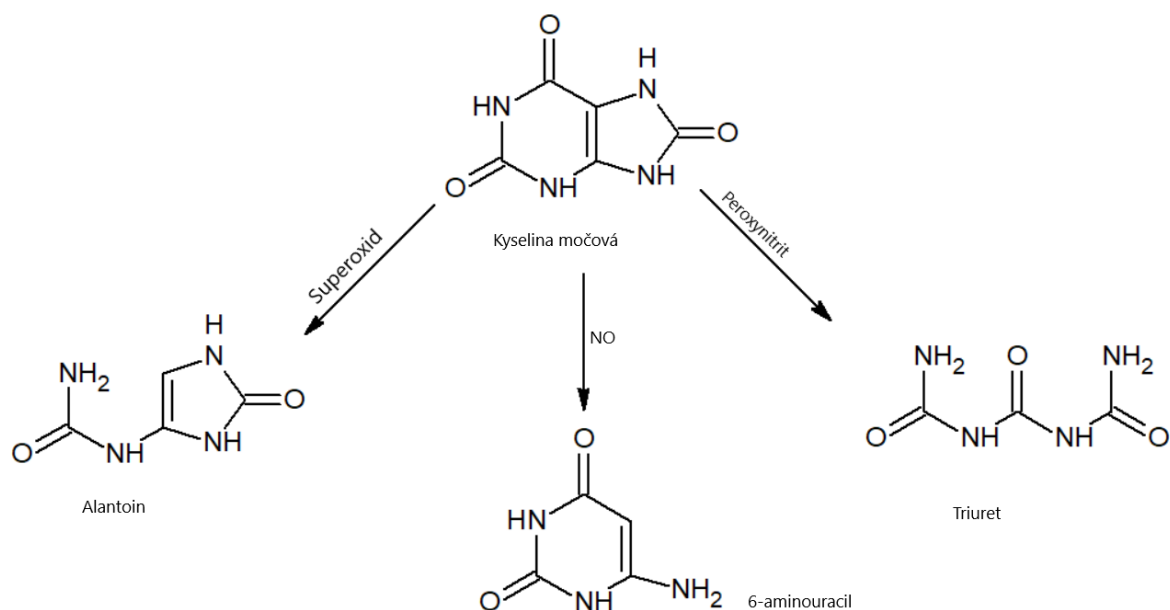


Obrázek 7: Enzymatická a neenzymatická syntéza allantoinu

Allantoin pomáhá hojit rány a tlumí podráždění kůže, stimuluje růst zdravé tkáně. Lze ho také nalézt v přípravcích proti akné, krémech na ochranu proti slunci a čistících pleťových vodách. Allantoin je často přítomen i v zubní pastě, ústní vodě a dalších produktech ústní hygieny, šamponech, rtěnkách a různých kosmetických krémech [12, 34, 35].

Zvýšené hladiny allantoinu byly prokázány u poruch spojené s oxidačním stresem, cukrovky, zánětlivých a autoimunitních stavů, u chronické žilní nedostatečnosti, kardiovaskulárních, renálních a plicních nemocí, Downova syndromu a Wilsonově chorobě. Navíc bylo prokázáno, že allantoin v moči, plazmě a svazech koreluje s dalšími ukazateli oxidačního stresu spojeného s cvičením [36, 37].

Oxidační stres je definován jako narušení rovnováhy mezi produkcí volných kyslíkových radikálů a antioxidační obranou, které může vést až k poškození tkáně. Volné radikály se tvoří jako produkty mnoha biochemických procesů nebo v reakci na elektromagnetické záření z prostředí. Na rozdíl od mnoha antioxidantů, vede reakce KM s oxidanty k vzniku řady konečných produktů, ze kterých se však nedá KM již obnovit. Kromě allantoinu jsou dalšími produkty, vzniklé reakcí KM a volných radikálů, například triuret (produkt KM a peroxinitritu) a 6-aminouracil (výsledek přímé reakce KM s radikálem oxidu dusnatého), obrázek 8 [38, 39].



Obrázek 8: Reakce kyseliny močové s volnými radikály za vzniku vybraných produktů

1.2.2 Stanovení alantoinu

V minulosti byla hladina alantoinu stanovena kolorimetrickou metodou založenou na Rimin-Schryveově reakci. Reakce probíhá tak, že je alantoin přeměněn přes kyselinu alantonovou na močovinu a kyselinu glyoxalovou, která reaguje s dinitrofenylhydrazinem na odpovídající dinitrofenylhydrazon. Tento derivát může být separován HPLC a metoda je tak více specifická. Pro kvantifikaci alantoinu v moči byla vyvinuta metoda GC-MS, avšak tato metoda je časově náročná a nákladná kvůli požadované derivatizaci [36, 40, 41].

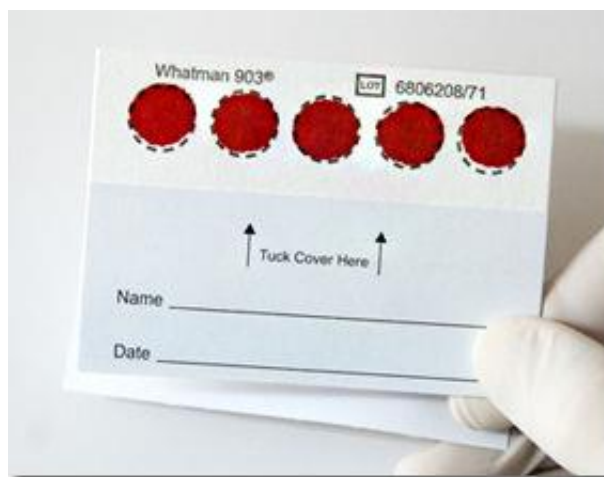
Pro stanovení alantoinu v plazmě lze použít metodu HPLC-MS/MS, která je dostatečně citlivá a specifická. Na rozdíl od GC-MS/MS metody, nevyžaduje metoda HPLC-MS/MS derivatizaci alantoinu. Jako organický modifikátor v mobilní fázi se nejčastěji používá acetonitril (ACN), kterým se také precipitují proteiny ve vzorku plazmy. Nespornou výhodou metody HPLC-MS/MS je rychlost, jednoduchost a nízké náklady na provoz [42].

1.3 Suchá kapka krve

Ivar Christian Bang, který je nazývaný otcem moderní mikroanalýzy, před více jak 100 lety přišel s jednoduchým konceptem aplikace biologických tekutin na filtrační papír. Tyto metody sběru krve a dalších biologických tekutin poskytly nový způsob odběru vzorku [43].

V roce 1924 Chapman ve své publikaci shrnul výhody suché kapky krve (DBS). Ve srovnání s konvenčním odběrem krve ze žíly je zapotřebí menší objem krve, což je důležité převážně v pediatrické diagnostice. Dále je odběr krve jednoduchý, neinvazivní a levný. Také je zde minimální riziko bakteriální kontaminace a vzorky DBS mohou být uchovávány po dlouhou dobu, aniž by došlo k poklesu koncentrace analytů. Na počátku 60. let bylo zavedeno rutinní používání DBS pro testování fenylyketonurie (PKU). Postupem času byly do novorozeneckého screeningu přidány nové testy pro diagnostiku různých nemocí, především vrozených metabolických. Pro stanovení látek ve vzorcích DBS se využívají různé metody, test bakteriální inhibici (BIA), GC, HPLC, chromatografie na tenké vrstvě (TLC), fluorimetrické metody nebo molekulárně biologické techniky. Chromatografické metody s vyšším rozlišením, jako je GC a HPLC, byly prvními metodami stanovujícími simultánně celou řadu látek při novorozeneckém screeningu. Nyní se v klinických laboratořích využívají pro analýzu vzorků moči a potvrzení poruch metabolismu aminokyselin (AMK). V současné době se pro screening vrozených metabolických chorob u novorozenců používá technika MS/MS, která je sice rychlá a dostatečně citlivá, ale vyžaduje drahé, isotopově značené vnitřní standardy [43, 44].

Filtrační papír používaný pro odběr krve technikou DBS by měl být vyrobený ze 100 % čistého bavlněného vlákna. Odběrová karta Whatman® 903 (obrázek 9) je registrován Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv jako zdravotnický prostředek II. třídy a používá se ve většině screeningových programů pro novorozence po celém světě. V současnosti je odběrová karta Whatman 903 jediná, která je široce využívána například i pro testování virových onemocnění nebo monitorování hladin léků [45–47].



Obrázek 9: Odběrová karta Whatman 903 s odebraným vzorkem krve

Mezi výhody techniky DBS, jak již bylo zmíněno, patří jednoduchý a málo invazivní odběr vzorku. Odběrové karty se snadno přepravují a skladují bez udržování specifické teploty. U celé řady látek nebyl zaznamenán významný pokles koncentrace během čtyř týdnů skladování při pokojové teplotě [47].

Hlavní nevýhodou techniky DBS je vliv hematokritu na výslednou koncentraci analytů. Problém hematokritu je nejčastěji diskutovanou otázkou při analýze látek z DBS. Jelikož hematokrit určuje viskozitu krve, ovlivňuje tím pádem i šíření krve na filtračním papíře. Proto výseky odebrané z DBS připravených z krve s různými hodnotami hematokritu budou obsahovat různé množství krve, a tím pádem i různé koncentrace analytů. V závislosti na sledovaném analytu a použitém filtračním papíru mohou různé hodnoty hematokritu způsobit významné zkreslení výsledků. Aby se minimalizoval dopad hematokritu na koncentraci analytů v DBS vzorcích, je potřeba připravit kalibrátory z krve s hodnotou hematokritu blízkou očekávanému mediánu cílové testované populace.

Objem krve aplikovaný na filtrační papír ovlivňuje nejen velikost vytvořené skvrny, ale také analytické výsledky. Typický vzorek DBS obsahuje přibližně 50 μ l plné krve o průměru terčíku 12 mm. Aplikovaná složka, plazma nebo sérum, zabírá větší objem vnitřku papírových vláken než objem erytrocytů, což vede ke ztrátě homogenity v DBS (vlivem chromatografického účinku), přičemž se erytrocyty koncentrují na okraji DBS. Během vývoje a validace metody by měl být posouzen vliv objemu nakapané krve na koncentraci analytu, což se provádí aplikací zvyšujících se objemů krve na filtrační papír pro odběr krve a měřením jak koncentrace analytu, tak průměru terčíku. Tímto způsobem by se mělo navrhnout i doporučené místo, kde by se měly dané výseky z DBS odebírat, aby se zajistilo získání spolehlivějších výsledků.

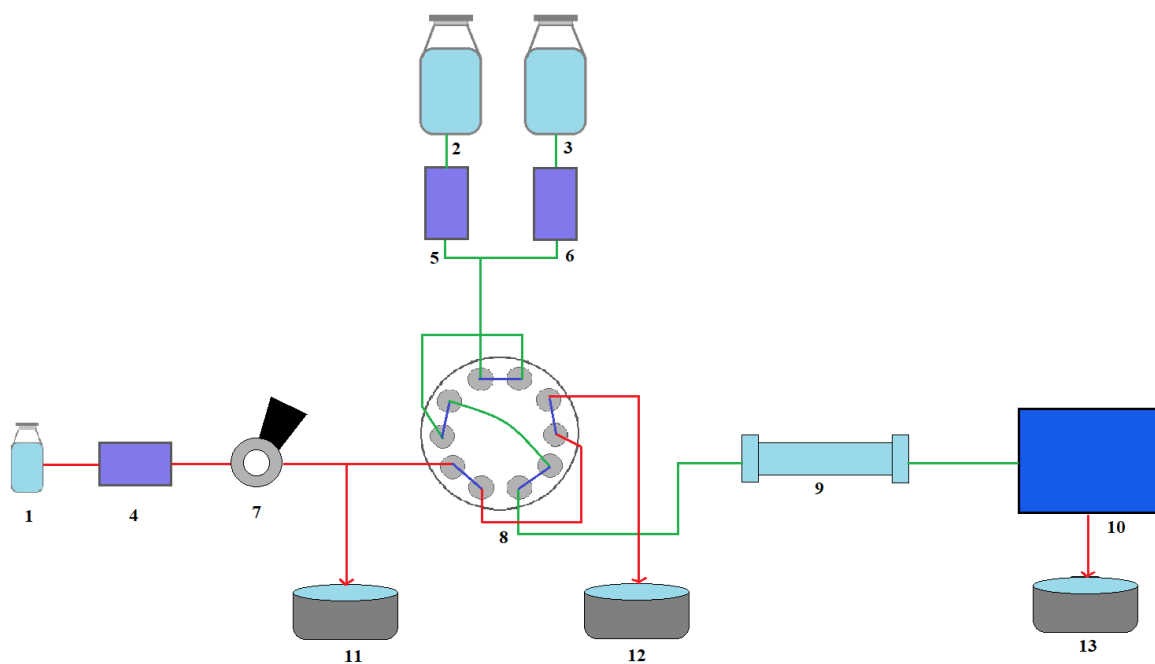
Přidání vnitřního standardu (IS) je možné následujícími způsoby. Přidání IS do vzorků plné krve před nanesením je teoreticky ideální strategie, avšak tento přístup je nicméně v praxi těžko použitelný. Obecně se tato strategie používá jako referenční k porovnání různých technik zavedení IS. Druhá technika spočívá nejprve v nakapání IS na filtrační papír a po vysušení se aplikuje vzorek krve. Další možná technika spočívá v odděleném terčíku vzorku krve a IS, kdy po vysušení se z obou vzorků vysekají terčíky a extrahují společně [48].

Pro extrakci analytů ze vzorků odebraných technikou DBS byla popsána řada postupů. Běžně se extrahuje směsí vody a organického rozpouštědla, většinou methanolu nebo ACN. Optimální požadavky na extrakci závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech analytu. Avšak některé analyty jsou extrahovány s nízkou výtěžností v důsledku silné interakce mezi analytem a hydroxylovými skupinami, které jsou v celulóze filtračního papíru. Kromě toho souhra objemu krve a hematokritu může také ovlivnit výtěžnost extrakce, tudíž je vyžadováno míchání nebo sonikace DBS vzorků během extrakce [49, 50].

Odběr vzorků technikou DBS v průběhu let ovlivnila nejeden obor, jako je například novorozenecký screening, epidemiologické šetření, kdy se testuje v terénu, testování infekčních chorob, výzkum v oblasti životního prostředí, forenzní testování, monitorování hladin léků, analýza nelegálních drog a doping [43, 51].

1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC se zakládá na rozdílné distribuci separovaných látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze, a to mobilní (MF) a stacionární fází (SF). V HPLC je SF kapalina ukotvená na tuhém nosiči nebo je to pouze tuhá látka, která je umístěna v chromatografické koloně, zatímco MF je kapalina. Schéma HPLC je znázorněno na obrázku 10 [52].



Obrázek 10: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie 1 - vzorek; 2,3 – zásobníky mobilní fáze; 4, 5, 6 - pumpy; 7 – dávkovací zařízení; 8 - šesticečný ventil; 9 - kolona; 10 - detektor; 11, 12, 13 - odpad

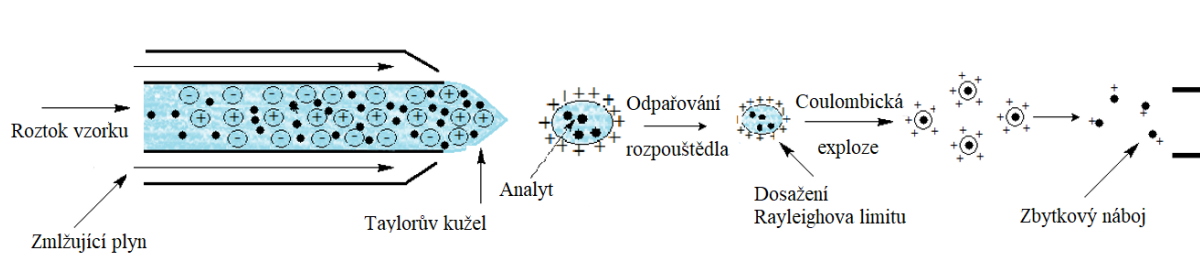
HPLC s vázanou reverzní fází (RP) využívá hlavně disperzní síly (hydrofobní nebo van der Waalsovy interakce). Polarita MF a SF je obrácená, takže povrch SF v RP-HPLC je hydrofobní a MF je polární, kde se používají hlavně roztoky vody s organickým modifikátorem. Disperzní síly uplatňující se v tomto separačním režimu jsou nejslabší mezimolekulární síly, čímž je celková energie interakce pozadí v chromatografickém systému ve srovnání s jinými separačními technikami velmi nízká. Tato nízká energie pozadí umožňuje rozlišovat velmi malé rozdíly v molekulárních interakcích blízké souvisejících analytů. Adsorbenty používané v tomto způsobu chromatografie jsou porézní tuhé materiály s hydrofobními povrchy. Ve všech režimech HPLC s pozitivními povrchovými interakcemi analytu platí, že čím vyšší je povrch adsorbentu, tím delší je retence analytu a ve většině případů lepší separace [53].

Moderní HPLC kolona je buď trubice z nerezové oceli, nebo z plastu naplněná materiálem (adsorbentem). Jedná se v podstatě o zařízení, které drží SF na místě. Účinnost kolony závisí hlavně na jejím typu (plněná, monolitická nebo kapilární), velikosti částic (pro náplňové kolony) nebo průměru pórů (pro monolitické kolony). SF používané v RP-HPLC obvykle představují alifatické řetězce, jako je například oktadecylsilan (C18) a oktylsilan (C8). Ty jsou chemicky vázané, imobilizované nebo pouze sorbované na chromatografickém nosiči, obvykle na mikročasticovém oxidu křemičitém. MF běžně používané v RP-HPLC jsou hydroorganické směsi. Mezi nejběžnější modifikátory MF patří methanol a ACN nebo kombinace obou. Koncentrace organického modifikátoru v MF je převládajícím faktorem, který určuje retenci analytů v RP-HPLC. Doporučuje se použití vysoce čistého rozpouštědla, aby se minimalizovala kontaminace SF nečistotami. Při výběru MF je nutné dbát na mísitelnost rozpouštědel, rozpustnost vzorku v MF, polaritu, viskozitu, stabilitu a pH. MF i vzorek by měly být mísitelné a při míchání by se vzorek neměl srážet. Viskozita MF také hraje důležitou úlohu v protitlaku generovaném v HPLC koloně a je závislá na typu a koncentraci organického rozpouštědla, jakož i na provozní teplotě. Velmi viskózní rozpouštědla mohou mít tendenci snižovat rychlost difúze, což vede k rozšíření píku a také k vytvoření nadměrně vysokých protitlaků v koloně. Vyšší podíl organického rozpouštědla v MF může mít za následek zlepšení účinnosti ionizace elektrosprejem (ESI), což může ovlivnit volbu separačního režimu. Například polární molekuly se špatně zadržují na kolonách s reverzní fází a eluují jako první v MF s nízkým podílem organického rozpouštědla. To má za následek relativně špatnou účinnost ionizace v iontovém zdroji MS a je pravděpodobnější, že polární interference budou v této oblasti koeluovat a způsobovat potlačení ionizace molekul. Jedním ze způsobů, jak to lze překonat, je použití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), při které jsou polární analyty eluovány MF s vyšším obsahem organického rozpouštědla [54–57].

1.5 Hmotnostní spektrometrie

Základní funkcí hmotnostního analyzátoru je měření poměru hmotnosti k náboji iontů (nabitě částice). Princip činnosti hmotnostních analyzátorů závisí na interakcích nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem. Mezi běžně používané hmotnostní analyzátory patří magnetický sektorový analyzátor, kvadrupól, iontová past, analyzátor doby letu nebo iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. Kvadrupól je zařízení, ve kterém jsou elektrické střídavé a stejnosměrné potenciály aplikovány na protilehlé páry lineárního pole čtyř paralelních tyčí s hyperbolickými průřezy. Hromadná analýza se provádí rychlou změnou stejnosměrného a střídavého napětí při zachování jejich konstantního poměru a oscilační frekvence. Ionty s vyšší nebo nižší hmotností, než je naše požadovaná, nevstupují na detektor. Kvadrupól je snadno spojen s dalšími hmotnostními analyzátory pro MS/MS techniky. Jednou z nejpoužívanějších konfigurací je trojitý kvadrupólový, který našel široké uplatnění v LC-MS/MS [58].

Ideální ionizační zdroj pro hmotnostní spektrometr by měl poskytovat vysokou ionizační účinnost a vysokou stabilitu iontů pro následnou analýzu hmotnostními analyzátory. Kromě toho by měla být v iontovém zdroji dosažitelná kontrola vnitřní energie iontů během ionizace, aby se kontroloval stupeň jejich fragmentace. V průběhu let byly vyvinuty různé ionizační techniky, jako jsou elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), desorpční ionizace (DI), desorpce/ionizace laserem v přítomnosti matice (MALDI), desorpční elektrosprejové ionizace (DESI), ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Nejčastější ionizační technika spojovaná s kapalinovou chromatografií je ESI. Základní aparatura ESI se skládá z ESI kapiláry, na které je vloženo vysoké napětí (4-5 kV). Prvním krokem je tvorba kapiček na špičce kapiláry, na které je vloženo vysoké napětí. Vzniklé kapičky se v důsledku odpařování rozpouštědla zmenšují, zvyšuje se hustota povrchového náboje a coulombické síly přesahují povrchové napětí, díky tomu se kapičky rozpadají na ještě menší. Další proces odpaření s Rayleighovou fragmentací kapiček produkuje nabitě ionty analytu (obrázek 11) [58].



Obrázek 11: Ionizace elektrosprejem

Mezi jedinečné výhody této separační techniky patří citlivost, přesnost, rychlost a použitelnost. HPLC-MS se široce používá jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu v různých aplikacích, jako je strukturní charakterizace nečistot a degradačních produktů léčiv a identifikace a kvantifikace metabolitů léčiv. S neustále se vyvíjejícím technologickým pokrokem v oblasti hmotnostní spektrometrie bude HPLC-MS i v budoucnu hrát důležitou úlohu při prokazování drog v biologických vzorcích. Dále je vhodná pro analýzu potravin, vzorků ze životního prostředí, čistoty chemikálií a polymerů, ale i v klinické praxi. V analýze potravin se zaměřujeme na kontrolu kvality, testování kontaminantů a dalších. U vzorků ze životního prostředí se zaměřujeme na testování nestálých a netěkavých znečišťujících látek ve vodách jak odpadních, tak pitných, ale i pevných odpadech a vzduchu. V chemickém průmyslu se technikou HPLC-MS testují syntetické chemikálie, charakterizují se polymery a kontroluje kvalita výroby chemikálií. [58, 59].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Vzorky krve

Vzorky krve byly odebrány technikou DBS od 45 dobrovolných dárců krve (23 žen a 22 mužů) ve věkovém rozmezí 9-68 let s průměrem 30,6 let. Vzorky byly odebírány v duplikátu na odběrovou kartu Whatman #903. Před zahájení odběru krve byl každý z dobrovolných dárců poučen o průběhu studie a podepsal informovaný souhlas.

2.1.1 Odběr vzorků krve na odběrovou kartu

Za účelem prokrvení prstu byla ruka jemně promasírována. Následně byl prst dárce vydezinfikován Septonexem a dezinfekční prostředek setřen sterilní buničinou. Lancetou byl proveden vpich do boční strany prstu a první kapka byla setřena buničinou. Po následném vytvoření velké kapky krve na prstu, byl přiložen filtrační papír Whatman #903 do doby, než byl prosáknut krví tak, aby krev vyplnila vyznačený kruh. Odběrová karta s krevními skvrnami se nechala tři hodiny zaschnout při pokojové teplotě a poté byla uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v uzavřeném plastovém obalu bez přístupu vzduchu. Doba skladování nepřesáhla jeden měsíc.

2.1.2 Odběr plné krve

Venózní krev byla odebrána od jednoho dobrovolného dárce do 9ml odběrových zkumavek s K_3EDTA kvalifikovaným personálem. Krev byla použita na přípravu standardů pro kalibrační řady a pro vzorky na testování analytických parametrů metody. Připravené standardy v plné krvi byly pipetovány na odběrovou kartu Whatman #903 (30 μl) a ponechány zaschnout po dobu 3 hodin. Skladování bylo stejné jako je uvedeno v kapitole 2.1.1.

2.2 Pomůcky

- Analytické váhy AdventurerTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Analytická kolona Discovery[®] HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm), opatřena ochranou kolonou Discovery[®] HS F5 (4 × 2,1 mm; 3 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Analytická kolona Ascentis[®] Express OH5 (150 × 2,1 mm; 2,7 μm), opatřena ochranou kolonou Ascentis[®] Express OH5 (4 × 2,1 mm; 2,7 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Centrifuga EPP-5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Filtrační papír na odběr krve, odběrová karta (Whatmann, GmbH, Dassel, Německo)
- Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Hmotnostní spektrometr LCMS 8045 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Kádinky, odměrné válce, odměrné baňky
- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
 - Řídicí systém CBM-20A
 - Odplyňovač mobilní fáze DGU-20A
 - Termostat kolon CTO-20AC
 - Vysokotlaká analytická čerpadla LC-20AD
 - Autosampler SIL-20AC
 - Software LC solution
- Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 μm (Sulpeco, Bellefonte, PA, USA)
- Odběrové zkumavky s K_3EDTA , 9 ml, Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
- pH-metr inoLab, level 2 (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, Weilheim, Německo)
- Polypropylenové (PP) mikrozkušavky s víčkem typu Eppendorf 1,5 ml (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Předvážky AdventurerTM Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Rotační olejová vývěva CLASSIC VRO-4 (LAVAT, a.s., Radim u Kolína, ČR)
- Skleněné vialky se šroubovacím víčkem (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Skleněné inserty (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Ultrazvuková čistička ECOSON (ECOSON, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)

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

2.3 Chemikálie

- Acetonitril pro LC-MS (C_2H_3N , M_r 41,05) p. a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- Alantoin ($C_4H_6N_4O_3$, M_r 158,12) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- Deionizovaná voda (H_2O , M_r 18,00; $G = 0,055 \mu S$)
- DL-Allantoin-5- ^{13}C ,1- ^{15}N ($^{13}CC_3H_6^{15}NN_3O_3$, M_r 160,10) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- 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 chlorovodíková (HCl , $\rho = 1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $w = 0,366$, M_r 36,45) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina močová ($C_5H_4N_4O_3$, M_r 168,11) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina močová-1,3- $^{15}N_2$ ($C_5H_4^{15}N_2N_2O_3$, M_r 170,10) p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS ($HCOOH$, M_r 46,03, $w = 0,98-100,00$) p. a. (Merck-Darmstadt, Německo)
- Mravenčan amonný pro LC-MS (HCO_2NH_4 , M_r 63,06) p. a. (Merck, Darmstadt, Německo)

2.4 Pracovní roztoky

Příprava deionizované vody

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

Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním $0,9 \text{ g}$ $NaCl$ ve 100 ml deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Příprava roztoku $NaOH$ ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 1 g NaOH byla rozpuštěna v 25 ml deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Zásobní roztok kyseliny močové I. (4996,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 0,0210 g KM byla rozpuštěna v 550 μl NaOH o koncentraci 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a objem doplněn deionizovanou vodou do 25 ml. Roztok byl uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 ml alikvotách.

Zásobní roztok kyseliny močové II. (7518,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 0,0316 g KM byla rozpuštěna v 750 μl NaOH o koncentraci 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a objem doplněn do 25 ml fyziologickým roztokem do 25 ml. Roztok byl uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 ml alikvotách.

Zásobní roztok alantoinu I. (1037,19 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 0,0041 g alantoinu byla rozpuštěna v 25 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 ml alikvotách.

Zásobní roztok alantoinu II. (3035,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 0,0048 g alantoinu byla rozpuštěna v 10 ml fyziologického roztoku. Roztok byl uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 ml alikvotách.

Roztok elučňního činidla (85% acetonitril)

Bylo připraveno 13 ml elučňního činidla 85% ACN smícháním 11,05 ml ACN, 1300 μl izotopově značené KM o koncentraci 58 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 130 μl pracovního roztoku izotopově značeného alantoinu o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a doplněno 520 μl deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Roztok elučňního činidla (75% acetonitril)

Byly připraveny 2 ml elučňního činidla 75% ACN smícháním 1500 μl ACN, 180 μl izotopově značené KM o koncentraci 58 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 20 μl pracovního roztoku izotopově značeného alantoinu o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a doplněno 300 μl deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Roztok elučňního činidla (80% acetonitril)

Byly připraveny 2 ml elučňního činidla 80% ACN smícháním 1600 μl ACN, 180 μl izotopově značené KM o koncentraci 58 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 20 μl pracovního roztoku izotopově značeného alantoinu o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a doplněno 200 μl deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Roztok elučního činidla (85% acetonitril)

Byly připraveny 2 ml elučního činidla 85% ACN smícháním 1700 μl ACN, 180 μl izotopově značené KM o koncentraci $58 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 20 μl pracovního roztoku izotopově značeného alantoinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a doplněno 100 μl deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Roztok elučního činidla (90% acetonitril)

Byly připraveny 2 ml elučního činidla 90% ACN smícháním 1800 μl ACN, 180 μl izotopově značené KM o koncentraci $58 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 20 μl pracovního roztoku izotopově značeného alantoinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním ACN s denionizovanou vodou v poměru 1:9 (v/v) s přidavkem kyseliny mravenčí s výslednou koncentrací 0,1 % (v/v). Mobilní fáze byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm a následně odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Zásobní roztok vnitřního standardu kyseliny močové ($58,79 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 0,0050 g KM-1,3- $^{15}\text{N}_2$ byla kvantitativně rozpuštěna v 500 ml deionizované vody. Roztok byl uchovávan při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Zásobní roztok vnitřního standardu alantoinu ($624,64 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Navážka 0,0100 g DL-allantoinu-5- ^{13}C ,1- ^{15}N byla kvantitativně rozpuštěna v 100 ml deionizované vody. Roztok byl uchovávan při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ v 1ml alikvotách.

Pracovní roztok vnitřního standardu alantoinu (asi $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Pracovní roztok značeného alantoinu byl připraven denně čerstvý ředěním zásobního roztoku alantoinu-5- ^{13}C ,1- ^{15}N deionizovanou vodou.

2.5 Test lýzy erytrocytů

K 460 μl plné krve bylo pipetováno 40 μl zásobních roztoků I. a II. kyseliny močové a alantoinu. Vzorky byly ponechány stát 5 min při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně byly odstředěny (10 min, $1500 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Takto připravené vzorky byly vizuálně posouzeny, zda došlo k hemolýze erytrocytů.

2.6 Příprava standardů alantoinu a kyseliny močové pro konstrukci kalibrační křivky

Byly připraveny dvě na sobě nezávislé osmibodové kalibrace, jedna pro alantoin a druhá pro KM. Standardy S1-S7 byly připraveny smícháním nesrážlivé krve a zásobních roztoků II. KM a alantoinu v poměru 9:1 (v/v). Standard S0 byl připraven smícháním nesrážlivé krve a fyziologického roztoku ve stejném poměru, jak byly připravovány standardy S1-S7. Výsledné koncentrace kalibračních standardů jsou uvedeny v tabulce 2. Připravené standardy byly nakapány (30 μ l) na filtrační papír typu Whatman #903. Další postup byl stejný jako v kapitole 2.1.

Tabulka 2: Koncentrace standardů pro sestavení kalibrační křivky

| Analyt | Koncentrace standardů v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | | | | | | |
|-----------------|---|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 |
| Kyselina močová | 10,03 | 50,03 | 100,25 | 250,63 | 350,88 | 501,26 | 701,76 |
| Alantoin | 0,52 | 1,04 | 2,59 | 5,19 | 10,37 | 25,93 | 51,86 |

2.7 Optimalizace Extrakce

2.7.1 Příprava vzorků

Na filtrační papír Whatman #903 byla nakapána (30 μ l) neředěná plná krev bez přídavku KM a alantoinu. Krev byla ponechána zaschnout po dobu 3 hodiny a následně byly skladovány bez přístupu vzduchu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby analýzy.

2.7.2 Zpracování vzorků

Byla testována řada extrakčních činidel: 75%, 80%, 85% a 90% ACN ve vodě. Příprava elučních roztoků je uvedena v kapitole 2.4. Vyražený terčík DBS (6 mm v průměru) byl převeden do 1,5ml PP zkumavky a přidáno 150 μ l elučního činidla. Vzorky byly zpracovány v duplikátu. Eluce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byl obsah

zkumavky odstředěn (10 min, 4430 x g, laboratorní teplota) a supernatant převeden do insertu ve skleněné vialce.

Pro zvýšení účinnosti extrakce byla testována různá doba extrakce a různá doba sonikace během extrakce. Vyražený terčík DBS (6 mm v průměru) byl převeden do 1,5 ml PP zkumavky a přidáno 150 μ l 85% ACN ve vodě. Poté byla polovina vzorků umístěna do ultrazvukové vany a obsah sonifikován po dobu 10, 20 a 30 minut. Druhá polovina vzorků byla ponechána stát při laboratorní teplotě po dobu 10, 20 a 30 minut. Následně byl obsah zkumavky odstředěn (10 min, 4430 x g, laboratorní teplota) a supernatant převeden do insertu ve skleněné vialce. Všechny vzorky byly zpracovány v duplikátu.

2.8 Příprava vzorků pro testování různých objemů krve aplikovaných na odběrovou kartu

Bylo připraveno 300 μ l směsného roztoku KM a alantoinu ve fyziologickém roztoku smícháním 20 μ l zásobního roztoku II. KM a 15 μ l zásobního roztoku II. alantoinu a doplněno 265 μ l fyziologického roztoku. Následně bylo 50 μ l takto připraveného směsného standardu přidáno k 450 μ l plné krve. Vzniklá směs byla pipetována na filtrační papír Whatman #903 v objemech 10, 15, 25, 35, 50 a 75 μ l v duplikátu. Další zpracování bylo stejné jako v kapitole 2.1.2.

2.9 Příprava vzorků pro testování stability kyseliny močové a alantoinu

Na filtrační papír Whatman #903 byla nakapána plná krev o objemu 30 μ l o stejné koncentraci analytů. Poté se nechala krev zaschnout (3 hodiny), a odběrové karty byly uskladněny při laboratorní teplotě, 4 °C a -20 °C v uzavřených plastových sáčcích do doby analýzy.

2.10 Příprava vzorků pro stanovení přesnosti v sérii a mezi sériemi

Bylo připraveno celkem 15 skvrn plné krve bez přídavku a ředění a 15 skvrn plné krve s přídavkem alantoinu a KM tak, abychom dosáhli patologických koncentrací. Plná krev s přídavkem alantoinu a KM byla připravena smícháním 450 μ l plné krve a 50 μ l směsného standardu. Směsný standard vznikl smícháním 240 μ l zásobního roztoku II. KM, 40 μ l zásobního roztoku II. alantoinu a 20 μ l fyziologického roztoku. Na odběrové karty bylo kapáno 30 μ l krve. Další zpracování bylo stejné jako v kapitole 2.1.2.

2.11 Zpracování vzorků suché kapky krve

Ze vzorku dobrovolných dárců (standardů, vzorků pro určení přesnosti, stability a testu objemů) byl vyražen terčík o průměru 6 mm, který byl převeden do 1,5ml PP zkumavky. K terčíku bylo pipetováno 150 μ l roztoku elučního činidla (85% ACN) a zkumavka umístěna do ultrazvukové vany a obsah sonifikován po dobu 30 min. Po extrakci byl obsah zkumavky odstředěn (10 min, 4430 \times g, laboratorní teplota) a supernatant převeden do insertu ve skleněné vialce.

2.12 Analytické parametry metody

Linearita

Účelem testu linearity je prokázat, že analytický systém vykazuje lineární odezvu a je přímo úměrný příslušnému koncentračnímu rozmezí pro cílovou koncentraci analytu. Analýzou standardních roztoků o známé koncentraci zjišťujeme interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací standardů, kterou jsme naměřili. Výsledkem této závislosti je kalibrační křivka.

Přesnost

Přesnost metody je definovaná jako shoda mezi opakovanými měření téhož vzorku za předem určených podmínek. Přesnost lze rozdělit na opakovatelnost a reprodukovatelnost, kdy opakovatelnost vyjadřuje míru shody mezi výsledky měření stejného analytu, stejnou metodou, jednou osobou a za stejných laboratorních podmínek, včetně stejného přístroje a v krátkém časovém intervalu. Naopak reprodukovatelnost je míra shody mezi výsledky, které jsme získali ze stejného analytu ve stejném vzorku a stejnou metodou, ale za rozdílných podmínek. Liší se zde pracovník, přístroj i čas a místo. Jako míra přesnosti se používá variační koeficient CV%, který je dán poměrem směrodatné odchylky SD a aritmetického průměru AVG.

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

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

kde SD je směrodatná odchylka, x_i je koncentrace analytu ve vzorku, AVG je aritmetický průměr, n je počet měření a CV je variační koeficient.

2.13 Chromatografické podmínky

KM spolu s alantoinem byly stanoveny metodou HPLC v systému obrácených fází s hmotnostní detekcí. Chromatografické podmínky pro stanovení KM a alantoinu jsou uvedeny v tabulce 3, v tabulce 4 jsou uvedeny optimalizované podmínky pro MS.

Tabulka 3: Chromatografické podmínky

| Chromatografické podmínky pro HPLC-MS/MS | |
|--|---|
| Mobilní fáze: | Směs ACN a deionizované vody (10:90, v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí |
| Průtok mobilní fáze: | 0,2 ml |
| Dávkovaný objem: | 5 μ l |
| Doba analýzy: | 3 minuty |
| Vyhřívání kolony: | 37 °C |
| Loop time: | 0,2 s |
| ESI: | Teplota v iontovém zdroji: 300 °C |
| | Teplota DL: 250 °C |
| | Teplota vyhřívacího bloku: 400 °C |
| | Průtok zmlžovacího plynu: 2 l·min ⁻¹ |
| | Průtok sušícího plynu: 10 l·min ⁻¹ |
| | Průtok vyhřívacího plynu: 10 l·min ⁻¹ |
| | Kapilární napětí: 3 kV |

Tabulka 4: Optimalizované podmínky pro hmotnostní spektrometrii

| Analyt | Prekurzor [m/z] | Produkt [m/z] | CE [V] | Q1 Pre bias [V] | Q3 Pre bias [V] |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Alantoin | 157,0 | 114,0 | 15 | 11 | 15 |
| Alantoin* (IS) | 159,2 | 116,0 | 14 | 11 | 17 |
| KM | 166,9 | 123,9 | 17 | 11 | 10 |
| | | 96,1 | 18 | 12 | 15 |
| KM* (IS) | 168,9 | 125,1 | 18 | 12 | 21 |

CE = kolizní energie; KM = kyselina močová; * = značený standard; Pre Bias = usměrňovací napětí na kvadrupólech

2.14 Zpracování výsledků

Pro vyhodnocení a zpracování dat byly použity programy MS Excel, Statistika, verze 12 (StatSoft CR s.r.o., Praha, Česká republika) a LC solution (Shimadzu, Kjóto, Japonsko).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ze současných klinických studií o úloze ROS v patologických procesech v organismu vyplývá, že standardní terapie v kombinaci s antioxidační léčbou má příznivý vliv na zdraví člověka. Proto je důležitá kvantifikace oxidačního stresu, která se v laboratorní diagnostice provádí hlavně stanovením hladin ukazatelů oxidačního stresu a monitorováním hladin antioxidantů. Jedním z významných ukazatelů oxidačního stresu je alantoin, který vzniká neenzymatickou reakcí KM s ROS [39]. V současné době jsou kladeny vysoké nároky na klinické laboratorní testy. Zejména na co nejjednodušší odběr vzorku a jeho transport do laboratoře s následnou, pokud možno co nejkratší analýzou. To splňuje technika DBS pro odběr krve. Metoda DBS je běžně využívána v klinické praxi při novorozeneckém screeningu a mohla by tedy být použita pro screeningové monitorování oxidačního stresu [44].

Stanovení KM se v klinické praxi provádí rutinně spektrofotometrickou metodou, nicméně při této metodě může výsledky ovlivnit řada interferujících látek. Z toho důvodu je vhodnější použít pro její stanovení kapalinovou chromatografii [26]. Na druhou stranu stanovení alantoinu je i v současné době náročné a v klinických laboratořích se běžně neprovádí. V současné době není publikovaná žádná práce, která by se zabývala simultánním stanovením KM a alantoinu ve vzorcích DBS. Cílem této práce bylo vyvinout rychlou dostatečně citlivou metodu pro simultánní stanovení KM a alantoinu ve vzorcích krve odebraných technikou DBS tak, aby mohla být v budoucnu využita v klinické praxi pro monitorování oxidačního stresu u lidí.

3.1 Příprava kalibračních standardů pro stanovení kyseliny močové a alantoinu v suché kapce krve

Pro sestrojení kalibračních křivek využívaných pro kvantifikaci analytů ze vzorků DBS existuje celá řada způsobů, jak je připravit. Jedna z možností je připravení standardů KM a alantoinu ve vodě s jejím následným odpařením v atmosféře dusíku, nebo je k jejímu odstranění použita lyofilizace. Odparek či lyofilizát je pak rozpuštěn v plné krvi. Tato možnost je však poměrně časově náročná a může docházet ke ztrátám analytu. Druhou možností je přidavek standardů k plné krvi tak, aby nedošlo ke změně matrice. Maximální doporučený přidavek je devět dílů plné krve k jednomu dílu standardu.

V našem případě jsme využili metodu standardního přídavku. Pro využití této metody bylo testováno, zda je nutné připravit zásobní roztoky ve fyziologickém roztoku,

anebo postačí deionizovaná voda, a zároveň, zda přítomnost hydroxidu sodného v zásobním roztoku KM nezpůsobí hemolýzu erytrocytů. Použití hydroxidu sodného při přípravě zásobního roztoku KM o vysoké koncentraci je nutné, jelikož s rostoucím pH se zvyšuje její rozpustnost. Test byl proveden přidáním zásobních roztoků k plné krvi a po sedimentaci erytrocytů byla vizuálně posuzována hemolýza (červené zabarvení plazmy). Došli jsme k závěru, že zásobní roztoky je nutné připravit ve fyziologickém roztoku. Deionizovaná voda způsobuje hemolýzu a vyšší pH v případě přípravy standardů KM není problematické.

3.2 Optimalizace podmínek kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru

3.2.1 Hmotnostní spektrometrie

Pro citlivou a přesnou kvantitativní analýzu je nejvhodnější provádět tandemovou hmotnostní spektrometrii neboli vícenásobné MS experimenty (MS/MS). V našem případě byl pro stanovení KM a alantoinu použit trojitý kvadrupól (QqQ), který pracoval v módu monitorování vybraných reakcí (MRM), tzn. Q1 a Q3 sloužily jako filtry pro izolaci prekurzoru a specifického fragmentu a Q2 sloužil jako kolizní cela pro fragmentaci iontů.

Pro dosažení co největší odezvy detektoru byla optimalizována řada parametrů hmotnostního spektrometru. Nejprve byl proveden SCAN (v pozitivním i negativním módu) čistých standardů, při kterém byla zjištěna vyšší intenzita a menší poměr S/N v negativním módu ionizace než v pozitivu u obou analytů. Následně byla provedena softwarem řízená optimalizace MRM přechodů, zoptimalizována hodnota napětí fragmentace a usměrňovacího napětí na kvadrupólech pro každý analyt (KM, alantoin a jejich značené standardy). Optimalizované hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Optimalizace podmínek pro HPLC-MS

| Analyt | Prekurzor [m/z] | Produkt [m/z] | CE [V] | Q1 Pre bias [V] | Q3 Pre bias [V] |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Alantoin | 157,0 | 114,0 | 15 | 11 | 15 |
| | | 97,1 | 16 | 11 | 12 |
| Alantoin* (IS) | 159,2 | 116,0 | 14 | 11 | 17 |
| | | 99,0 | 14 | 12 | 17 |
| KM | 166,9 | 123,9 | 17 | 11 | 10 |
| | | 96,1 | 18 | 12 | 15 |
| KM* (IS) | 168,9 | 125,1 | 18 | 12 | 21 |
| | | 97,1 | 20 | 12 | 27 |

CE = kolizní energie; KM = kyselina močová; * = značený standard; Pre Bias = usměrňovací napětí na kvadrupólech

Nicméně při proměření reálných vzorků krve byla zjištěna interference matrice u alantoinu, respektive jeho MRM přechodu m/z 157,2 > 97,15 a u jeho značené vnitřního standardu 159,2 > 99,0 (Příloha 1 a 2). Z tohoto důvodu byl použit pouze jeden MRM přechod při měření reálných vzorků jak u alantoinu, tak i u značeného alantoinu. U KM byla zjištěna interference matrice pouze v případě značené kyseliny močové (Příloha 3 a 4), a to mimo její retenční čas, tudíž u ní mohly být ponechány všechny optimalizované MRM přechody.

Dále byly testovány různé průtoky sušících plynů. Největší intenzity bylo dosaženo při průtoku $10 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$. Při snížení průtoku plynů na 9, 8, a $7 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ zůstala intenzita stejná nebo došlo k jejímu mírnému poklesu. Loop time byl nastaven na hodnotu 0,2 s, při které byl nejlepší tvar píků s maximální intenzitou. Pro zkrácení doby čištění iontového zdroje byl MS ventil přepnut prvních 1,5 min do odpadu.

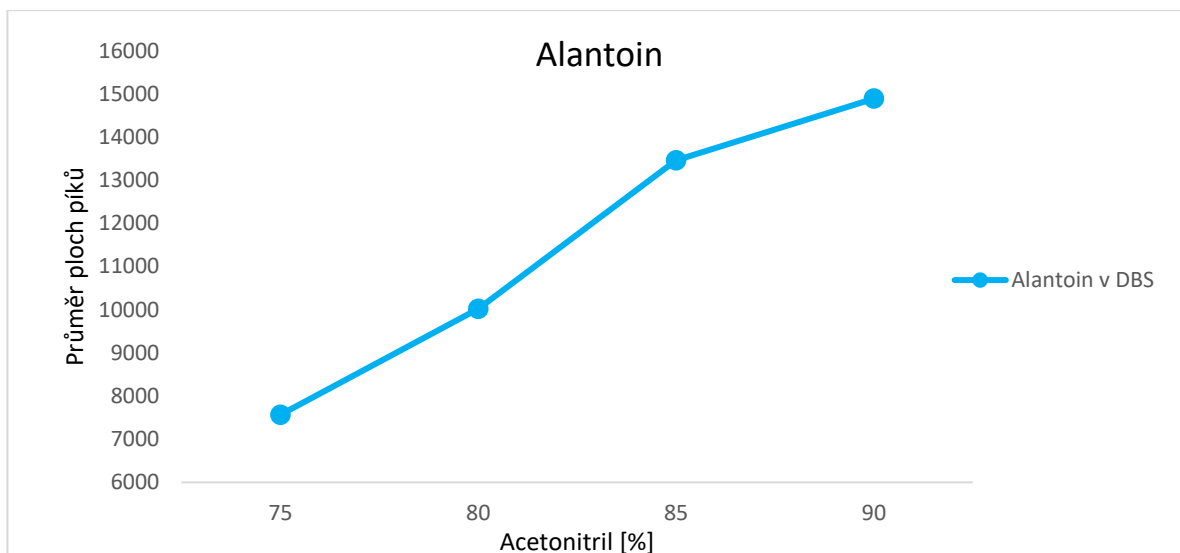
3.2.2 Kapalinová chromatografie

V této práci byla optimalizována řada podmínek kapalinové chromatografie tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti a robustnosti metody pro stanovení alantoinu a KM.

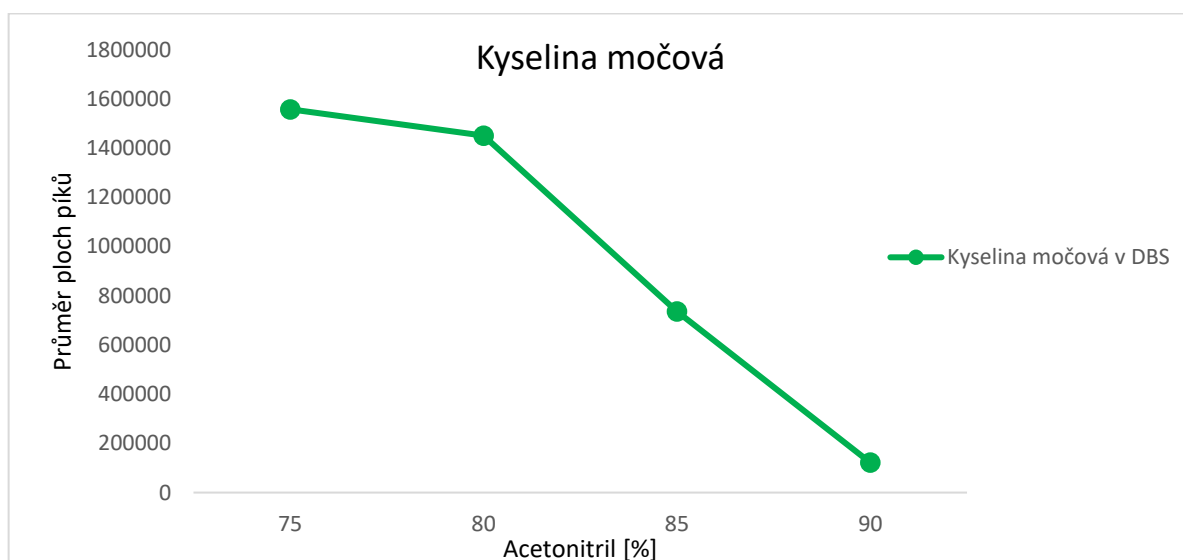
Pro separaci alantoinu a KM byly testovány dvě analytické kolony: Discovery® HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm) a Ascentis® Express OH5 (150 × 2,1 mm; 2,7 μm). Na koloně Ascentis® Express OH5 bylo pozorováno typické HILIC retenční chování KM a alantoinu. Na druhou stranu, separace na koloně Discovery® HS F5 probíhala na reverzní fázi. Na této koloně byla dosažena kratší doba analýzy s lepším tvarem píků. Jako mobilní fáze byla použita voda a ACN s různými aditivy. Pro dosažení nejlepší retence, tvaru píků a intenzity MS byla testována řada mobilních fází s různou iontovou silou. Byly testovány různé koncentrace mravenčanu amonného (5; 10 a 15 mmol·l⁻¹) a hodnoty pH (3; 3,5 a 4). Změny v iontové síle a hodnotách pH mobilní fáze nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly v retenčních časech a tvarech píků. Avšak, přítomnost mravenčanu amonného v mobilní fázi znatelně snižovala signál MS v případě obou analytů v porovnání s mobilní fází obsahující pouze přídavek 0,1% kyseliny mravenčí. Právě kyselina mravenčí v koncentraci 0,1 % byla vybrána jako aditivum do mobilních fází. Pro separaci byla nakonec zvolena izokratická eluce. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a acetonitrilu 10/90 (v/v) s 0,1 % kyselinou mravenčí. Nicméně, za daných podmínek nedošlo k úplné separaci KM a alantoinu na koloně, což ovšem v případě využití MS jako detektoru není problém. Úplná separace byla provedena právě MS detektorem na základě rozdílných hmot KM a alantoinu, bez snížení signálu i v případě jejich koeluce. Chromatografický záznam reálného vzorku měřeného za optimalizovaných podmínek je uveden v příloze 5.

3.3 Test účinnosti extrakčního činidla

Pro extrakci KM a alantoinu ze vzorků DBS byla testována řada extrakčních činidel: 70%, 75%, 80%, 85% a 90% ACN ve vodě. Pro dosažení co nejčistšího eluentu pro analýzu HPLC-MS je žádoucí, aby byly proteiny vysráženy přímo na papírku a nebyly uvolněny do roztoku. Z toho důvodu byly testovány eluční činidla s vysokým podílem ACN, který navíc umožňoval nástřik vzorku do HPLC-MS systému bez dalšího odpařování a následného rozpouštění odparku v mobilní fázi. Bylo zjištěno, že minimální koncentrace ACN, aby došlo k úplné precipitaci proteinů, je 75% ACN. Po přidání 70% ACN k terčíku došlo k zabarvení roztoku, neboť se uvolnil hemoglobin a nedošlo tedy k úplné precipitaci proteinů. Účinnost extrakce byla tedy testována pro koncentrace 75% až 90% ACN v triplicátu. Výsledky jsou uvedeny v grafu 1 a 2.



Graf 1: Závislost plochy píkú alantoinu na koncentraci acetonitrilu v elučním činidle



Graf 2: Závislost plochy píkú kyseliny močové na koncentraci acetonitrilu v elučním činidle

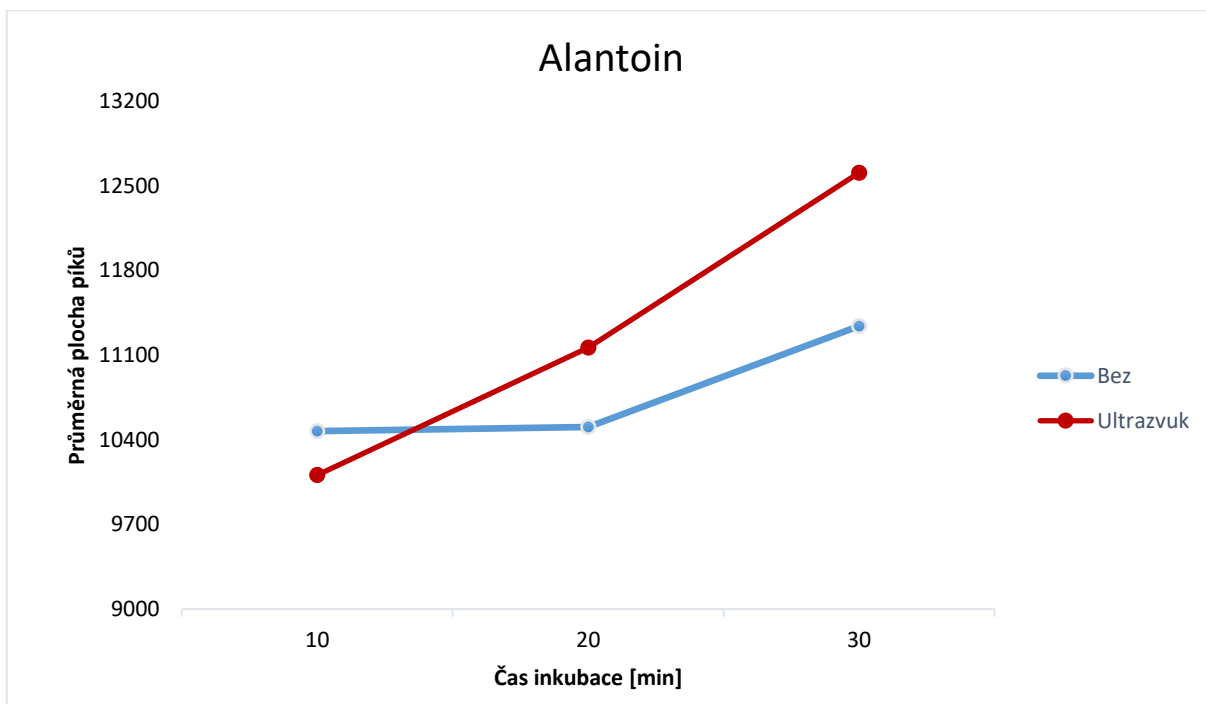
Z grafů je patrné, že účinnost extrakce alantoinu z DBS roste se zvyšující se koncentrací ACN a je nejvyšší při 90% ACN. Avšak u KM je patrný opačný trend a při 90% ACN účinnost extrakce KM klesá trojnásobně oproti 75% ACN. Tudíž jsme zvolili kompromis, a to koncentraci 85% ACN. Při výběru byl brán větší ohled na alantoin, jelikož se nachází ve vzorcích ve velmi nízkých koncentracích v porovnání s KM, u které je použítí 85% ACN i tak dostačující pro dobrou citlivost detekce.

3.4 Test účinnosti sonifikace při extrakci alantoinu a kyseliny močové ze suché kapky krve

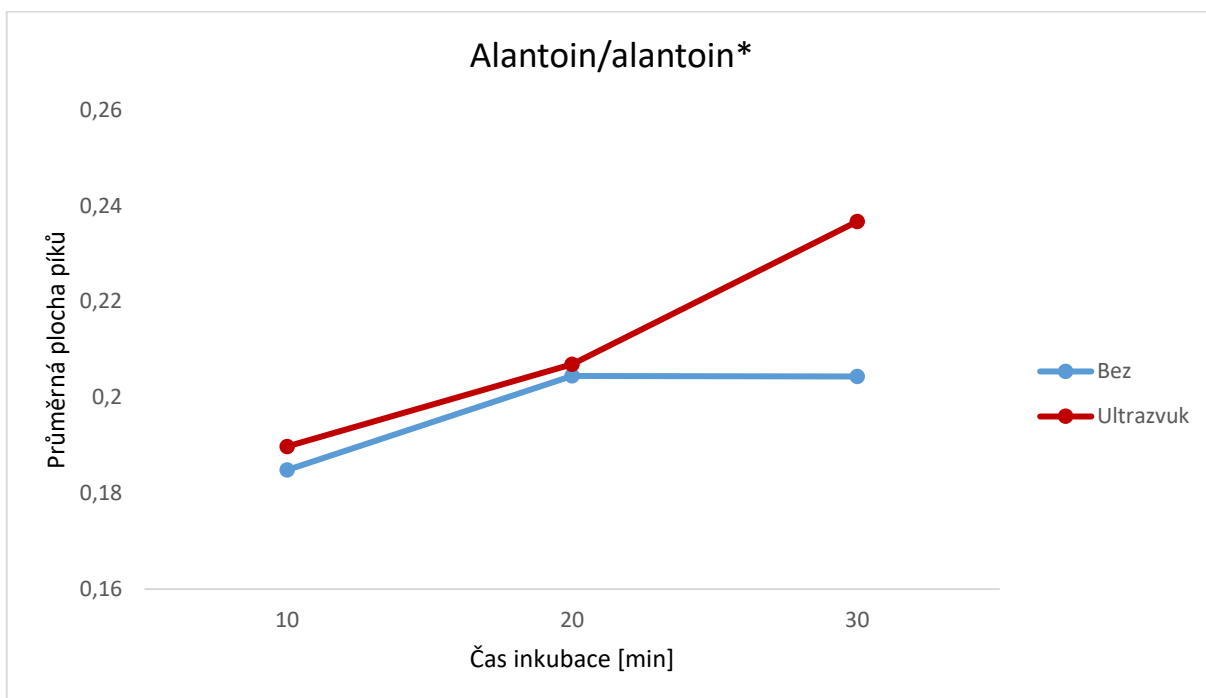
Wagner a kol. [48] zmiňují, že výtěžnost extrakce klesá s hodnotou hematokritu. Pro zlepšení účinnosti extrakce analytů z DBS vzorků se ve většině případů provádí extrakce za neustálého míchání vzorku nebo je vzorek umístěn do ultrazvukové lázně. V našem případě jsme testovali, zda dojde ke zvýšení účinnosti extrakce při použití sonifikace. Připravené vzorky byly eluovány v 85% ACN po dobu 10, 20, 30 minut v duplikátu, jak při použití sonifikace, tak pouhým stáním při laboratorní teplotě. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6 a grafická závislost průměru plochy píku analytu a průměru poměru ploch píků analytů (Analyt/IS) je uvedena v grafech 3-6.

Tabulka 6: Test účinnosti sonifikace při extrakci alantoinu a kyseliny močové ze suché kapky krve

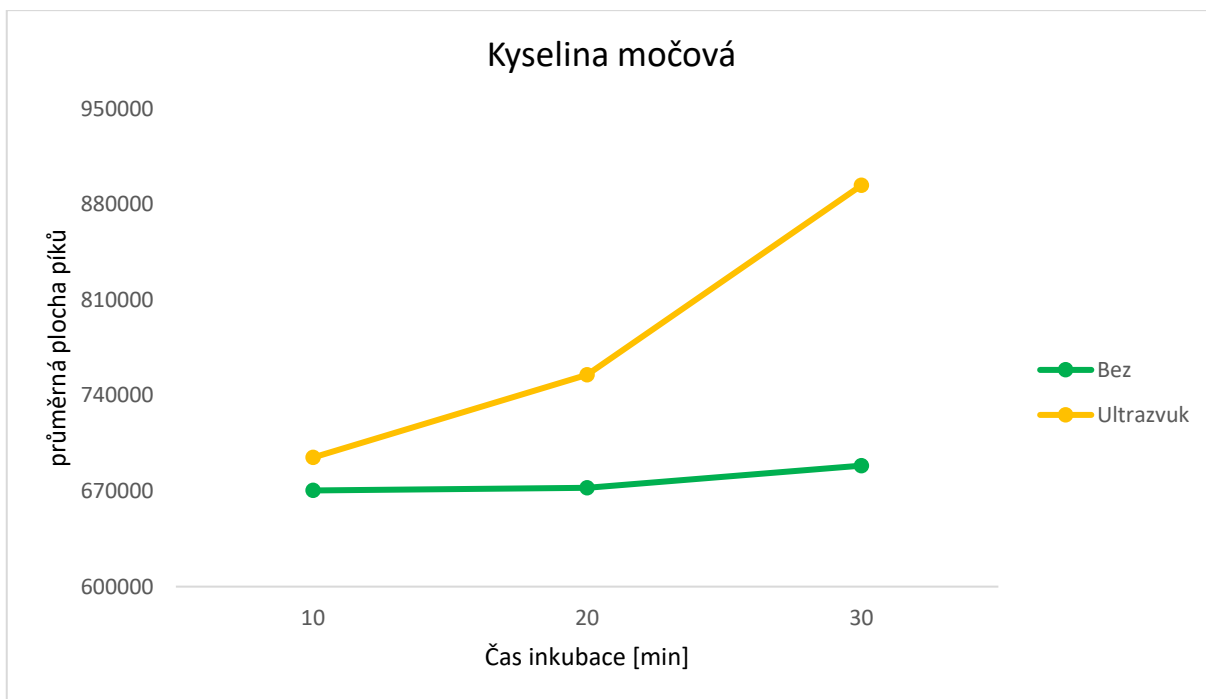
| Analyt | | Průměr ploch píku za daný čas | | | | | |
|----------|----------------|-------------------------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|
| | | 10 minut | | 20 minut | | 30 minut | |
| | | Plocha analytu | Poměr ploch | Plocha analytu | Poměr ploch | Plocha analytu | Poměr ploch |
| KM | Bez sonifikace | 670482 | 6,26 | 672361 | 7,27 | 688658 | 7,90 |
| | Se sonifikací | 694616 | 7,96 | 755153 | 10,03 | 894029 | 10,07 |
| Alantoin | Bez sonifikace | 10472 | 0,18 | 10507 | 0,20 | 11341 | 0,20 |
| | Se sonifikací | 10109 | 0,19 | 11162 | 0,21 | 12610 | 0,24 |



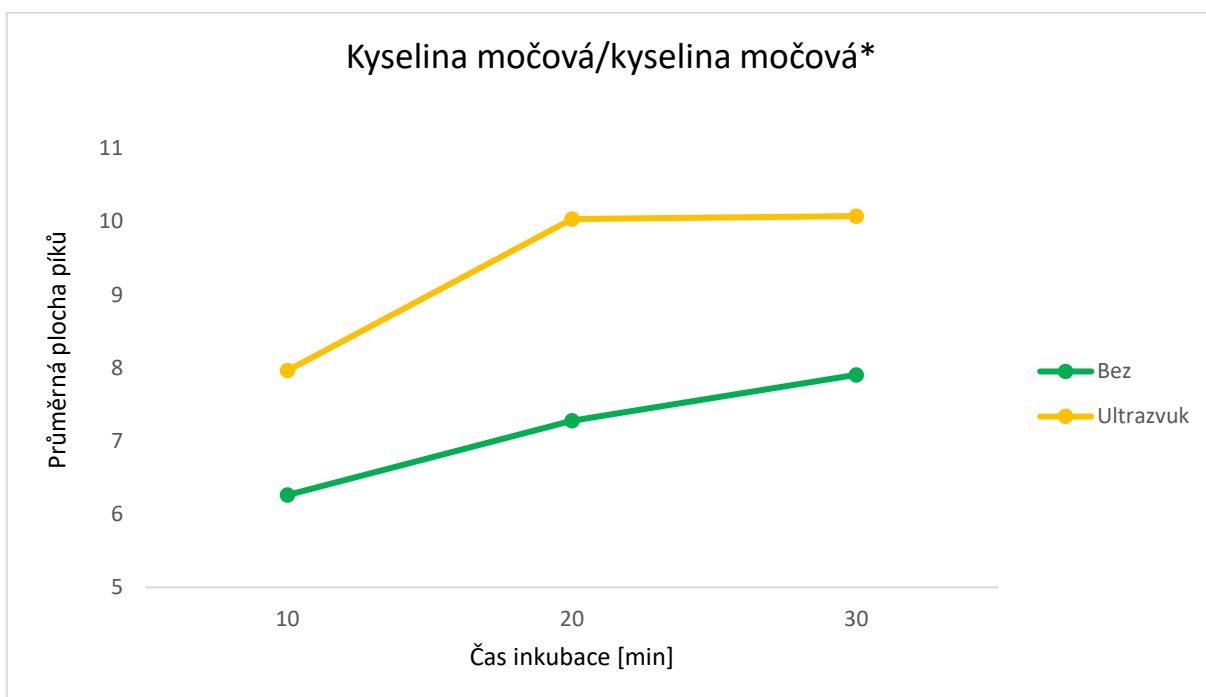
Graf 3: Závislost velikosti plochy píku alantoinu na době extrakce



Graf 4: Závislost poměru plochy píku alantoinu a IS na době extrakce



Graf 5: Závislost velikosti plochy píku kyseliny močové na době extrakce

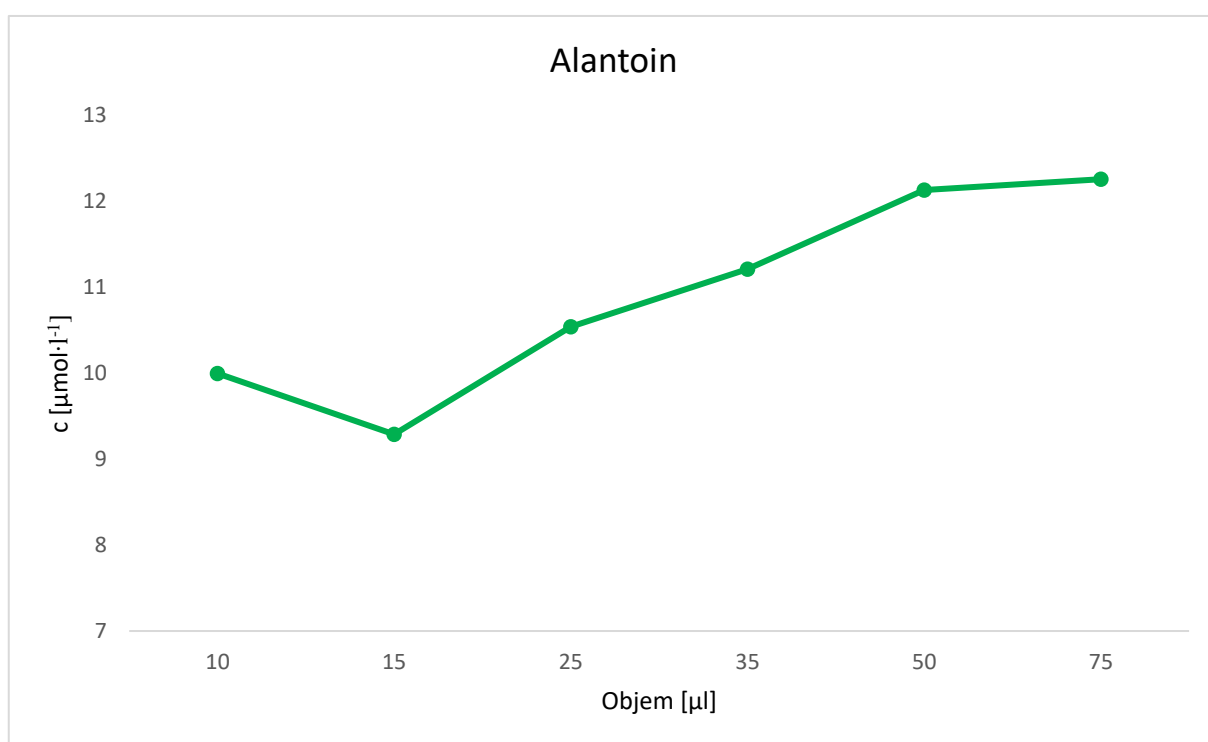


Graf 6: Závislost poměru plochy píku kyseliny močové a IS na době extrakce

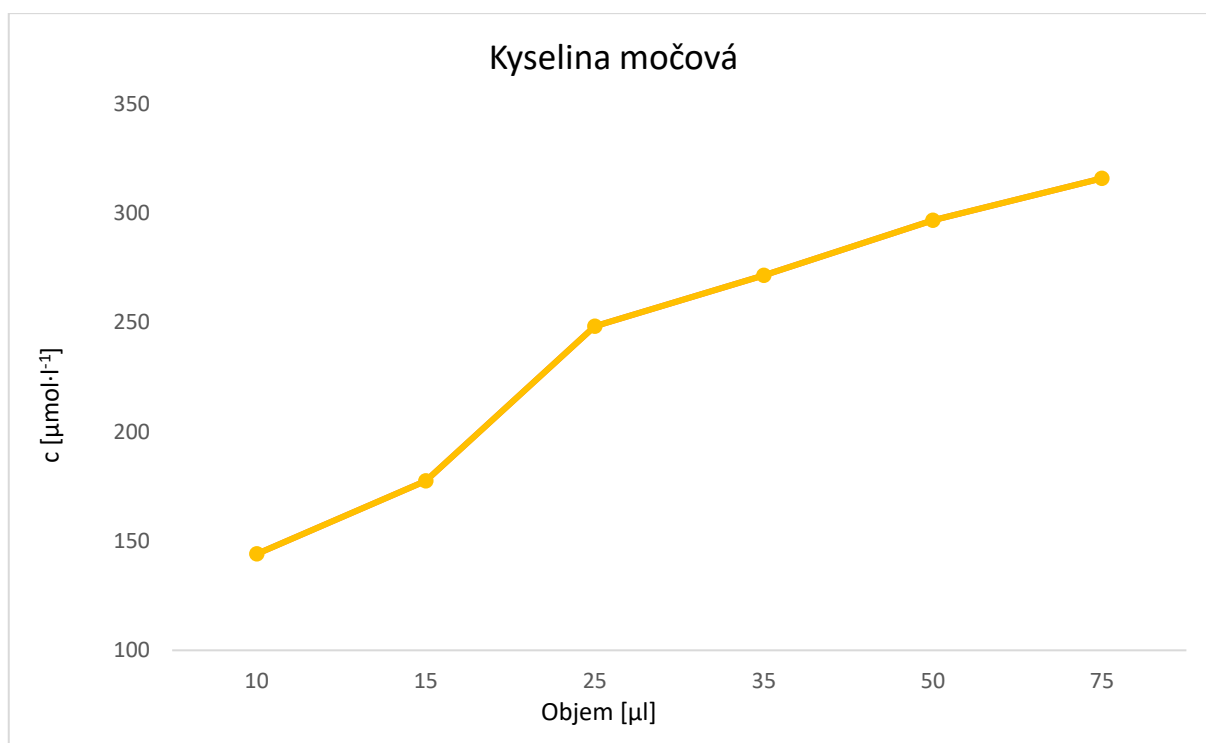
Z grafů je jasně patrné, že KM i allantoin se více elují z DBS při sonikaci po dobu 30 min. Ke zlepšení účinnosti extrakce došlo i při prodloužení doby extrakce bez sonikace, nicméně nárůst zde nebyl tak velký. Tudíž při dalším zpracování vzorků jsme obsah vzorků sonifikovali po dobu 30 minut.

3.5 Test různých objemů krve aplikovaných na odběrovou kartu

Typický vzorek DBS obsahuje zhruba 50 μl krve s průměrem skvrny okolo 12 mm. Objem aplikované krve na odběrovou kartu a kvalita DBS vzorku může mít vliv na koncentraci analytů. Moat a kol. [60] uvedli, že menší objemy skvrn krve (10 μl) vykazují nižší výsledky koncentrací analytů než skvrny s objemem větším jak 50 μl . U objemů vyšších jak 75 μl byly výsledky mnohem vyšší než s objemem 50 μl . Vliv objemu krve na koncentraci KM a alantoinu byl posouzen nanesením zvyšujících se objemů krve (10, 15, 25, 35, 50 a 75 μl) na filtrační papír a stanovením koncentrace KM a alantoinu. Závislost koncentrace KM a alantoinu na objemu nakapané krve na odběrovou kartu je znázorněna v grafu 7 a 8.



Graf 7: Závislost koncentrace alantoinu na objemu krve aplikované na odběrovou kartu



Graf 8: Závislost koncentrace kyseliny močové na objemu krve aplikované na odběrovou kartu

Z grafů je patrné, že objem aplikované krve na odběrovou kartu má velký vliv na finální koncentraci analytů. U vzorků s objemy krve 50 a 75 μl jsou rozdíly malé. Pro maximální správnost výsledků by měly vzorky i kalibrátory obsahovat 50-75 μl krve a výseky terčů z DBS vzorků by měly být ve stejné poloze jako u kalibrátorů.

3.6 Stabilita alantoinu a kyseliny močové v suché kapce krve

Stabilita alantoinu a KM byla ověřena stanovením hladin alantoinu a KM ve vzorcích DBS uchovávaných při laboratorní teplotě a 4 °C s týdenním a měsíčním rozestupem (Tabulka 7 a 8). Z výsledků je patrné, že koncentrace alantoinu a KM se ve vzorcích DBS uchovávaných jeden týden při laboratorní teplotě téměř nemění. U vzorků uchovávaných jeden měsíc při laboratorní teplotě významně vzrostla koncentrace alantoinu. To může být důsledek oxidace KM na alantoin. Trifonova a kol.[47] uvedli, že stabilita analytů ve vzorcích DBS je závislá na druhu analytu a matici a odbourávání analytu se časem zvyšuje, což potvrzují i naše výsledky. Tudíž se doporučuje skladovat vzorky DBS při nízkých teplotách, aby nedocházelo k oxidaci KM.

Tabulka 7: Stabilita alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve uchovávaných při laboratorní teplotě

| | Analyt | AVG [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | SD [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|-----------|-----------------|---|--|
| 1. den | Kyselina močová | 205,60 | 7,52 |
| | Alantoin | 5,26 | 0,08 |
| 8. den | Kyselina močová | 203,13 | 12,52 |
| | Alantoin | 5,94 | 0,45 |
| Po měsíci | Kyselina močová | 228,07 | 28,81 |
| | Alantoin | 7,21 | 1,88 |

AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka

Tabulka 8: Stabilita alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve uchovávaných při 4 °C

| | Analyt | AVG [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | SD [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|--------|-----------------|---|--|
| 1. den | Kyselina močová | 212,81 | 11,51 |
| | Alantoin | 5,54 | 0,42 |
| 8. den | Kyselina močová | 195,65 | 9,74 |
| | Alantoin | 5,74 | 0,12 |

AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka

3.7 Analytické parametry metody

Analytické parametry metody stanovení KM a alantoinu byly určeny na 5 vzorcích DBS během tří dnů za stejných podmínek. Přesnost metody byla testována na vzorcích DBS o dvou různých koncentracích KM a alantoinu (nízká koncentrace pro fyziologické rozmezí a vyšší koncentrace pro patologické hodnoty). Výsledky přesnosti pro stanovení KM a alantoinu metodou HPLC-MS/MS jsou uvedeny v tabulce 9 a 10. Analýzou standardních roztoků o známé koncentraci KM a alantoinu jsme určili interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací standardů, kterou jsme naměřili. Pro KM byl rozsah koncentrací 10,0 – 701,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro alantoin 0,52 – 51,86 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly určeny z kalibračních

křivek ($LOD = \frac{3,3 \cdot SD}{AVG}$ a $LOQ = \frac{10 \cdot SD}{AVG}$, kde SD je směrodatná odchylka úseků kalibračních křivek a AVG je průměr směrnic kalibračních křivek). Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 9: Přesnost metody pro stanovení kyseliny močové v suché kapce krve

| Kyselina močová | | | | | | |
|-----------------|---|--------|--|-------|------|------|
| Analyt | AVG [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] | | SD [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] | | CV % | |
| | F | P | F | P | F | P |
| 1. den | 224,73 | 801,26 | 4,27 | 9,54 | 1,9 | 1,19 |
| 2. den | 226,2 | 777,69 | 12,17 | 37,43 | 5,38 | 4,81 |
| 10. den | 233,54 | 751,3 | 7,96 | 31,49 | 3,41 | 4,19 |
| Průměr | 228,16 | 776,75 | 8,13 | 26,15 | 3,56 | 3,4 |

F = vzorek krve s fyziologickou koncentrací kyseliny močové; P = vzorek krve s patologickou koncentrací kyseliny močové; AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka; CV = variační koeficient

Tabulka 10: Přesnost metody pro stanovení alantoinu v suché kapce krve

| Alantoin | | | | | | |
|------------|------|-------|------|------|------|------|
| Analyt | AVG | | SD | | CV % | |
| | F | P | F | P | F | P |
| 1. den | 5,63 | 51,65 | 0,12 | 0,86 | 2,17 | 1,67 |
| 2. den | 5,54 | 56,61 | 0,16 | 0,53 | 2,96 | 0,94 |
| 10. den | 5,00 | 55,96 | 0,17 | 1,00 | 3,33 | 1,79 |
| Průměr dní | 5,39 | 54,74 | 0,15 | 0,8 | 2,82 | 1,47 |

F = vzorek krve s fyziologickou koncentrací alantoinu; P = vzorek krve s patologickou koncentrací alantoinu; AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka; CV = variační koeficient

Tabulka 11: Parametry kalibračních křivek metody pro stanovení kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích suché kapky krve

| Analyt | k (AVG) | q (AVG) | Q (SD) | R ² | LOD | LOQ |
|-----------------|----------|----------|----------|----------------|------|-------|
| Kyselina močová | 0,039732 | 0,898681 | 1,068629 | 0,9949 | 9,53 | 28,88 |
| Alantoin | 0,047742 | -0,00391 | 0,02305 | 0,9993 | 0,29 | 0,88 |

3.8 Určení orientačních hladin kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získanou technikou suché kapky krve

Vzorky odebrané od dobrovolných dárců byly zpracovány dle postupu uvedeného v experimentální části a změřeny při optimalizovaných podmínkách pro HPLC-MS/MS. V tabulkách 12-14 jsou uvedeny orientační hodnoty KM a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou DBS. Hladiny alantoinu byly vyšší v porovnání s dříve publikovanými výsledky [42]. Je to pravděpodobně tím, že autoři stanovovali koncentraci alantoinu v plazmě, kdežto my v plné krvi, což naznačuje, že hladiny alantoinu v erytrocytech jsou vyšší než v plazmě. Hladiny KM jsou ve fyziologickém rozmezí.

Tabulka 12: Hladiny kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou suché kapky krve (všichni)

| Analyty | AVG [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | SD [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | Medián [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | IQR [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | Minimum [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | Maximum [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|----------|--|---|---|---|--|--|
| KM | 200,91 | 67,01 | 189,61 | 80,47 | 96,02 | 459,01 |
| Alantoin | 9,89 | 4,70 | 8,82 | 5,03 | 4,60 | 24,20 |

AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka; CV = variační koeficient; IQR = mezikvartilové rozpětí (rozdíl mezi 75. a 25. percentilem)

Tabulka 13: Hladiny kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou suché kapky krve (ženy)

| Analyty | AVG | SD | Medián | IQR | Minimum | Maximum |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ženy | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
| KM | 178,77 | 42,07 | 174,59 | 57,30 | 108,99 | 246,14 |
| Alantoin | 8,26 | 3,97 | 7,22 | 2,14 | 4,98 | 24,20 |

AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka; CV % = variační koeficient; IQR = mezikvartilové rozpětí (rozdíl mezi 75. a 25. percentilem)

Tabulka 14: Hladiny kyseliny močové a alantoinu v krvi dobrovolných dárců získané technikou suché kapky krve (muži)

| Analyty | AVG | SD | Medián | IQR | Minimum | Maximum |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| muži | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] |
| KM | 224,06 | 80,35 | 218,44 | 67,08 | 96,02 | 4,60 |
| Alantoin | 11,60 | 4,88 | 10,93 | 5,21 | 4,60 | 22,74 |

AVG = aritmetický průměr; SD = směrodatná odchylka; CV % = variační koeficient; IQR = mezikvartilové rozpětí (rozdíl mezi 75. a 25. percentilem)

Získané hodnoty koncentrací byly podrobeny statistické analýze. Byla testována závislost hladin KM a alantoinu mezi sebou a na pohlaví a věku. Vzhledem k nenormálnímu rozdělení dat byl pro posouzení korelace použit Spearmanův korelační koeficient a statistická významnost byla testována na hladině $\alpha = 0,05$, tedy $p < 0,05$ je považována za statisticky významnou. Pro posouzení statisticky významných rozdílů v koncentracích KM a alantoinu mezi muži a ženami byl použit Mann-Whitney U test. Z výsledků je patrná statisticky významná korelace mezi hladinami KM a alantoinu ($R = 0,5735$, $p < 0,001$). Dle očekávání byly naměřeny vyšší koncentrace KM u mužů ($p < 0,050$), ale také alantoinu ($p < 0,010$).

4 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zavést dostatečně rychlou, citlivou a spolehlivou metodu pro simultánní stanovení alantoinu a kyseliny močové. Tyto požadavky splňuje metoda HPLC-MS/MS, která je dostatečně rychlá a na rozdíl od plynové chromatografie nevyžaduje derivatizaci alantoinu a kyseliny močové, a oproti enzymatické metodě zde nedochází k interferenci redukujících látek. Díky jednoduchému a prakticky neinvazivnímu odběru krve a vyšší stabilitě stanovovaných látek byla pro odběr vzorků krve využita technika suché kapky. Při vývoji metody bylo zjištěno, že objem aplikované krve na odběrovou kartu má vliv na koncentraci kyseliny močové i alantoinu, a proto se doporučuje aplikovat minimálně 50-75 μ l krve, tedy aby byla zcela zaplněna zóna odběrové karty krví z obou stran. Jako extrakční činidlo byl zvolen roztok 85% acetonitrilu v deionizované vodě, který ze suché krve dostatečně extrahoval jak alantoin, tak také kyselinu močovou. Při eluci kyseliny močové a alantoinu ze suché krve je vhodné použít sonifikaci. Při vývoji metody HPLC-MS/MS byla optimalizována řada podmínek. Presentovanou metodou byla stanovena koncentrace kyseliny močové a alantoinu v krvi získanou technikou suché kapky u 45 dobrovolných dárců. Získané výsledky naznačují, že metoda HPLC-MS/MS pro simultánní stanovení hladin kyseliny močové a alantoinu v krvi získanou technikou suché kapky by mohla být použitelná v klinické praxi pro monitorování oxidačního stresu u lidí.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HEDIGER. Physiologie und Biochemie der Harnsäure. *Therapeutische Umschau* [online]. 2013 [vid. 2020-02-21]. ISSN 10.1024/0040-5930.61.9.541. Dostupné z: <https://econtent.hogrefe.com/doi/abs/10.1024/0040-5930.61.9.541>
- [2] MAIUOLO, Jessica, Francesca OPPEDISANO, Santo GRATTERI, Carolina MUSCOLI a Vincenzo MOLLACE. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology* [online]. 2016, **213**, Uric Acid and Cardiovascular Risk, 8–14. ISSN 0167-5273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.109
- [3] BARR, Walter G. Uric Acid. In: H. Kenneth WALKER, W. Dallas HALL a J. Willis HURST, ed. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* [online]. 3rd vyd. Boston: Butterworths, 1990 [vid. 2020-03-05]. ISBN 978-0-409-90077-4. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK273/>
- [4] EL RIDI, Rashika a Hatem TALLIMA. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2017, **8**(5), 487–493. ISSN 2090-1232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2017.03.003
- [5] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, 1999.
- [6] GALASSI, Francesco M. a Claudio BORGHI. A brief history of uric acid: From gout to cardiovascular risk factor. *European Journal of Internal Medicine* [online]. 2015, **26**(5), 373. ISSN 1879-0828. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejim.2015.04.005
- [7] LEE, Seung Jae, Byeong Kil OH a Ki-Chul SUNG. Uric acid and cardiometabolic diseases. *Clinical Hypertension* [online]. 2020, **26** [vid. 2021-03-05]. ISSN 2056-5909. Dostupné z: doi:10.1186/s40885-020-00146-y
- [8] BECKER, Bernhard F. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1993, **14**(6), 615–631. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/0891-5849(93)90143-I
- [9] PETR SCHNEIDERKA A KOL. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie 2.doplněné a přepracované vydání*. Praha: Karolinum, 2004.
- [10] BOWMAN, Gene L., Jackilen SHANNON, Balz FREI, Jeffrey A. KAYE a Joseph F. QUINN. Uric Acid as a CNS Antioxidant. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. 2010, **19**(4), 1331–1336. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-1330
- [11] ROBERT K. MURRAY, Harold A. Harper. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Praha. B.m.: H& H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [12] SIMOYI, Melvin F, Elizabeth FALKENSTEIN, Knox VAN DYKE, Kenneth P BLEMINGS a Hillar KLANDORF. Allantoin, the oxidation product of uric acid is present in chicken and turkey plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2003, **135**(2), 325–335. ISSN 1096-4959. Dostupné z: doi:10.1016/S1096-4959(03)00086-1

- [13] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Univerzita Karlova. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1414-4.
- [14] CHEN, Changyi, Jian-Ming LÜ a Qizhi YAO. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* [online]. 2016, **22**, 2501–2512. ISSN 1234-1010. Dostupné z: doi:10.12659/MSM.899852
- [15] RŮŽIČKA, Vladimír. Dna. *Interní medicína pro praxi*. 2005, **5**(4), 173–177. ISSN 12127299, 18035256.
- [16] BLAHOŠ, Jaroslav. *Kyselina močová, její metabolismus a patogenetický význam* [online]. 1. vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/view/uuid:04cac360-ed94-11e8-a5a4-005056827e52?page=uuid:b38abd40-1046-11e9-91df-005056825209>
- [17] ESPARZA MARTÍN, N. a V. GARCÍA NIETO. Hypouricemia and tubular transport of uric acid. *Nefrologia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola Nefrologia* [online]. 2011, **31**(1), 44–50. ISSN 1989-2284. Dostupné z: doi:10.3265/Nefrologia.pre2010.Oct.10588
- [18] JIN, Ming, Fan YANG, Irene YANG, Ying YIN, Jin Jun LUO, Hong WANG a Xiao-Feng YANG. Uric Acid, Hyperuricemia and Vascular Diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2012, **17**, 656–669. ISSN 1093-9946.
- [19] KLADENSKÝ, Jiří. Kyselina močová z pohledu nemocí ledvin. *Urologie pro praxi* [online]. 2020, **21**(2), 62–66. ISSN 12131768, 18035299. Dostupné z: doi:10.36290/uro.2020.014
- [20] NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1688-9.
- [21] SILBERNAGL, Stefan a Florian LANG. *Atlas patofyziologie člověka*. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-7169-968-3.
- [22] ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Přehled vyšetření metabolitů pro diagnostiku dědičných metabolických poruch*. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK, 2008. ISBN 978-80-904219-0-5.
- [23] CIBIČKOVÁ, Lubica a David KARÁSEK. Uric acid as a risk factor for cardiovascular diseases. *Vnitř Léč.* nedatováno, 5.
- [24] PARK, Jung Hwan, Yong-Il JO a Jong-Ho LEE. Renal effects of uric acid: hyperuricemia and hypouricemia. *The Korean Journal of Internal Medicine* [online]. 2020, **35**(6), 1291–1304. ISSN 1226-3303. Dostupné z: doi:10.3904/kjim.2020.410
- [25] DASTYCH, Milan. *Klinická biochemie - bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4572-9.

- [26] WANG, Qiangwei, Xu WEN a Jinming KONG. Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **50**(4), 359–375. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2019.1637711
- [27] XIADONG, Dong. International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research [online]. 2017, **8**(issue 2) [vid. 2020-10-28]. ISSN 23205148. Dostupné z: <https://ijpsr.com/bft-article/study-on-detection-methods-for-uric-acid-in-biological-samples/?view=fulltext>
- [28] VAKH, Christina, Stanislawa KORONKIEWICZ, Slawomir KALINOWSKI, Leonid MOSKVIN a Andrey BULATOV. An automatic chemiluminescence method based on the multi-pumping flow system coupled with the fluidized reactor and direct-injection detector: Determination of uric acid in saliva samples. *Talanta* [online]. 2017, **167**, 725–732. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.02.009
- [29] PORMSILA, Worapan, Stephan KRÄHENBÜHL a Peter C. HAUSER. Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for uric acid determination in biological fluids. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **636**(2), 224–228. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.02.012
- [30] ZHAO, Shulin, Jianshi WANG, Fanggui YE a Yi-Ming LIU. Determination of uric acid in human urine and serum by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry* [online]. 2008, **378**(2), 127–131. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2008.04.014
- [31] TUKIMIN, Nurulkhalilah, Jaafar ABDULLAH a Yusran SULAIMAN. Review—Electrochemical Detection of Uric Acid, Dopamine and Ascorbic Acid. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2018, **165**(7), B258. ISSN 1945-7111. Dostupné z: doi:10.1149/2.0201807jes
- [32] SUN, Ying-pei, Juan CHEN, Huan-yang QI a Yan-ping SHI. Graphitic carbon nitrides modified hollow fiber solid phase microextraction for extraction and determination of uric acid in urine and serum coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2015, **1004**, 53–59. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.09.025
- [33] SHESTOPALOV, A. V., T. P. SHKURAT, Z. I. MIKASHINOVICH, I. O. KRYZHANOVSKAYA, M. A. BOGACHEVA, S. V. LOMTEVA, V. N. PROKOF'EV a E. P. GUS'KOV. Biological functions of allantoin. *Biology Bulletin* [online]. 2006, **33**(5), 437–440. ISSN 1608-3059. Dostupné z: doi:10.1134/S1062359006050037
- [34] BECKER, Lillian C., Wilma F. BERGFELD, Donald V. BELSITO, Curtis D. KLAASSEN, James G. MARKS, Ronald C. SHANK, Thomas J. SLAGA, Paul W. SNYDER a F. ALAN ANDERSEN. Final report of the safety assessment of allantoin and its related complexes. *International Journal of Toxicology* [online]. 2010, **29**(3 Suppl), 84S-97S. ISSN 1092-874X. Dostupné z: doi:10.1177/1091581810362805
- [35] PUBCHEM. *Allantoin* [online]. [vid. 2020-06-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/204>
- [36] TOLUN, Advije A., Haoyue ZHANG, Dora II'YASOVA, Judit SZTÁRAY, Sarah P. YOUNG a David S. MILLINGTON. Allantoin in Human Urine Quantified by UPLC-

- MS/MS. *Analytical biochemistry* [online]. 2010, **402**(2), 191–193. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2010.03.033
- [37] KIM, Kyung Mee, George N. HENDERSON, Reginald F. FRYE, Cheryl D. GALLOWAY, Nancy J. BROWN, Mark S. SEGAL, Witcha IMARAM, Alexander ANGERHOFER a Richard J. JOHNSON. Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* [online]. 2009, **877**(1–2), 65–70. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2008.11.029
- [38] BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental* [online]. 2000, **49**(2 Suppl 1), 3–8. ISSN 0026-0495. Dostupné z: doi:10.1016/s0026-0495(00)80077-3
- [39] MARTINEZ-MORAL, Maria-Pilar a Kurunthachalam KANNAN. Allantoin as a Marker of Oxidative Stress: Inter- and Intraindividual Variability in Urinary Concentrations in Healthy Individuals. *Environmental Science & Technology Letters* [online]. 2019 [vid. 2021-06-27]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.estlett.9b00142
- [40] YOUNG, E. Gordon a Catherine F. CONWAY. ON THE ESTIMATION OF ALLANTOIN BY THE RIMINI-SCHRYVER REACTION. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1942, **142**(2), 839–853. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)45082-X
- [41] LAGENDIJK, J., J. B. UBBINK a W. J. VERMAAK. The determination of allantoin, a possible indicator of oxidant status, in human plasma. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 1995, **33**(4), 186–193. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/33.4.186
- [42] CHUNG, Wai-Yuen a Iris F. F. BENZIE. Plasma allantoin measurement by isocratic liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Method evaluation and application in oxidative stress biomonitoring. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2013, **424**, 237–244. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2013.06.015
- [43] HANNON, W. Harry a Bradford L. THERRELL. Overview of the History and Applications of Dried Blood Samples. In: *Dried Blood Spots* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2014 [vid. 2021-02-04], s. 1–15. ISBN 978-1-118-89083-7. Dostupné z: doi:10.1002/9781118890837.ch1
- [44] CHACE, Donald H., Alan R. SPITZER a Víctor R. De JESÚS. Applications of Dried Blood Spots in Newborn and Metabolic Screening. In: *Dried Blood Spots* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2014 [vid. 2021-06-28], s. 53–75. ISBN 978-1-118-89083-7. Dostupné z: doi:10.1002/9781118890837.ch6
- [45] MEI, Joanne. Dried Blood Spot Sample Collection, Storage, and Transportation. In: *Dried Blood Spots* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2014 [vid. 2021-06-28], s. 21–31. ISBN 978-1-118-89083-7. Dostupné z: doi:10.1002/9781118890837.ch3
- [46] DAVIN, Brad a W. Harry HANNON. Dried Blood Spot Cards. In: *Dried Blood Spots* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2014 [vid. 2021-06-28], s. 16–20. ISBN 978-1-118-89083-7. Dostupné z: doi:10.1002/9781118890837.ch2

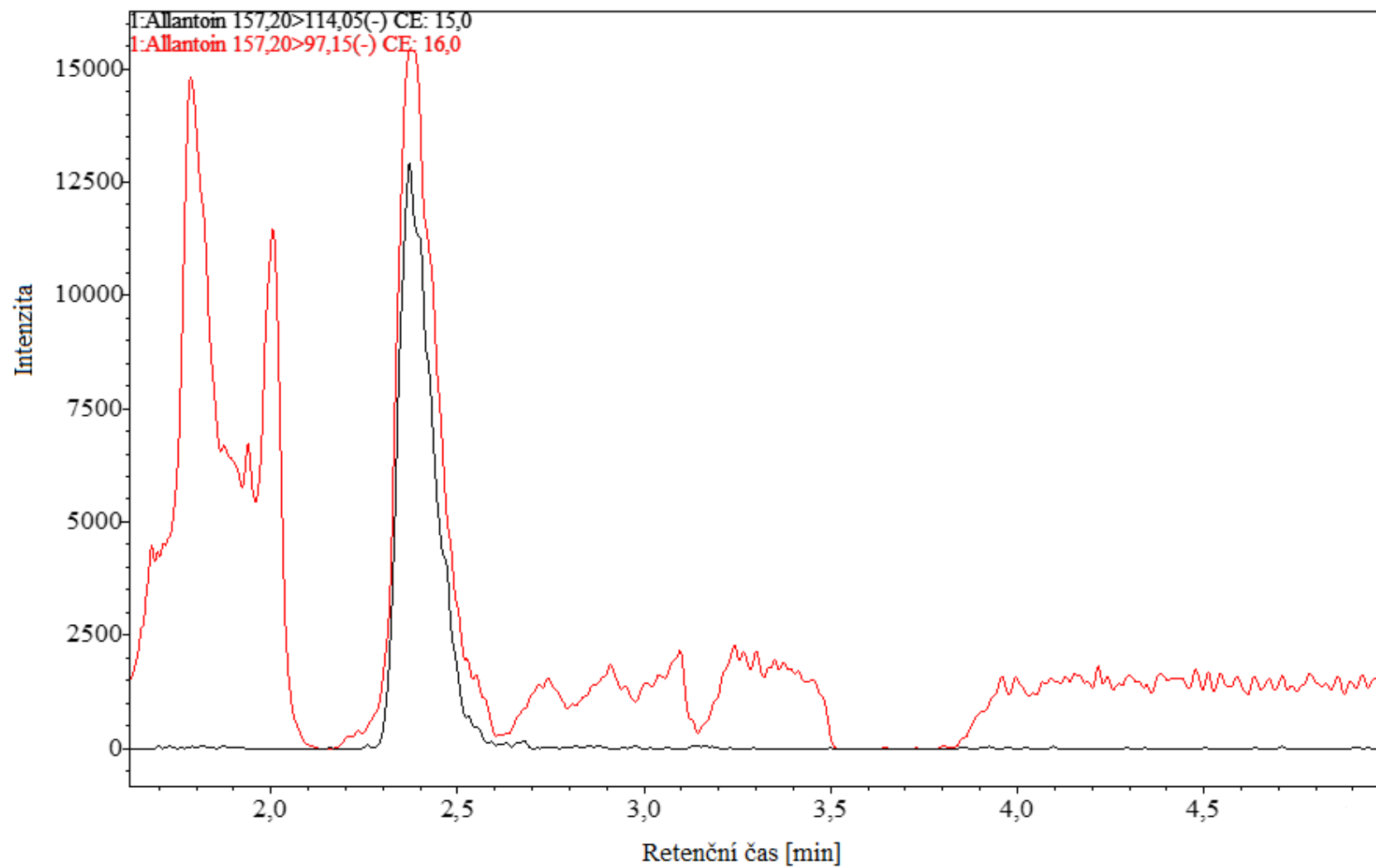
- [47] TRIFONOVA, Oxana P., Dmitri L. MASLOV, Elena E. BALASHOVA a Petr G. LOKHOV. Evaluation of Dried Blood Spot Sampling for Clinical Metabolomics: Effects of Different Papers and Sample Storage Stability. *Metabolites* [online]. 2019, **9**(11), 277. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo9110277
- [48] WAGNER, Michel, David TONOLI, Emmanuel VAREGIO a Gérard HOPFGARTNER. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35**(3), 361–438. ISSN 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21441
- [49] DE KESEL, Pieter MM, Sara CAPIAU, Willy E LAMBERT a Christophe P STOVE. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis* [online]. 2014, **6**(14), 1871–1874. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.14.151
- [50] MOAT, Stuart J., Roanna S. GEORGE a Rachel S. CARLING. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *International Journal of Neonatal Screening* [online]. 2020, **6**(2), 26. ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns6020026
- [51] GRÜNER, Nico, Oumaima STAMBOULI a R. Stefan ROSS. Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* [online]. 2015, (97) [vid. 2021-02-04]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/52619
- [52] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2013. vyd. nedatováno. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [53] KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO. Introduction. In: *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2007 [vid. 2021-07-09], s. 1–24. ISBN 978-0-470-08795-4. Dostupné z: doi:10.1002/9780470087954.ch1
- [54] KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO. Stationary Phases. In: *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2007 [vid. 2021-07-11], s. 75–138. ISBN 978-0-470-08795-4. Dostupné z: doi:10.1002/9780470087954.ch3
- [55] PITT, James J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009, **30**(1), 19–34. ISSN 0159-8090.
- [56] LOBRUTTO, Rosario a Yuri KAZAKEVICH. Reversed-Phase HPLC. In: *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2007 [vid. 2021-07-11], s. 139–239. ISBN 978-0-470-08795-4. Dostupné z: doi:10.1002/9780470087954.ch4
- [57] JARDIM, Isabel C. S. F., Liane MALDANER, Josimara LOURENÇO, Livia M. A. FIORAVANTI a Carol H. COLLINS. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(19), 2917–2929. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201000313
- [58] CHEN, Guodong, Li-Kang ZHANG a Birendra N. PRAMANIK. LC/MS: Theory, Instrumentation, and Applications to Small Molecules. In: *HPLC for Pharmaceutical*

Scientists [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2007 [vid. 2021-07-09], s. 281–346. ISBN 978-0-470-08795-4. Dostupné z: doi:10.1002/9780470087954.ch7

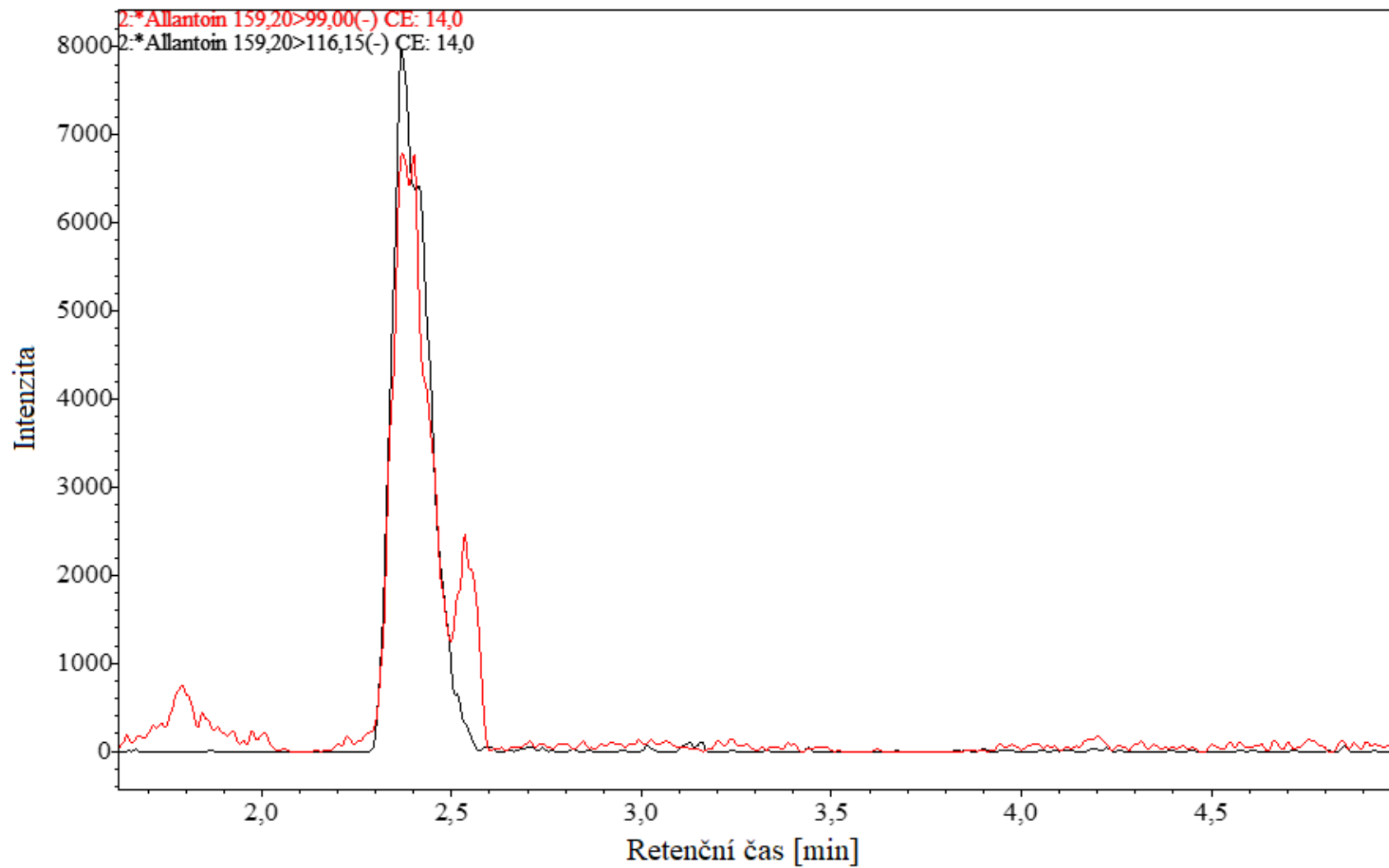
- [59] DONG, Michael. HPLC Applications in Food, Environmental, Chemical, and Life Sciences Analysis. In: *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2019, s. 335–369. ISBN 978-1-119-31378-6. Dostupné z: doi:10.1002/9781119313786.ch13
- [60] MOAT, Stuart J, Catherine DIBDEN, Lesley TETLOW, Caroline GRIFFITH, Jim CHILCOTT, Roanna GEORGE, Laura HAMILTON, Teresa HY WU, Finlay MACKENZIE a Susan Kate HALL. Effect of blood volume on analytical bias in dried blood spots prepared for newborn screening external quality assurance. *Bioanalysis* [online]. 2020, **12**(2), 99–109. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2019-0201

PŘÍLOHY

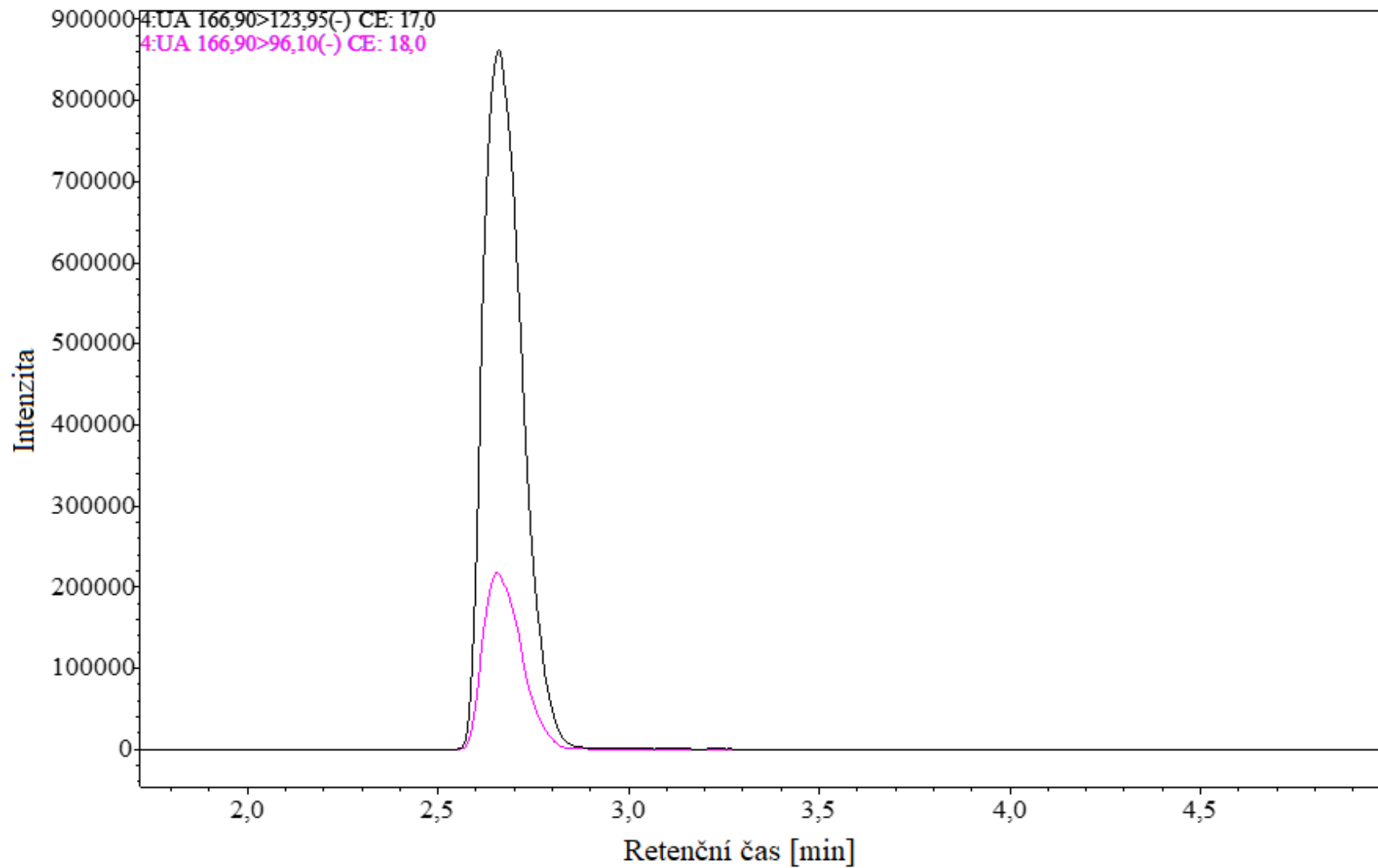
| | |
|---|----|
| Příloha 1: HPLC chromatogram stanovení alantoinu v suché kapce krve | 66 |
| Příloha 2: HPLC chromatogram stanovení značeného alantoinu v suché kapce krve..... | 67 |
| Příloha 3: HPLC chromatogram stanovení kyseliny močové v suché kapce krve | 68 |
| Příloha 4: HPLC chromatogram stanovení kyseliny močové v suché kapce krve | 69 |
| Příloha 5: Chromatografický záznam stanovení kyseliny močové ($238,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a alantoinu ($8,82 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v krvi získané technikou suché kapky metodou HPLC-MS/MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v experimentální části | 70 |



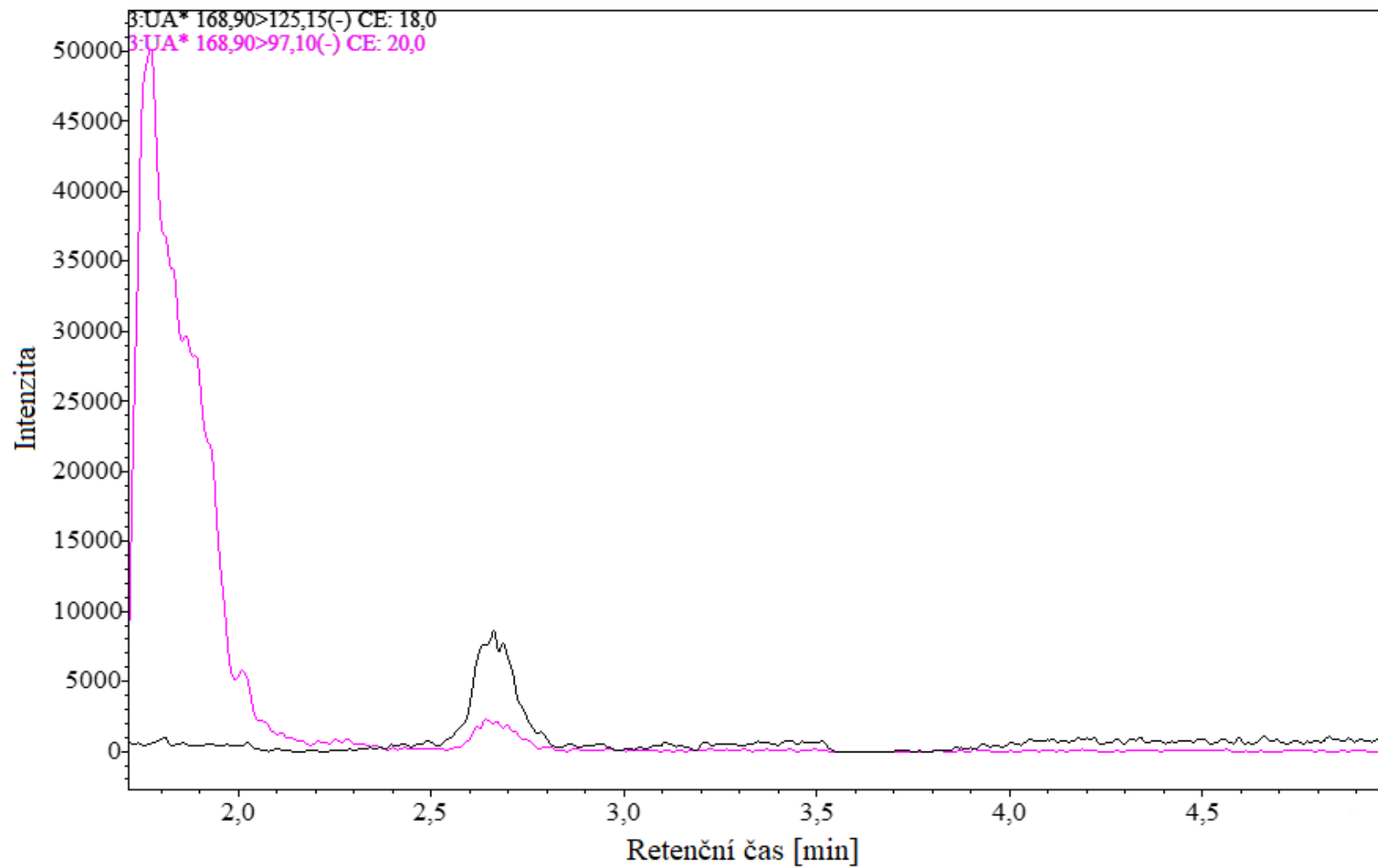
Příloha 1: HPLC chromatogram stanovení alantoinu v suché kapce krve



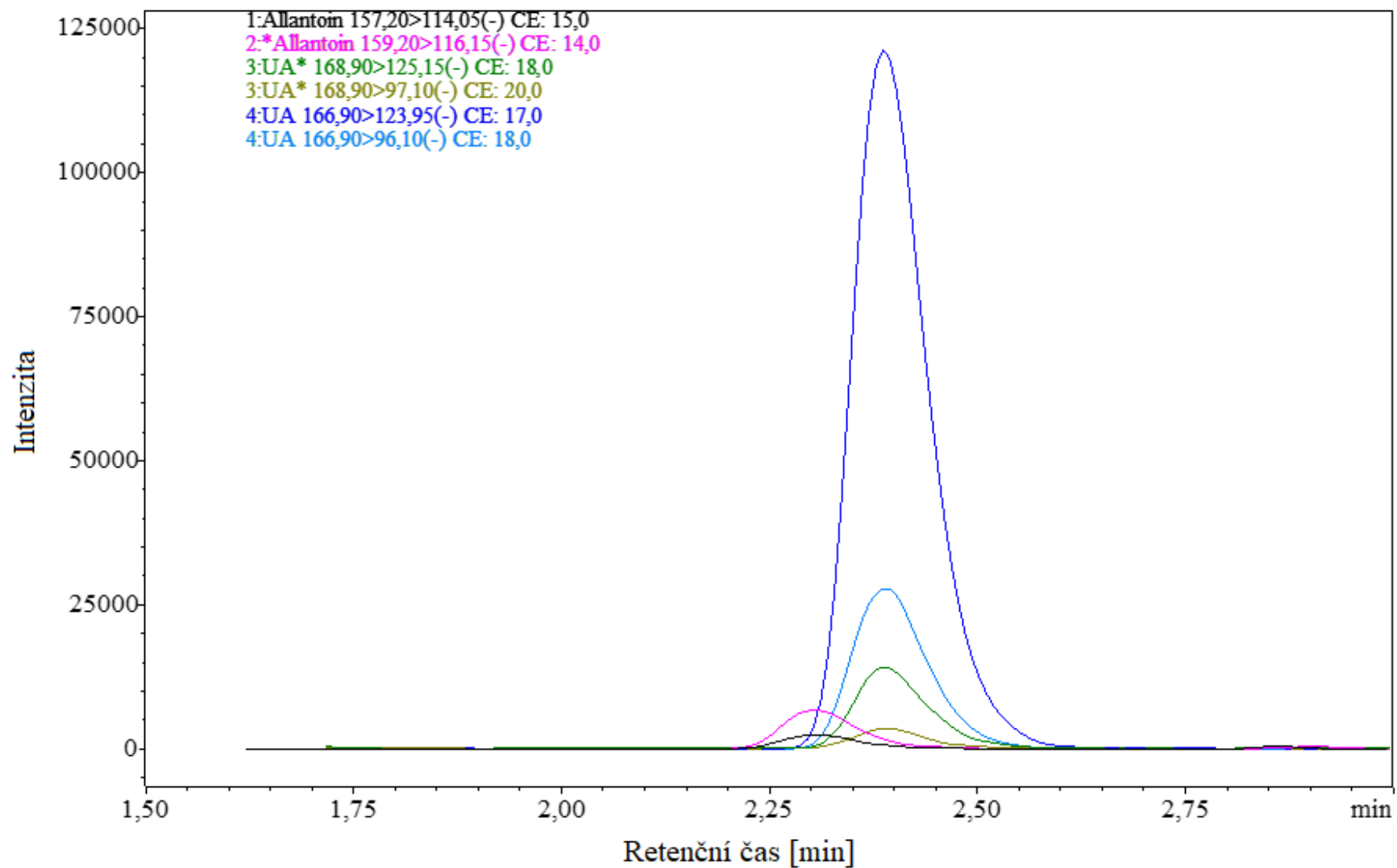
Příloha 2: HPLC chromatogram stanovení značeného allantoinu v suché kapce krve



Příloha 3: HPLC chromatogram stanovení kyseliny močové v suché kapce krve



Příloha 4: HPLC chromatogram stanovení kyseliny močové v suché kapce krve



Příloha 5: Chromatografický záznam stanovení kyseliny močové ($238,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a allantoinu ($8,82 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v krvi získané technikou suché kapky metodou HPLC-MS/MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v experimentální části.